



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์ตรึง

Fructooligosaccharide Production by Immobilized Enzyme

นามผู้วิจัย นางสาวเอื้องกาญจน์ ทาทอง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญาธิระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์ตรึง

Fructooligosaccharide Production by Immobilized Enzyme

โดย

นางสาวเอื้องกาญจน์ ทาทอง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ.2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เรื่องกาญจน์ ทาทอง 2556: การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์ตรีง
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน,
Ph.D. 91 หน้า

ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นคาร์โบไฮเดรต ที่ได้จากการใช้เอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสย่อยสลายซูโครสให้เป็นกลูโคสและฟรุกโทส จากนั้นเกิดการย้ายหมู่ของฟรุกโทสไปจับที่โมเลกุลของซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่งที่ตำแหน่งบีตา 2,1 ซึ่งฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำและสารผสมอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก และเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นการตรีงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสเพื่อนำไปใช้ในการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรีงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสด้วยแคลเซียมแอลจินेटโดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทฤษฎี ที่มีการแปรผันปัจจัยทั้งหมด 3 ปัจจัย ๆ ละ 3 ระดับ ได้การทดลองแบบ L-9 (3^3) orthogonal array ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेट 3.0 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น 150 หน่วยต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์ โดยให้กิจกรรมเอนไซม์ตรีงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสเท่ากับ 29.71 หน่วยต่อมิลลิลิตร และพบว่าทุกปัจจัยมีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบเบ็ดเสร็จซ้ำภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทฤษฎี พบว่าในรอบแรกของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จะให้ผลการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ดีที่สุดเท่ากับ 195.8 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นอัตราการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จะค่อย ๆ ลดลงในรอบต่อ ๆ ไป รวมทั้งการผลิตในแต่ละรอบจะใช้เวลานานขึ้นด้วย โดยเอนไซม์ตรีงที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทฤษฎีสามารถผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ 4 รอบ โดยมีอัตราการใช้ซับสเตรตเชิงปริมาณและอัตราการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เชิงปริมาณเท่ากับ 96.69 และ 135.96 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง และผลได้ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เท่ากับ 0.72 กรัมต่อกรัม ที่เวลา 2 ชั่วโมง ตามลำดับ

ลายมือชื่อผู้ผลิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Uangkan Thathong 2013: Fructooligasaccharide Production by Immobilized Enzyme.
Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of
Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Wirat Vanichsiratana, Ph.D.
91 pages.

Fructooligosaccharide is a type of carbohydrates, which is used as sweetener and prebiotics ingredients in food industries. Fructooligosaccharide is produced by hydrolysis and transfructosylation reaction of β -fructofuranosidase which hydrolyzed sucrose to glucose and fructose then moved fructosyl unit to bind at β -1,2 position of sucrose molecules under high concentration of sucrose. To improve fructooligosaccharide production, immobilized enzyme was used for cost reducing and reused in process. Taguchi method was applied to optimize the immobilization of β -fructofuranosidase by varying three factors at three levels. A L-9 (3^3) orthogonal array was used in the experimental design. As a result, the maximum activity of immobilized enzyme obtained was 29.71 U/ml from 3.0 % w/v sodium alginate, 150.0 U/ml of initial enzyme activity and 1.5 M calcium chloride. By statistical analysis, these factors were found to effect on immobilized enzyme activity significantly.

Repeated batch was carried out for fructooligosacchaide production with immobilized enzyme under Taguchi optimized conditions. The first cycles gave the highest concentration of fructooligosaccharide at 195.8 g/l (122.4 g/l 1-kestose, 67.7 g/l nystose, and 5.6 g/l 1^F-fructofuranosylnystose) at 4 h. The volumetric productivity, volumetric substrate uptake and yield of fructooligosaccharide were 96.69 g/l h, 135.06 g/l h and 0.72g/g at 2 h, respectively. The concentration of fructooligosaccharide decreased when increased reaction time in the other cycles. This immobilized enzyme can be used for 4 cycles in the production of fructooligosaccharide.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิรัตน์ วาณิชศรีรัตนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาช่วยเหลือในการวางแผนการวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประมุข กระจุกสุขสถิตย์ ประธานการสอบ และรองศาสตราจารย์ อรไท สุขเจริญ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องสาวและญาติมิตรที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุน ข้าพเจ้าเสมอมา ขอขอบคุณสมาชิกหน่วยวิจัยเทคโนโลยีการหมักทุก ๆ คนสำหรับคำแนะนำบรรยากาศที่ดีในการทำงาน และการให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ และเพื่อนทุกคนที่เป็นกำลังใจให้ รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ธุรการ ที่อำนวยความสะดวกในการเรียนและการทำวิจัยเป็นอย่างดีตลอดมา

เอื้องกาญจน์ ทาทอง
พฤษภาคม 2556

สารบัญ

หน้า

| | |
|-----------------------------------|-----|
| สารบัญ | (1) |
| สารบัญตาราง | (2) |
| สารบัญภาพ | (4) |
| คำนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 3 |
| การตรวจเอกสาร | 4 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 24 |
| อุปกรณ์ | 24 |
| วิธีการ | 25 |
| ผลและวิจารณ์ | 32 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ | 54 |
| สรุป | 54 |
| ข้อเสนอแนะ | 55 |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง | 56 |
| ภาคผนวก | 60 |
| ภาคผนวก ก ข้อมูลจากการทดลอง | 61 |
| ภาคผนวก ข การประมาณค่าพารามิเตอร์ | 73 |
| ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ | 80 |
| ประวัติการศึกษา และการทำงาน | 91 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 1 | ชนิดของจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง สภาวะการผลิตที่เหมาะสม และประสิทธิภาพของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ | 19 |
| 2 | ชนิดของจุลินทรีย์และเอนไซม์ตรึงที่เกี่ยวข้องกับ สภาวะการผลิตที่เหมาะสม และประสิทธิภาพของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ | 21 |
| 3 | ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองเพื่อการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส | 25 |
| 4 | Orthogonal array $L_9(3^3)$ ของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส | 26 |
| 5 | ผลของน้ำหนักเปียก ปริมาตรความหนาแน่น จำนวนเม็ด และขนาดของเอนไซม์ตรึงที่ได้จากวิธีการทะกุกิ | 33 |
| 6 | การตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส โดยออกแบบการทดลองแบบทะกุกิ | 36 |
| 7 | ค่าอัตราส่วน S/N ของกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่คำนวณจากข้อมูลการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง | 37 |
| 8 | การวิเคราะห์หือทธิพลของปัจจัยจากค่าอัตราส่วน S/N ที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส | 38 |
| 9 | การวิเคราะห์หือทธิพลของปัจจัยจากค่าเฉลี่ยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส | 40 |
| 10 | การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส พิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N | 43 |
| 11 | การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส พิจารณาจากค่าเฉลี่ย | 43 |
| 12 | สภาวะที่เหมาะสม และค่าคาดหวังของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่ประเมินได้ โดยพิจารณาจากค่า S/N | 45 |
| 13 | สภาวะที่เหมาะสม และค่าคาดหวังของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่ประเมินได้ โดยพิจารณาจากค่าเฉลี่ย | 45 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | | หน้า |
|---------------------|---|------|
| 14 | การยืนยันสถานะการทดลองที่เหมาะสมของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส | 46 |
| 15 | ประมาณค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสอิสระและตรึง | 48 |
| 16 | จลนพลศาสตร์ของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสแบบเบ็ดเสร็จ | 50 |
| 17 | จลนพลศาสตร์ของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสแบบเบ็ดเสร็จซ้ำ | 52 |
| ตารางผนวกที่ | | |
| ก1 | ค่าความเข้มข้นของซับสเตรตกับอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส | 65 |
| ก2 | ค่าความเข้มข้นของซับสเตรตกับอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส | 69 |
| ก3 | ผลการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์อิสระแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลasks | 70 |
| ก4 | การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์ตรึงแบบเบ็ดเสร็จซ้ำระดับฟลasks | 71 |
| ข1 | การวิเคราะห์ผลทางสถิติ | 74 |
| ข2 | การคำนวณค่าพารามิเตอร์สำหรับการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ | 79 |
| ค1 | การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส | 81 |
| ค2 | การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟรุกโทส กลูโคส ซูโครส 1-เคสโทส นีสโทส และ 1 ^F -ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส | 86 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 1 | โครงสร้างของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ | 4 |
| 2 | กลไกการเกิดฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบ Disproportionation | 10 |
| 3 | โครงสร้างของไซเตียมแอลจินต โดยแสดงลักษณะโมโนเมอร์ของไซเตียมแอลจินต | 12 |
| 4 | การเขียนกราฟ Lineweaver-Burk plot | 17 |
| 5 | กิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่คำนวณจากข้อมูลการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง | 35 |
| 6 | สภาวะที่เหมาะสมพิจารณาจากค่า S/N ที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส | 39 |
| 7 | สภาวะที่เหมาะสมพิจารณาจากค่าเฉลี่ย ที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส | 41 |
| 8 | การประมาณค่าคงที่ของปฏิกิริยาเอนไซม์ปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสโดยใช้กราฟแบบไลวีเวอร์-เบิร์กของเอนไซม์อิสระ | 47 |
| 9 | การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์อิสระแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ | 49 |
| 10 | การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์ตรีงแบบเบ็ดเสร็จจําระดับฟลาสก์ | 51 |
| 11 | เปรียบเทียบการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส | 53 |

สารบัญญภาพ (ต่อ)

| ภาพผนวกที่ | | หน้า |
|------------|--|------|
| ก1 | การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส 25 และ50 กรัมต่อลิตร | 62 |
| ก2 | การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส 75 และ100 กรัมต่อลิตร | 63 |
| ก3 | การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่ความเข้มข้นซูโครส 150 และ 200 กรัมต่อลิตร | 64 |
| ก4 | การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส 300 กรัมต่อลิตร | 65 |
| ก5 | การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส 25 และ50 กรัมต่อลิตร | 66 |
| ก6 | การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส 75 และ100 กรัมต่อลิตร | 67 |
| ก7 | การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส 150 และ200 กรัมต่อลิตร | 68 |
| ก8 | การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส 300 กรัมต่อลิตร | 69 |
| ค1 | กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์กลูโคสโดยวิธี DNS | 82 |
| ค2 | กราฟมาตรฐาน I^F -ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส | 87 |
| ค3 | กราฟมาตรฐานนีสโทส | 88 |
| ค4 | กราฟมาตรฐาน I -เคสโทส | 88 |
| ค5 | กราฟมาตรฐานซูโครส | 89 |
| ค6 | กราฟมาตรฐานกลูโคส | 89 |
| ค7 | กราฟมาตรฐานฟรุกโทส | 90 |

การผลิตฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์ตรึง

Fructooligosaccharide Production by Immobilized Enzyme

คำนำ

ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จัดเป็นคาร์โบไฮเดรต ที่มีคุณสมบัติเป็นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำ ซึ่งให้พลังงานครึ่งหนึ่งของพลังงานที่ได้จากน้ำตาลซูโครส ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ภายในร่างกายมนุษย์ ดังนั้นจึงเป็นน้ำตาลที่ให้พลังงานต่ำและไม่มีผลต่อระดับอินซูลินในเลือด ซึ่งเหมาะสำหรับใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักและผู้ป่วยโรคเบาหวาน นอกจากนี้ ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ยังส่งเสริมการเจริญของบีฟิโดแบคทีเรียซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ทำให้ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก (Sangeetha *et al.*, 2005) ปัจจุบันนิยมใช้ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นส่วนประกอบในอาหารเพื่อสุขภาพ (functional foods) เพิ่มมากขึ้น เช่นนมผง โยเกิร์ต และนมเปรี้ยว เป็นต้น

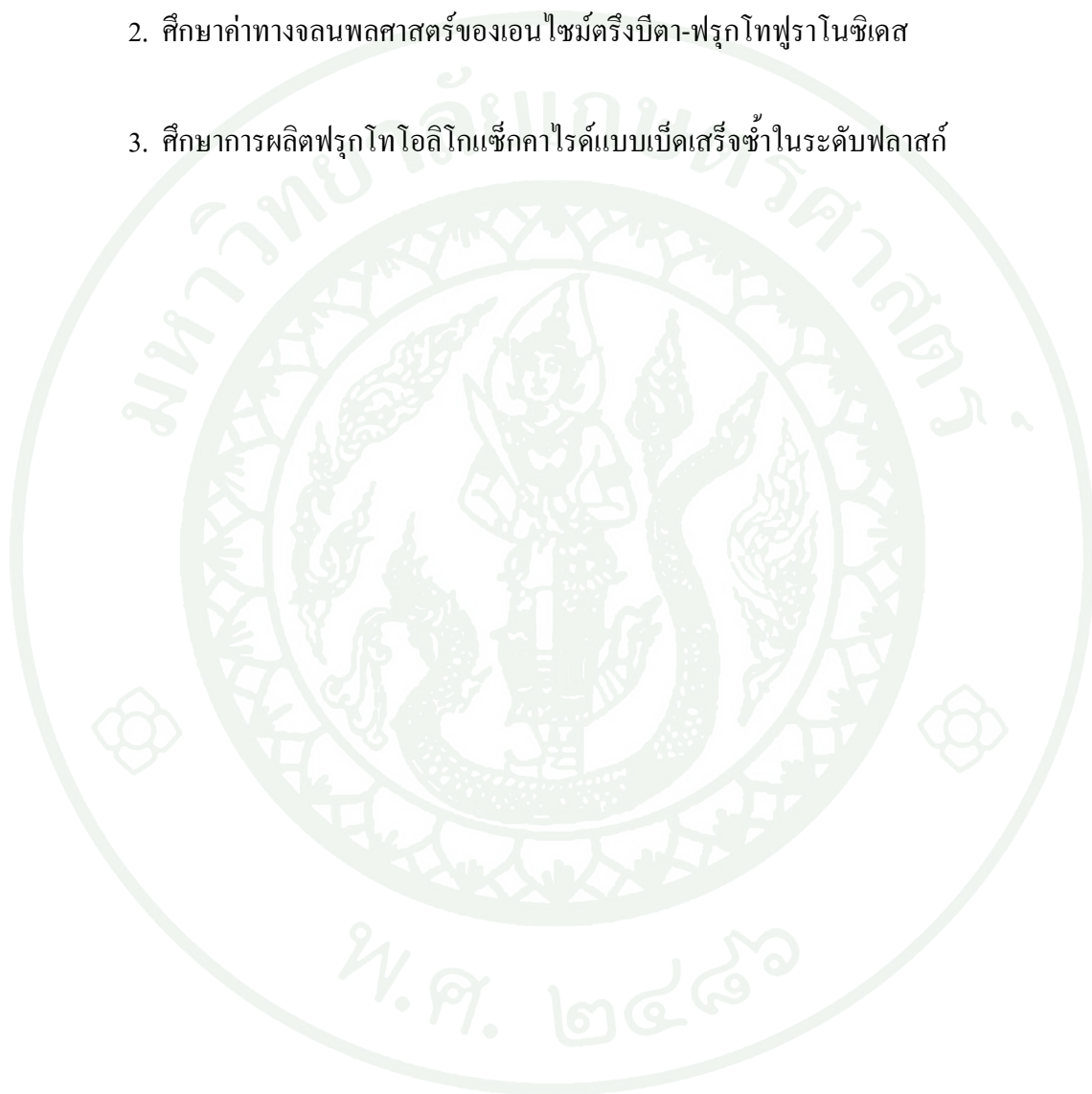
ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์มีลักษณะโครงสร้างเป็นโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลฟรุคโทส ที่จับกับน้ำตาลซูโครส (GF) ที่ตำแหน่งบีตา-2,1 (β -2,1) โดยฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ขนาด 3-5 โมเลกุล ประกอบด้วย 1-kestose (GF₂) นีสโทส (nystose; GF₃) และ 1^F-ฟรุคโทฟูราโนซิลนีสโทส (1^F-fructofuranosyl nystose; GF₄) (Yun, 1996) ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น แก่นตะวัน หน่อไม้ฝรั่ง ข้าวสาลี น้ำผึ้ง หอมหัวใหญ่ กระเทียม และกล้วย เป็นต้น (Yun, 1996; Sangeetha *et al.*, 2005) ซึ่งปริมาณฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่พบในพืชมีปริมาณน้อย ทำให้ไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม จึงมีการผลิตฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์บีตา-ฟรุคโทฟูราโนซิเดส (β -fructofuranosidase, β -FFase) ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Aspergillus sp.* *Aureobasidium sp.* *Arthrobacte sp.* และ *Fusarium sp.* เป็นต้น (Yun 1996; Sangeetha *et al.*, 2005) โดยเอนไซม์บีตา-ฟรุคโทฟูราโนซิเดสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายซูโครสให้เป็นกลูโคสและฟรุคโทส และทำการย้ายฟรุคโทสไปต่อกับซูโครสเกิดเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆเมื่อมีความเข้มข้นของซูโครสสูงๆอย่างไรก็ตาม วิธีการเตรียมเอนไซม์เพื่อนำมาใช้ในการผลิตฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์มีต้นทุนสูง จึงมีการพัฒนากรรมวิธีการผลิตฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ตรึงแทน ซึ่งการประยุกต์ใช้เอนไซม์ตรึงในกระบวนการ

ผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถนำเอนไซม์ตรีงกลับมาจากหมักเหียนใช้ใหม่ได้ และสามารถแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่าย (Csanádi and Sisak, 2006) ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์ตรีงมาใช้ในการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์อย่างแพร่หลาย โดยใช้ตัวพุงต่างๆ กัน เช่น การตรีงเอนไซม์ Pectinex Ultra SP-L ด้วย amberlite IRA 900 Cl anion exchange resin, Eupergit C และ Sepabeads® EC และการตรีงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ด้วยอะคริลิก เป็นต้น (Csanádi and Sisak, 2006; Tanriseven and Aslan, 2005; Onderkovà et al., 2007)

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรีงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส โดยปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेट กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ ที่ทำการวางแผนการทดลองด้วยวิธีทฤษฎี และพัฒนาการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบเบ็ดเสร็จซ้ำในระดับฟลอสก์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเอ็นไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสด้วยวิธีทะกุจิ
2. ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอ็นไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส
3. ศึกษาการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบเบ็ดเสร็จซ้ำในระดับฟลasks

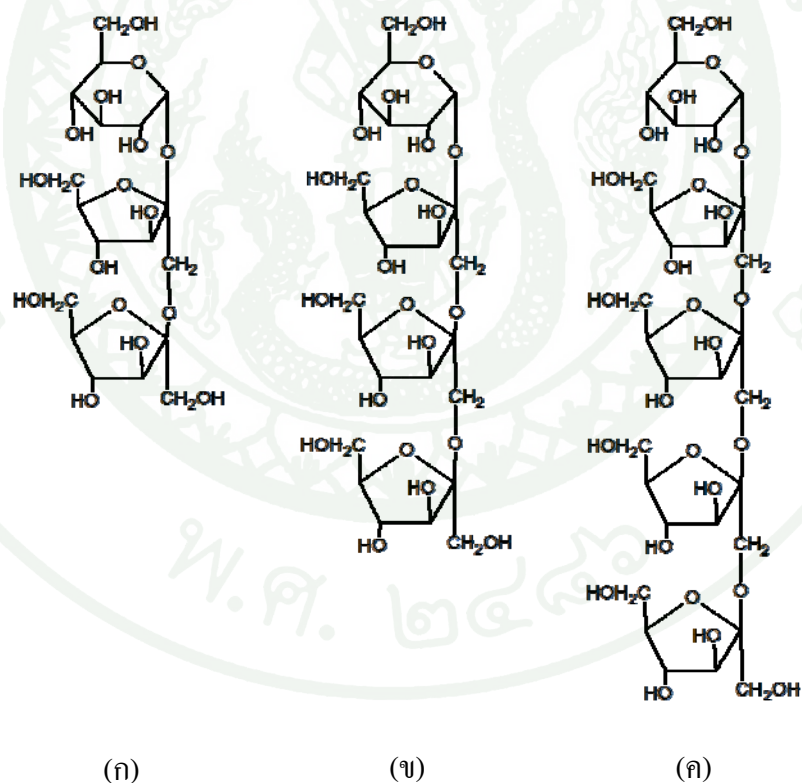


การตรวจเอกสาร

1. ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

1.1 ลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างของฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นชื่อสามัญของโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลฟรุคโทสและมีชื่ออื่นๆตามที่คณะนักวิจัยบางกลุ่มใช้เรียก เช่น ฟรุคแทน (fructan) และกลูโคฟรุคโทแซน (glucofructosan) เป็นต้นโดยโอลิโกเมอร์ขนาด 3-5 โมเลกุล ประกอบด้วย 1-kestose (1-kestose; GF₂) นีสโทส (nystose; GF₃) และ 1^F-ฟรุคโทฟูราโนซิลนีสโทส (1^F-fructofuranosyl nystose; GF₄) ดังแสดงโครงสร้างในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ 1-kestose (ก) นีสโทส (ข) และ 1^F-ฟรุคโทฟูราโนซิลนีสโทส (ค)

ที่มา: Hussein *et al.* (1998)

ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์มีโครงสร้างแบบ 1^F (1- β -D-fructofuranosyl) $_n$ -sucrose; เขียนเป็นโครงสร้างทั่วไป คือ GF_n โดยที่ n แสดงถึงดีกรีโพลิเมอไรเซชัน (degree of polymerization) ซึ่งหมายถึงจำนวนฟรุกโทสที่เรียงต่อกันรวมทั้งโพลีฟรุกแทน (polyfructans) และ โอลิโกฟรุกโทไซด์ (oligofructosides) ที่มีตำแหน่งการเชื่อมต่อที่แตกต่างกัน เช่น นีโอเคสโทส (neokestose; 6^G (1- β -D-fructofuranosyl sucrose)) 6-เคสโทส (6-kestose; 6^F (1- β -D-fructofuranosyl sucrose)) และอนุพันธ์ต่างๆ เป็นต้น (Yun, 1996)

1.2หน้าที่ทางสรีระวิทยาของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

1.2.1 การไม่ย่อยสลายของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในร่างกาย

เอนไซม์ในลำไส้เล็กจะไม่สามารถย่อยฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ จากรายงานของ Oku and Nakamura (2002) เมื่อนำ 1-เคสโทส (GF_2) และ นีสโทส (GF_3) มาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของลำไส้เล็กของหนูทดลอง พบว่าฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ไม่ถูกย่อยสลายในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ได้ฉีดฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ทำการติดฉลากคาร์บอน 14 (^{14}C -fructooligosaccharide) เข้าไปในตัวหนูทดลอง พบว่าฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ทำการติดฉลากคาร์บอน 14 ถูกขับออกมาทางปัสสาวะของหนูทดลองโดยไม่ถูกย่อยสลายอีกทั้งเมื่อทดลองให้หนูกิน ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ติดฉลากคาร์บอน 14 พบว่า ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์นั้นไม่ถูกย่อยหรือดูดซึมจากเอนไซม์ในร่างกายของหนูทดลอง

ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์นั้นไม่ถูกย่อยและดูดซึมที่ลำไส้เล็ก แต่จะเกิดการหมักโดยบีฟิโดแบคทีเรียและแลคโตบาซิลไลในลำไส้ใหญ่ ในกระบวนการหมักนี้จะเกิดการดัดไขมันสายสั้นออกมาเช่น กรดแอซีติก กรดบิวทริก และกรดโพรพิโอนิก อีกทั้งยังเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ มีเทน และไฮโดรเจนออกมาเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการหมัก กรดไขมันสายสั้นนี้จะถูกดูดซึมที่ลำไส้ใหญ่ และเกิดการเมแทบอลิซึมให้เป็นพลังงาน (สุภาพร, 2544) ศึกษาถึงพลังงานที่ได้จากการหมักฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยบีฟิโดแบคทีเรียโดยคำนวณพลังงานจากกรดไขมันสายสั้นที่เกิดจากการหมักฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (GF_n , $n=2-4$) ทางทฤษฎีได้เท่ากับ 2.7 กิโลแคลอรีต่อกรัมฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ เมื่อเกิดการหมักที่สมบูรณ์ และเชื่อว่าร่างกายสามารถนำกรดไขมันสายสั้นนี้ไปใช้ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น ขึ้นกับประสิทธิภาพของการเปลี่ยนกรดไขมันสายสั้นไปเป็นพลังงาน ซึ่งประสิทธิภาพการเปลี่ยนกรดไขมันสายสั้นเป็น

พลังงานนี้คิดเป็น 69 เปอร์เซ็นต์ของพลังงานทางทฤษฎี ดังนั้นเมื่อเกิดการหมักฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์อย่างสมบูรณ์ที่ลำไส้ใหญ่จะให้พลังงานประมาณ 2 กิโลแคลอรีต่อกรัมฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งคิดเป็นครึ่งหนึ่งของพลังงานที่ได้จากน้ำตาลซูโครส ที่ให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรีต่อกรัมซูโครส ดังนั้นฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จึงเป็นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำ เหมาะสำหรับใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก

1.2.2 ผลของการบริโภคฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อระดับอินซูลินในเลือด

Sangeetha (2005) รายงานว่าการบริโภคฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในปริมาณ 20 กรัมต่อวัน ไม่มีผลต่อการทำงานของอินซูลินของตับอ่อนเนื่องจากน้ำตาลฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ไม่ถูกเอนไซม์ในร่างกายนย่อยเป็นน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ ที่ลำไส้เล็กและไม่ถูกดูดซึม จึงไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งเหมาะที่จะใช้ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นส่วนประกอบในอาหารของผู้ป่วยโรคเบาหวาน

1.2.3 การบริโภคฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ส่งผลกระทบต่อกรดไขมันในเลือด

Scholz-Ahrens and Schrezenmeir (2007) รายงานว่าเมื่อบริโภคฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้าไปจะทำให้เกิดการหมักขึ้นในลำไส้เล็ก ส่งผลกระทบต่อกรดไขมันและกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยจะเกิดการดูดซึมของแร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส รวมทั้งธาตุอาหารต่างๆ เช่น ทองแดง (copper) เหล็ก (iron) และสังกะสี (zinc) เป็นต้น ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้จะถูกดูดซึมและไปสะสมอยู่ที่กระดูก ส่งผลให้กระดูกมีสุขภาพแข็งแรง

1.2.4 การส่งเสริมการเติบโตของจุลินทรีย์สุขภาพในลำไส้

Sangeetha (2005) ทำการศึกษาเมแทบอลิซึมของ ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ จากชิโครี (chicory) โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มบิฟิโดแบคทีเรียที่เรีย คือ *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* และ *B. angulatum* พบว่า ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จะไปส่งเสริมการเจริญของทั้ง 3 สายพันธุ์ และมีการผลิตมวลเพิ่มขึ้นโดย *B. infantis* มีการผลิตมวลได้สูงสุด ซึ่งแสดงว่าฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากชิโครีสามารถเป็นพรีไบโอติกได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์สุขภาพในลำไส้

บีฟิโดแบคทีเรียจัดเป็นโพรไบโอติก คือ เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยบีฟิโดแบคทีเรียจะใช้ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นแหล่งคาร์บอนแล้วผลิตกรดไขมันสายสั้นและกรดแลคติก โดยกรดไขมันสายสั้นได้แก่ กรดแอสिटิก กรดบิวทิริก และ กรดโพรพิ-โอนิก ซึ่งกรดที่สร้างขึ้นนี้จะไปมีผลยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เช่น *Samonella* sp. *Clostridium* sp. และ *E. coli* เป็นต้น นอกจากนี้ *B. bifidum* ยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เช่น *Shigella* *olysentia typhosa* *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* เป็นต้นเพื่อควบคุมให้จุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่เกิดความสมดุล (Ziemer and Gibson, 1998)

1.3 ความปลอดภัยในการบริโภคฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

สุภาพร (2544) ได้ทำการทดสอบผลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยทดสอบผลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Ames test) ทดสอบการเกิดการกลายพันธุ์ในยีนของสัตว์ และการทดสอบผลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อการเรียงลำดับเบสในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA scheduled synthesis assay) พบว่าฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ไม่มีผลทางด้านพันธุกรรมต่อทั้งจุลินทรีย์และสัตว์ อีกทั้งได้ทำการวิเคราะห์ความเป็นพิษเรื้อรังของการบริโภคฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ และศึกษาการก่อให้เกิดมะเร็งในหนูทดลอง พบว่าเมื่อหนูบริโภคฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในปริมาณที่สูงถึง 2.17 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ต่อวันเป็นเวลานาน พบว่าไม่มีผลต่อการเกิดความเป็นพิษเรื้อรัง (no-observed-effect-level, NOEL) และไม่มีผลต่อการเกิดมะเร็งในหนูทดลองอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะให้ผลที่ไม่ดีคือลักษณะอุจจาระของหนูทดลองที่ได้จะมีลักษณะเหลวและหนูเกิดการท้องร่วงเมื่อบริโภคฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในปริมาณมาก

Oku and Nakamura (2002) รายงานปริมาณฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่บริโภคได้ต่อวันของคนญี่ปุ่น พบว่าฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณมากที่สุดที่บริโภคได้โดยไม่เกิดท้องร่วงในผู้ใหญ่เพศชายเท่ากับ 0.3 กรัมต่อน้ำหนักต่อ 1 กิโลกรัมต่อวัน และในผู้ใหญ่เพศหญิงเท่ากับ 0.4 กรัมต่อน้ำหนักต่อ 1 กิโลกรัมต่อวัน หรือคิดโดยเฉลี่ยการบริโภคฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์มากที่สุดโดยไม่เกิดท้องร่วงในเพศชายคือ 44 กรัมต่อวัน และเพศหญิง 49 กรัมต่อวัน และปริมาณฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมที่ควรบริโภคต่อวันเท่ากับ 3 กรัม

2. เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

2.1 ชนิดและแหล่งของเอนไซม์

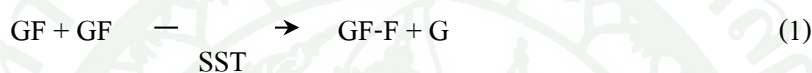
เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เอนไซม์ บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส (β -fructofuranosidase, β -FFase) (EC. 3.2.1.26) และเอนไซม์ฟรุกโทซิลทรานส์เฟอเรส (fructosyltransferase, FTase) (EC. 2.4.1.9) โดยเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลสที่มีชื่อสามัญ คือ แซ็กคาเรส (saccharase) และอินเวอร์เทส (invertase) เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสจะเข้าไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ซูโครสได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นกลูโคสและฟรุกโทส และเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่ฟรุกโทส โดยจะนำฟรุกโทสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ซูโครสโมเลกุลหนึ่ง เชื่อมต่อที่ตำแหน่งบีตา 2,1 ของซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่ง ซึ่งเป็นปฏิกิริยาข้างเคียงที่เกิดขึ้นเมื่อซูโครสมีความเข้มข้นสูง ส่วนเอนไซม์ฟรุกโทซิลทรานส์เฟอเรสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มทรานส์เฟอเรส ซึ่งเอนไซม์จะย้ายโมเลกุลของฟรุกโทสในซูโครสโมเลกุลหนึ่งไปเชื่อมต่อที่ตำแหน่ง บีตา 2,1 ของซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่ง เกิดเป็นฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์และได้กลูโคสออกมาเป็นผลพลอยได้ (Yun, 1996)

เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์มาจาก 2 แหล่ง คือ พืช เช่น หน่อไม้ฝรั่ง บัตเตอร์เบรค หอมหัวใหญ่ แก่นตะวัน ข้าวสาลี น้ำผึ้ง กระเทียม และกล้วย เป็นต้น (Yun, 1996; Sangeetha *et al.*, 2005) แต่เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้จากพืชมีปริมาณน้อย ไม่สามารถผลิตเอนไซม์จากพืชนั้นๆ ได้ตลอดจากข้อจำกัดของฤดูกาล และไม่คุ้มต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงได้มีการผลิตเอนไซม์จากแหล่งของจุลินทรีย์ เช่น *Aspergillus* sp. *Aureobasidium* sp. *Arthrobacter* sp. *Fusarium* sp. *Bacillus macerans* EG-6 และ *Lactobacillus reutri* เป็นต้น (Yun, 1996; Sangeetha *et al.*, 2005)

2.2 กลไกการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์นั้นผลิตได้จากทั้งพืชและจุลินทรีย์ ซึ่งกลไกการทำงานของเอนไซม์นั้นจะขึ้นกับแหล่งที่มาของเอนไซม์ ในกระบวนการการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในพืชนั้นอาจมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์มากกว่าหนึ่งชนิด แต่การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์จะใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว

ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่สร้างขึ้นในพืชเพื่อเก็บไว้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตสะสม โดยนำฟรุคโทสมาต่อกันเป็นโมเลกุลยาวๆ ตัวอย่างเช่น การผลิตฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในแก่นตะวัน (Jerusalem artichokes) จะมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 2 ชนิดคือ เอนไซม์ซูโครส : ซูโครส 1-ฟรุคโทซิลทรานส์เฟอเรส (sucrose : sucrose 1- fructosyltransferase, SST) และเอนไซม์ บีตาฟรุคแทน : ฟรุคแทนบีตาฟรุคโทซิลทรานส์เฟอเรส (β , (2 \rightarrow 1) fructan : fructan β , (2 \rightarrow 1) fructosyltransferase, FFT) โดยเอนไซม์ SST จะทำการไฮโดรไลซ์ซูโครสไปเป็นกลูโคสและฟรุคโทส หลังจากนั้น FFT จะทำการต่อหน่วยของฟรุคโทสเข้าที่ตำแหน่งบีตา 2,1 ของซูโครสได้เป็นไทรเมอร์หรือพอลิเมอร์ ดังแสดงสมการปฏิกิริยาที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

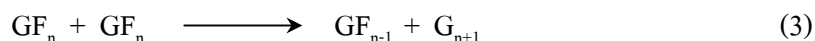


n = จำนวนฟรุคโทสของตัวให้

m = จำนวนฟรุคโทสของตัวรับ

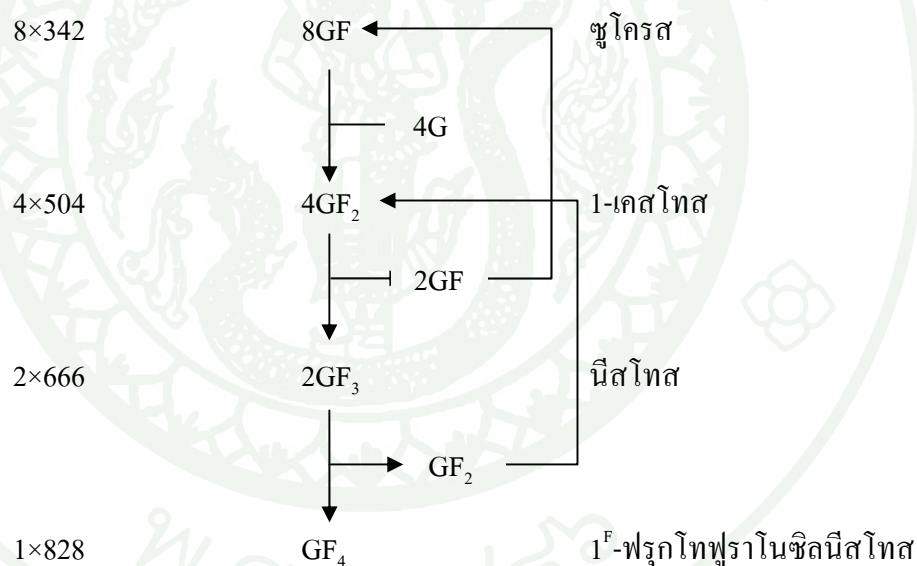
สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์นั้น พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราหลายชนิดในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซูโครสเป็นส่วนประกอบ จะมีการสร้างฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เกิดขึ้น คาดว่าฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่สร้างขึ้นในกระบวนการหมักเพื่อกำจัดฟรุคโทสอิสระที่มีปริมาณเท่ากับ กลูโคสที่เกิดจากการไฮโดรไลซ์ซูโครส เพื่อที่จุลินทรีย์สามารถใช้กลูโคสซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่ใช้อย่างง่ายกว่าในการเจริญเติบโตก่อน ซึ่งจากการทดลองเมื่อใช้ฟรุคโทสเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับกลูโคส พบว่าฟรุคโทสให้การเติบโตลดลงหรือไม่ส่งเสริมการเติบโตของจุลินทรีย์เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่มีเฉพาะกลูโคส ดังนั้นจุลินทรีย์จึงมีกลไกที่จะกำจัดฟรุคโทสอิสระโดยการนำมาต่อกันเป็นสายยาว และใช้กลูโคสในการเติบโตก่อน หรืออีกกรณีหนึ่งฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่สร้างขึ้นนั้นเพื่อเก็บไว้เป็นคาร์โบไฮเดรตสะสม สำหรับนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารเมื่อกลูโคสในอาหารหมด (Yun, 1996)

Yun (1996) ได้เสนอแบบจำลองการทำงานของเอนไซม์ฟรุคโทซิลทรานส์เฟอเรส จากเชื้อรา *Aspergillus pullulan* และ *A. niger* ดังนี้



นเท่ากับ 1-3

การทำงานของเอนไซม์จากเชื้อรา *ซูโครส* 1 โมเลกุลจะทำหน้าที่เป็นตัวให้ (donor) และอีกหนึ่งโมเลกุลจะทำหน้าที่เป็นตัวรับ (acceptor) โดยจะทำการย้ายหมู่ฟรุกโทสของตัวให้ไปยังตำแหน่งรับ (acceptor site) ของตัวรับ เกิดเป็น 1-เคสโทส (GF_2) นีสโทส (GF_3) และ 1^F -ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส (GF_4) ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ที่สามารถสร้าง 1^F -ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส (GF_4) ได้ นั้น ตำแหน่งรับ (acceptor site) จะต้องมีขนาดใหญ่เพียงพอ และ 1^F -ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส (GF_4) เป็น โอลิโกเมอร์ของฟรุกโทสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดที่เกิดจากการสังเคราะห์ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากซูโครสที่เกิดขึ้น นอกจากนั้นยังได้เสนอแผนภาพแสดงโครงข่ายการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบ Disproportionation ดังแสดงไว้ในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กลไกการเกิดฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบ Disproportionation

(G, F, GF , GF_2 , GF_3 , GF_4 หมายถึง กลูโคสฟรุกโทส ซูโครส 1-เคสโทส นีสโทส และ 1^F -ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส ตามลำดับ)

ที่มา: Yun (1996)

3. การตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสด้วยแคลเซียมแอลจิเนต

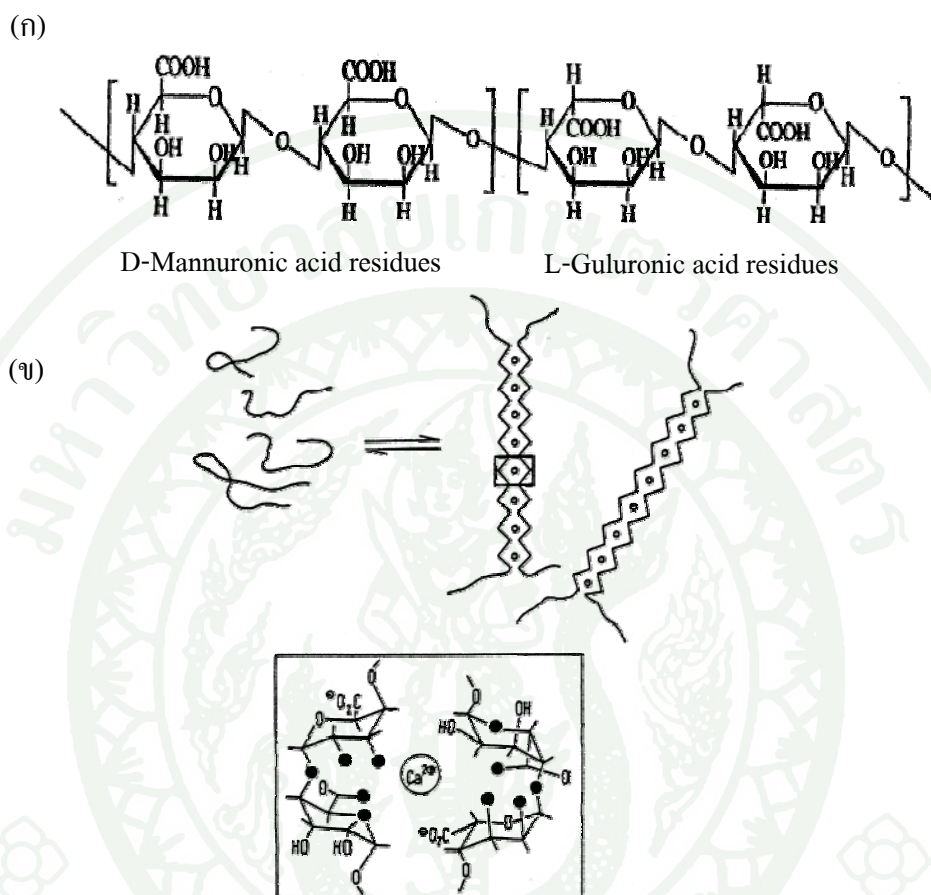
เนื่องจากเอนไซม์อิสระมีความไม่คงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอช และยังใช้ได้เพียงครั้งเดียว ไม่สามารถหมุนเวียนมาใช้ได้ ดังนั้นการนำเอนไซม์ตรึงมาใช้จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการแก้ปัญหาที่กล่าวมา โดยเอนไซม์ตรึงมีความคงตัวที่มากกว่าและสามารถแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่ายกว่า (ปราณี, 2535) สำหรับการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้มีการนำเอนไซม์ตรึงมาประยุกต์ใช้เช่นกัน อาทิ การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ตัวพวยแบบแลกเปลี่ยนประจุหรือตัวพวยที่เป็นพอลิเมอร์ (Csanádi and Sisak 2006; Ghazi *et al.*, 2005; Tariseven and Aslan 2005; Onderková *et al.*, 2007) แต่เนื่องจากตัวพวยที่กล่าวมานั้นมีราคาแพง และมีขั้นตอนการทำที่ยุ่งยาก ดังนั้นการตรึงเอนไซม์โดยใช้โซเดียมแอลจิเนตเป็นตัวพวยจึงเป็นอีกหนึ่งวิธีที่จะนำมาใช้ในการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย ไม่มีความเป็นพิษ และมีราคาไม่แพง

3.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของโซเดียมแอลจิเนต

โซเดียมแอลจิเนตเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ธรรมชาติที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล (kelp) มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 32,000-200,000 ดาลตัน มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นโคพอลิเมอร์ที่เกิดจากการจับกันระหว่าง D-manuronic acid (M) กับ L-glucuronic acid (G) โดยอาศัยพันธะ 1,4-linkage ซึ่งในธรรมชาติอาจพบโซเดียมแอลจิเนต 3 ลักษณะ คือ D-manuronic acid (M) จับกันเอง หรือ D-manuronic acid (M) จับอยู่กับ L-glucuronic acid (G) หรือ L-glucuronic acid (G) จับกันเอง โดยโครงสร้างในลักษณะที่ 3 จะมีความแข็งแรงมากที่สุดเมื่อเทียบกับโครงสร้างแบบอื่นๆ และมีอัตราส่วนของ M และ G แตกต่างกันไปตามแหล่งชนิดของสาหร่ายสีน้ำตาล ซึ่งส่งผลให้โซเดียมแอลจิเนตมีคุณสมบัติแตกต่างกันด้วย

โซเดียมแอลจิเนตจะอยู่ในรูปของเกลือ ซึ่งอาจเป็นเกลือโซเดียมหรือโพแทสเซียม โซเดียมแอลจิเนตสามารถเกิดเป็นเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นไดวาเลนต์แคทไอออน เช่น Ca^{2+} Sr^{2+} และ Ba^{2+} ซึ่งสามารถจับกันได้ดีโดยเข้าไปแทนที่ H_3O^+ ภายในโครงสร้างของโซเดียมแอลจิเนตที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ COO^- เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า egg box ขณะที่สารละลายที่เป็นโมโนวาเลนต์และ Mg^{2+} ไม่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นเจล โดยที่ความแข็งแรงของเจลขึ้นอยู่กับความแรงของประจุที่เพิ่มขึ้น ส่วนแคทไอออนอื่นๆ เช่น Pb^{2+} Cu^{2+} Cd^{2+} Co^{2+} Ni^{2+} Zn^{2+} และ Mn^{2+}

เป็นต้น สามารถเกิดเป็นเจลได้ แต่นำไปใช้ได้อย่างจำกัดเนื่องจากมีความเป็นพิษ (Wayne and Siow, 1998)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของไซเดียมแอลจินेट โดยแสดงลักษณะโมโนเมอร์ของไซเดียมแอลจินेट (ก) และการจับกันเป็นสายของไซเดียมแอลจินेट (ข)

ที่มา: Wayne and Siow, (1998)

ข้อบกพร่องในการตรึงเอนไซม์ด้วยไซเดียมแอลจินेट คือ เม็ดเจลที่ตรึงจะละลายในสารที่มีไอออนหรือโมเลกุลที่สามารถจับกับ Ca^{2+} ได้ตัวอย่างเช่น ฟอสเฟต ซิเตรต และเอทิลีนไดเอมีนเทตระแอะซีติก(ethylene-diamine-tetra-acetic acid, EDTA) เป็นต้น ในกรณีที่ความเข้มข้นของไอออนเหล่านี้ไม่สูงมาก จะทำให้เม็ดเจลคงรูปอยู่ได้ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} หรือใช้สารประกอบพอลิเอมีน (เช่น พอลิเอทิลีนอิมิน พอลิโพรพิลีนอิมิน) และตามด้วยเชื่อมไขว้โดยใช้กลูทารัลดีไฮด์(ภาวิณี, 2537)

3.2 การตรึงเอนไซม์ด้วยแคลเซียมโซเดียมแอลจิเนต

การตรึงเอนไซม์ด้วยแคลเซียมโซเดียมแอลจิเนตโดยทั่วไปมีอยู่ 2 วิธี คือ

3.2.1 วิธีการห่อหุ้มด้วยแคปซูลขนาดเล็ก (encapsulation)

วิธีนี้เป็นการห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในแคปซูลขนาดเล็กที่เตรียมได้จากพอลิเมอร์ที่เป็นสารอินทรีย์ ซึ่งพอลิเมอร์นี้มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน ที่สามารถปล่อยให้ซับสเตรตและผลิตภัณฑ์ผ่านได้ ข้อดีของวิธีนี้คือ มีพื้นที่ผิวมากเพื่อให้ซับสเตรตสัมผัสกับเอนไซม์ได้ และสามารถตรึงเอนไซม์ได้หลายชนิดพร้อมๆ กัน ในขั้นตอนเดียว โดยไม่จำกัดว่าเอนไซม์นั้นจะผ่านการตรึงด้วยวิธีอื่นมาก่อนหรือไม่ ข้อบกพร่องของวิธีการนี้คือ ไม่สามารถใช้สำหรับกรณีที่ใช้ซับสเตรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เอนไซม์มีการสูญเสียกิจกรรมในระหว่างกระบวนการตรึงและเอนไซม์อาจเข้าไปอยู่ในผนังของเยื่อพอลิเมอร์ได้

3.2.2 วิธีการห่อหุ้มภายในเจล (entrapment)

วิธีนี้เป็นการทำให้โมเลกุลของเอนไซม์เข้าไปอยู่ในช่องตาข่ายของพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งตาข่ายพอลิเมอร์นี้เตรียมได้จากสารเริ่มต้น (precursor) ที่เป็นโมโนเมอร์ โอลิโกเมอร์หรือพอลิเมอร์ แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการละลายด้วยการเปลี่ยนตัวแปรของการละลาย ซึ่งได้แก่ ตัวทำละลาย อุณหภูมิ ความเข้มข้นของไอออน และพีเอช เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมไขว้

3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

Cheng *et al.* (2005) ได้ทำการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Aspergillus japonicus* บนไคโตแซน (chitosan) กับสารเชื่อมไขว้ ซึ่งการทดลองนี้ได้ทำการเปรียบเทียบกันระหว่างสารเชื่อมไขว้ 2 ชนิด คือ กลูทาร์ลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และทริสไฮดรอกซีเมทิลฟอสไฟน์ (tris (hydroxy methyl) phosphine หรือ THP) โดยดูจากความคงตัวของอุณหภูมิ ความคงตัวของกิจกรรมเอนไซม์ต่อรอบของการผลิตและผลได้ของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ เมื่อดูจากความคงตัวของอุณหภูมิพบว่า การตรึงเอนไซม์ด้วยไคโตแซนและใช้ THP เป็นสาร

เชื่อมไขว้มีความคงตัวของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิสูงถึง 78 เฟอร์เซนต์ และยังคงกิจกรรมในการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ถึง 75 เฟอร์เซนต์ เป็นเวลานานถึง 11 รอบ (11 วัน)เมื่อเปรียบเทียบกับการตรึงเอนไซม์โดยใช้กลูทาร์ดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไขว้ ส่วนการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ใช้เอนไซม์ตรึงกับ THP ให้ผลได้ของการผลิตเท่ากับ 48 เฟอร์เซนต์ ซึ่งน้อยกว่าผลได้ของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์อิสระที่เท่ากับ 58 เฟอร์เซนต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 เฟอร์เซนต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Ghazi *et al.* (2005) ได้ศึกษาถึงการตรึงเอนไซม์ทางการค้า (Pectinex[®] Ultra SP-L) โดยใช้วิธีการตรึงแบบโควาเลนต์บนพอลิเมอร์พอลิเมทาอะคริเลท-เบส (Sepabeads[®] EC) โดยเปรียบเทียบตัวพองที่มีขนาดรูพรุน (pore volume และ pore size) แตกต่างกัน ได้แก่ Sepabeads EC-EP 3 และ Sepabeads EC-EP 5 เป็นต้น โดยทำการศึกษาค่าพารามิเตอร์ที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ ได้แก่ ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ พีเอช ปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณของตัวพอง ซึ่งพบว่าการตรึงเอนไซม์บนตัวพองไม่ต้องการการเติมเกลือหรือบัฟเฟอร์เพิ่ม และ Sepabeads EC-EP 5 ที่มีขนาดปริมาตรเท่ากับ (1.67 cm³/g) และขนาดรูพรุนเท่ากับ (800 nm) เป็นตัวพองที่มีประสิทธิภาพดีกว่า Sepabeads EC-EP 3 จากการทำงานให้ผลได้ของเอนไซม์เท่ากับ 25.9 หน่วยต่อกรัมตัวพอง และเมื่อนำไปผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบเบ็ดเสร็จโดยใช้ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 630 กรัมต่อลิตร เป็นเวลาผลิต 36 ชั่วโมงสามารถผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 387 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 61.5 เฟอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ของปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา

Tarisevend Aslan (2005) ได้ศึกษาถึงการตรึงเอนไซม์ทางการค้า (Pectinex[®] Ultra SP-L) โดยใช้วิธีการตรึงแบบโควาเลนต์บน Eupergit C[®] ที่เป็นตัวพองเอนไซม์ที่โครงสร้างรูพรุนของเม็ดบีดส์มีขนาดแมคโครพอร์ จากการตรึงเอนไซม์โดยวิธีนี้สามารถให้กิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 96 เฟอร์เซนต์และสามารถคงกิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 20 รอบของการการทำปฏิกิริยา โดยค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 5.5-6.5 และ 65 องศาเซลเซียสและมีความคงตัวของพีเอชและอุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์อิสระ จากนั้นทำการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นของซัคเรต 60 เฟอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้เท่ากับ 57 เฟอร์เซนต์ของปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา และกิจกรรมเอนไซม์ตรึงยังมีความคงตัวได้ถึง 20 วัน

Csanádi and Sisak (2006) ได้ศึกษาถึงการตรึงเอนไซม์ทางการค้า (Pectinex[®] Ultra SP-L) โดยใช้วิธีการตรึงแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึง

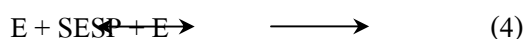
จากค่า biocatalyse/matrix ratio ซึ่งมีค่าเท่ากับ 16.7 กรัมของสารละลายเอนไซม์ต่อตัวพุงโดยแปรผันความเข้มข้นของตัวเชื่อมขวาง (cross linking agent) ได้แก่ กลูทาร์ลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของสารที่ใช้ในการเชื่อมขวาง ซึ่งความเข้มข้นของตัวเชื่อมขวางที่เหมาะสมเท่ากับ 0.125 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของสารที่ใช้ในการเชื่อมขวางเท่ากับ 15 นาที ส่วนพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์เท่ากับ 5.6 และ 53 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ตรึงยังมีความคงตัวต่อกิจกรรมเอนไซม์ได้ถึง 12 รอบและผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับฟลาสก์ได้เท่ากับ 85 กรัมต่อลิตรที่เวลา 9 ชั่วโมง

Onderkovàet al. (2007) ได้ทำการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่ผลิตได้จากยีสต์ *Aureobasidium pullulans* แบบโควาเลนต์โดยใช้ตัวพุงเป็น โคพอลิเมอร์ระหว่าง บิวทิว อะคริเลท (butyl acrylate) และ เอธิลีน ไกลคอล ไดเมทาอะคริเลท (ethylene glycol dimethacrylate) กับกลูทาร์ลดีไฮด์ (glutaraldehyde) พบว่าที่พีเอช 6.0 และความเข้มข้นของเอนไซม์เริ่มต้นเท่ากับ 8.5 กรัมต่อลิตรของตัวพุง จากนั้นทำการศึกษาผลของพีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นของซูโครสต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ตรึงและเอนไซม์อิสระมีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นของซูโครส 700 กรัมต่อลิตร และเอนไซม์ตรึงและเอนไซม์อิสระมีความคงตัวต่อพีเอชที่ 4.8 และ 4.4 ตามลำดับ ซึ่งสภาวะดังกล่าวจะนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในคอลลิมน์แบบแพ็คเกจต่อไป

5. จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เป็นการศึกษาการพัฒนาสมการทางคณิตศาสตร์เพื่อใช้ในการอธิบายอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เพื่อใช้ในการทำนายกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ Michaelis และMenten ได้พัฒนาสมการจลนพลศาสตร์ของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อย่างง่ายคือ Michaelis–Menten kinetics หรือ saturation kinetics โดยอาศัยข้อมูลจากผลการทดลองของปฏิกิริยาของเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ที่มีปริมาตรของของเหลวคงที่และกำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์และซับสเตรตจลนพลศาสตร์เอนไซม์แบบsaturation kinetics แสดงกลไกของปฏิกิริยาได้ดังสมการที่ 4 กล่าวคือปฏิกิริยาขั้นตอนแรกเอนไซม์ (E) จะรวมตัวกับซับสเตรต (S) เกิดเป็นเอนไซม์-ซับสเตรตเชิงซ้อน (Enzyme substrate complex, ES) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับได้ปฏิกิริยาขั้นตอนที่สองเป็นการสลายตัวของเอนไซม์-ซับสเตรตเชิงซ้อน (ES) ได้เป็นผลิตภัณฑ์ (P)และ

เอนไซม์ (E) โดยสมมติฐานของการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้กำหนดให้การเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สองเป็นขั้นตอนจำกัดของปฏิกิริยา (rate limiting step)



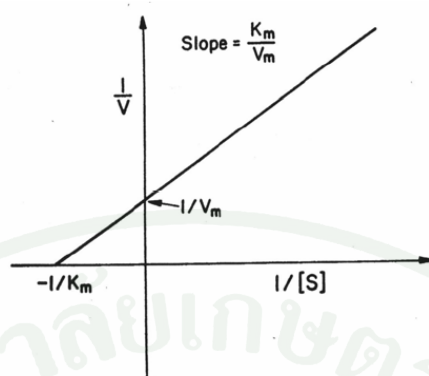
โดยอาศัยหลักการของกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังสมการที่ 4 ได้พัฒนาสมการทางคณิตศาสตร์จากสมการจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์-ซับสเตรตเชิงซ้อนและผลิตภัณฑ์และสมการสมดุลมวลของเอนไซม์ได้สมการสำเร็จรูปที่เรียกว่า Michaelis-Menten equation แสดงดังสมการที่ 5 ซึ่งสามารถใช้ในการอธิบายถึงจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์ต่างๆ ได้ดีและใช้เป็นสมการพื้นฐานในการตัดแปลงเพื่อสร้างสมการจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์ในสภาวะจำเพาะต่างๆ ที่จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์ในสภาวะยับยั้งจากตัวยับยั้งเป็นต้น

$$V = \frac{V_m S}{K_m + S} \quad (5)$$

จากสมการที่ 5 พารามิเตอร์ v_m คืออัตราความเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด (maximum velocity) และพารามิเตอร์ K_m คือค่าคงที่ Michaelis (Michaelis-Menten constant) ซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของซับสเตรตเมื่ออัตราความเร็วของปฏิกิริยาเท่ากับครึ่งหนึ่งของอัตราความเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดในการประมาณค่าพารามิเตอร์ทั้งสองดังกล่าวจะอาศัยการจัดรูปสมการที่ 5 ใหม่โดยจัดให้อยู่ในรูปของการแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{V}$ และ $\frac{1}{S}$ แสดงได้ดังสมการ

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m} \quad (6)$$

เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ที่เรียกว่า Lineweaver-Burk plot ดังแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งจะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ $\frac{K_m}{V_m}$ และมีค่าจุดตัดแกน y เท่ากับ $\frac{1}{V_m}$ ในการทดลองเพื่อประมาณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์จะต้องหาอัตราความเร็วของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของซับสเตรตต่างๆ โดยอัตราเร็วปฏิกิริยาที่ได้จากการทดลองจะเป็นอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (initial rate)



ภาพที่ 4 การเขียนกราฟ Lineweaver-Burk plot

ที่มา:ปราณี(2535)

6. การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรม

6.1 การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรม

การพัฒนากระบวนการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรม มีทั้งกระบวนการผลิตแบบเบ็ดเสร็จ และแบบต่อเนื่องโดยส่วนใหญ่จะใช้ในรูปของการตรึงเอนไซม์หรือตรึงเซลล์ โดยในปี 1984 บริษัท Meiji Seiki Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น เป็นบริษัทแรกที่เริ่มทำการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรม โดยทำการตรึงเซลล์เชื้อรา *Aspergillus niger* ด้วยแคลเซียมแอลจินेट โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Neosugar รวมทั้งบริษัท Cheil Foods & Chemicals Co., Ltd. ประเทศเกาหลี ก็ประสบความสำเร็จในการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการตรึงเซลล์ยีสต์ *Aureobasidium pullulans* (Yun, 1996) โดยทำการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบต่อเนื่องในชื่อผลิตภัณฑ์ Meioligo ในรูปน้ำตาลผงและไซรัป อีกทั้งยังใช้ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ออกจำหน่าย เช่น Oligo Coffee, Oligo Candy, Meiji Oligo Pudding เป็นต้น และยังได้ร่วมทุนกับบริษัท Beghin Say ประเทศฝรั่งเศส ในชื่อบริษัท Beghin-Meiji Industries ซึ่งผลิตผลิตภัณฑ์ออกจำหน่ายในชื่อ Actilight และให้บริษัท Golden Technology จัดจำหน่ายผลิตภัณฑ์ดังกล่าวในสหรัฐอเมริกาภายใต้สินค้าชื่อ NutraFlora นอกจากนี้ Meiji Seiki Co., Ltd. ยังมีอีกหลายบริษัทของญี่ปุ่นที่ผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ออกจำหน่าย เช่น Nihon Oligo Co., Ltd. และ Hakubun Co., Ltd. (สารโรจน์ 2551; Crittenden and Plane 1996)

การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยวิธีเอนไซม์นั้นจะเริ่มจากการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ก่อนจากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้นั้นมาผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ซูโครสเป็นซับสเตรตซึ่งการนำเอนไซม์ที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถแบ่งได้เป็นอีก 2 แบบ คือ เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงแสดงดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ตามลำดับ



ตารางที่ 1 ชนิดของจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง สภาวะการผลิตที่เหมาะสม และประสิทธิภาพของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

| จุลินทรีย์/ เอนไซม์ | ขนาด (กรัม/ลิตร) | ระบบ การผลิต | สภาวะของการผลิต | | | | ประสิทธิภาพการผลิต FOS | | | เอกสารอ้างอิง |
|--|---------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------|---------------------------------|---|
| | | | พีเอช | อุณหภูมิ (°C) | การกวน (รอบ/นาที) | ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร) | ผลได้ (กรัม/กรัม) | อัตราการผลิต (กรัม/ลิตร ชม.) | |
| Pectinex Ultra SP-L | ชูโครส 450 | เบ็ดเสร็จ | 5.6 | 65 | - | 34 | FOS=272 | ~70%* | - | Hang and Woodams (1996) |
| <i>Bacillus macerans</i> EG-6 | ชูโครส 500 | เบ็ดเสร็จ | 7 | 50 | - | 100 | - | 43%* | - | Kim <i>et al.</i> (2000) |
| <i>Aspergillus niger</i> ATCC 20611 | ชูโครส 400 | เบ็ดเสร็จ | 5.5 | 40 | - | 32 | FOS=333.04 | FOS=0.93 | FOS=10.41 | Sirisansaneeyakul <i>et al.</i> (2000) |
| <i>Aspergillus. oryzae</i> CFR 202 | ชูโครส 600 | เบ็ดเสร็จ | 5.5 | 55 | - | 18 | - | 53 %* | - | Sangeetha <i>et al.</i> (2004) |

ตารางที่ 1(ต่อ)

| จุลินทรีย์/ เอนไซม์ | ชั้นสเตรต (กรัม/ลิตร) | ระบบ การผลิต | สภาวะของการผลิต | | | | ประสิทธิภาพการผลิต FOS | | | เอกสารอ้างอิง |
|----------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------------|-----------------------|--|----------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| | | | พีเอช | อุณหภูมิ (°C) | การกวน (รอบ/นาที) | ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร) | ผลได้ (กรัม/กรัม) | อัตราการผลิต (กรัม/ลิตร ชม.) | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. | ซูโครส 500 | เปิดเสรีจ | 4.5 | 50 | - | 72 | - | - | - | Hernalsteens and Maugeri (2008) |
| <i>Aspergillus</i> sp. N74 | ซูโครส 550 | เปิดเสรีจ | 5.5 | 60 | - | 5.3 | FOS=286.04 GF ₂ =142.16 GF ₃ =143.88 | - | - | Sánchez <i>et al.</i> (2010) |

หมายเหตุ: * เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

ตารางที่ 2 ชนิดของจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่เกี่ยวกับ สภาพการผลิตที่เหมาะสม และประสิทธิภาพของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

| จุลินทรีย์/ เอนไซม์ | ตัวพุง | ชั้นสเตรต กรัม/ลิตร) | ระบบ การผลิต | สภาวะของการผลิต | | | ประสิทธิภาพการผลิต FOS | | | เอกสารอ้างอิง | |
|--|--------------------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|------------------|--|----------------------------------|---|----------------------|---------------|------------------------------------|
| | | | | พีเอช | อุณหภูมิ (°C) | อัตรา เจือจาง (ชม. ⁻¹) | ระยะเวลา การผลิต (ชั่วโมง) | ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร) | ผลได้ (กรัม/กรัม) | | อัตราการผลิต (กรัม/ลิตร ชม.) |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> KFCC 10524 | เรซินแลก เปลี่ยน ประจุ | ซูโครส 600 | ต่อเนื่อง | 5.5 | 50 | อัตราการ ไหล 27 ลิตร/ ชม. | 30 วัน | - | - | 1174 | Yun and Song (1996) |
| <i>Aspergillus japonicas</i> | ไลโตแซน | ซูโครส 500 | เบ็ดเสร็จ | 5.5 | 50 | - | - | - | Imm.=48% Free=58% | - | Cheng <i>et al.</i> (2005) |
| Pectinex Ultra SP-L | พอลิ เมทาอะ คริเลท-เบส | ซูโครส 630 | เบ็ดเสร็จ | 5.6 | 60 | - | 160 | FOS=387 GF ₂ =240 GF ₃ =144 GF ₄ =3 | 61.5% | - | Ghazi <i>et al.</i> (2005) |
| Pectinex Ultra SP-L | เรซินแลก เปลี่ยน ประจุลบ | ซูโครส 1 M | เบ็ดเสร็จ | 5.6 | 53 | - | 9 | FOS=84 GF ₂ =72.7 GF ₃ =11.3 | - | - | Csanádi and Sisak (2006) |

7.การออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีทากูจิ(Taguchi approach)

วิธีทากูจิ เป็นวิธีการหนึ่งที่น่ามาใช้อย่างมากในภาคอุตสาหกรรม เพื่อการปรับปรุงทางด้านคุณภาพ โดยมีแนวทางมาจากการเชื่อว่าคุณภาพที่ดีมาจากการออกแบบที่ดี วิธีนี้จึงให้ความสำคัญไปที่การออกแบบแผนการทดลอง เพื่อให้ได้ภาวะของกระบวนการหรือผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุด แผนการทดลองของวิธีทากูจิ จะใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Orthogonal array ในการออกแบบการทดลองทำให้จำนวนการทดลองลดลง(Roy, 2001)

การวัดค่าในวิธีทากูจิ จะแสดงในรูปของ Signal/Noise ratio (S/N ratio) ซึ่งถูกใช้เพื่อวัดอิทธิพลของ noise factor (ตัวแปรที่ไม่สามารถควบคุมได้ในกระบวนการ) ที่มีต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ หรือกระบวนการ โดยอาศัยการวัดลักษณะของคุณภาพ (Quality Characteristic, QC) ซึ่งสามารถแสดงถึงความต้องการการเปลี่ยนแปลงของผลการทดลองที่ต้องการต่างกันประกอบด้วย 3 รูปแบบ ดังนี้

1. QC = B Bigger is better

$$S/N \text{ ratio} = -10 \times \log \left[\frac{\sum \left(\frac{1}{y} \right)^2}{N} \right]$$

2. QC = S Smaller is better

$$S/N \text{ ratio} = -10 \times \log \left[\frac{\sum y^2}{N} \right]$$

3. QC = N Nominal is best

$$S/N \text{ ratio} = -10 \times \log \left[\frac{\sum (y - y_0)^2}{N} \right]$$

โดย y , y_0 และ N หมายถึง ผลการทดลอง ผลการทดลองที่กำหนด และจำนวนการทดลองตามลำดับ

นอกจากนี้ วิธีทฤษฎีซึ่งนำเอาการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance, ANOVA) มาใช้เพื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองที่ได้

ขั้นตอนการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทฤษฎี ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน (Roy, 2001) ดังนี้

1. การวางแผนการทดลอง (planning experiment) เป็นขั้นตอนกำหนดจุดประสงค์ที่ต้องการ รวมทั้งพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบ
2. การออกแบบการทดลอง (designing experiment) เป็นขั้นตอนของการกำหนดหรือเลือก Orthogonal array ที่เหมาะสมกับระบบ รวมทั้งกำหนดปัจจัยและระดับของปัจจัย
3. การทำการทดลอง (conducting experiment) เป็นขั้นตอนของการทำการทดลองตามสถานะของปัจจัยและระดับของปัจจัยที่กำหนดใน Orthogonal array
4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง (analysing experiment) เป็นขั้นตอนของการพิจารณาผลของปัจจัย และระดับของปัจจัยว่าปัจจัยใดมีผลความสำคัญกับระบบ รวมทั้งหาสถานะที่เหมาะสมของระบบที่ทำให้ได้ผลได้สูงที่สุด
5. การทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลอง (confirming or predicted) เป็นขั้นตอนของการพิสูจน์ว่าสถานะที่เหมาะสมต่อระบบที่หาได้นั้น มีความเหมาะสม และได้ผลได้ตามที่ต้องการจริงหรือไม่ รวมทั้งใช้สถานะนั้นศึกษาผลที่เกิดขึ้นต่อระบบ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ

- 1.1 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง(Spectrophotometer); (ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV1201-, Japan)
- 1.2 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง(pH meter); (ยี่ห้อ Horiba รุ่น M-11, Japan)
- 1.3 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ(Incubator); (ยี่ห้อ Memmert, Germany)
- 1.4 เครื่องชั่งแบบละเอียด(Balance); (ยี่ห้อ Sartorial รุ่น 1615MP, USA.)
- 1.5 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ; (ยี่ห้อ New Brunswich Scientific รุ่น G-25, USA.)
- 1.6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath); (Precision Scientific, 280, USA)
- 1.7 เครื่องกวนสารละลาย(Magnetic stirrer); (ยี่ห้อ Scott รุ่น CAT-M6, Germany)
- 1.8 เครื่องสูบ(Peristaltic pump); (ยี่ห้อ atto รุ่น model AT-2105, Japan)
- 1.9 หัวเข็มฉีดยา; (ยี่ห้อ Nipro, Japan)ขนาด 20-G (0.9 มิลลิเมตร)
- 1.10 สายยางซิลิโคน (Silicone tube); (ยี่ห้อ Dura) ขนาด 4x7 มิลลิเมตร
- 1.11 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography); (ยี่ห้อ Knauer รุ่น Smartline system, Germany)
- 1.12 เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์อื่นๆ

2. เอนไซม์ทางการค้าเพื่อใช้ในการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

เอนไซม์ทางการค้า (Pectinex[®] Ultra SP-L) ของบริษัท Novozymes A/S ประเทศเดนมาร์ก

3. สารเคมีที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูเรโนซิเดส

- 5.1 Calcium chloride; (A-127, Ajax Finechem, Australia)
- 5.2 Sodium alginate; (A-7128, Sigma-Aldrich co., Ltd, USA)

วิธีการ

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

1.1 การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทฤษฎี

เพื่อศึกษาผลของปัจจัย 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेटกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ ต่อค่าตอบสนอง ได้แก่ กิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส เนื่องจากปัจจัยทั้ง 3 เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการตรึงเอนไซม์บีตาฟรุกโทฟูราโนซิเดส โดยออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทฤษฎีในการศึกษาปัจจัย 3 ปัจจัย ซึ่งแต่ละปัจจัยกำหนดไว้ 3 ระดับ ได้การทดลองแบบ L_9 ที่มีทั้งหมด 9 การทดลอง ประกอบด้วยจำนวนของการทดลองที่ขึ้นอยู่กับระดับของปัจจัยที่กำหนดแสดงในตารางที่ 3 และตารางที่ 4 แสดงภาพรวมของ L_9 (3³) Orthogonal arrays (Oas) ที่ใช้ในการศึกษานี้

ตารางที่ 3 ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองเพื่อการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

| สัญลักษณ์ | ปัจจัย | ระดับ 1 | ระดับ 2 | ระดับ 3 |
|-----------|--|---------|---------|---------|
| A | ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेट(เปอร์เซ็นต์) | 2 | 3 | 4 |
| B | กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | 50 | 100 | 150 |
| C | ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (โมลาร์) | 0.5 | 1.0 | 1.5 |

ตารางที่ 4 Orthogonal array $L_9(3^3)$ ของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

| การทดลอง | ปัจจัยและระดับของปัจจัย | | |
|----------|-------------------------|-----|-----|
| | A | B | C |
| 1 | 2 | 50 | 0.5 |
| 2 | 2 | 100 | 1.0 |
| 3 | 2 | 150 | 1.5 |
| 4 | 3 | 50 | 1.0 |
| 5 | 3 | 100 | 1.5 |
| 6 | 3 | 150 | 0.5 |
| 7 | 4 | 50 | 1.5 |
| 8 | 4 | 100 | 0.5 |
| 9 | 4 | 150 | 1.0 |

1.2 การตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

เตรียมสารละลายผสมระหว่างโซเดียมแอลจิเนตกับเอนไซม์โดยแปรผันความเข้มข้นโซเดียมแอลจิเนตและกิจกรรมเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายตามสภาวะการทดลองดังตารางที่ 4 ในพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร (อัตราส่วนระหว่างปริมาตรเอนไซม์ต่อสารละลายโซเดียมแอลจิเนตเท่ากับ 1:1) ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร หยดสารละลายผสมผ่านหัวเข็มฉีดยาขนาด 0.6 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องสูบที่ปรับอัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่แปรผันความเข้มข้นตามสภาวะการทดลองดังตารางที่ 4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 ลิตร ที่วางบนเครื่องกวนสารละลาย เมื่อหยดสารละลายผสมหมดแล้วจึงกวนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีเม็ดเอนไซม์ตรึงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เพื่อให้แคลเซียมไอออนเข้าไปแทนที่โซเดียมไอออนของโซเดียมแอลจิเนต จากนั้นกรองเม็ดเอนไซม์ตรึงที่ได้ผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว ล้างเม็ดเอนไซม์ตรึงด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที นำเม็ดเอนไซม์ตรึงทั้งหมดซึ่งห้าน้ำหนักเปียกทั้งหมด และหาปริมาณรวมโดยการแทนที่น้ำและเก็บเม็ดเอนไซม์ตรึง 50 เม็ด มาหาล้างน้ำหนักเฉลี่ยและปริมาณเฉลี่ยเพื่อคำนวณหาความหนาแน่นและจำนวนเม็ดเอนไซม์ตรึงทั้งหมดที่ตรึงได้ (การคำนวณแสดงดังภาคผนวก ค) นำเอนไซม์ตรึงที่ได้นี้วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ต่อไป

เตรียมไว้ไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมเอนไซม์อิสระ บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในสารละลายซูโครสที่เตรียมไว้ผสมให้เข้ากันได้ ปริมาตรรวมของสารผสมปฏิกิริยาเริ่มต้น (V_0) เท่ากับ 50 มิลลิลิตร จึงทำให้มีกิจกรรมเอนไซม์ เริ่มต้น (E_0) เท่ากับ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำการเก็บตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS) คำนวณอัตราเร็วเริ่มต้น (V_0) ที่ความเข้มข้นซูโครสต่าง ๆ โดยหาค่าความชันสูงสุดของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้กับเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk) และประมาณค่าคงที่ไมเคิลิส (Michaelis; K_m) และอัตราเร็วสูงสุด (V_m) ของปฏิกิริยาเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

2.2 การประมาณค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรีงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

เตรียมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 25 50 75 100 150 200 และ 300 กรัมต่อลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เตรียมเอนไซม์ตรีง โดยนำเอนไซม์ตรีงมาแทนที่น้ำให้ได้ปริมาตร 16.7 มิลลิลิตร ให้ได้กิจกรรมเอนไซม์ตรีง 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร แล้วนำเอนไซม์และสารละลายซูโครสที่เตรียมไว้ไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายซูโครสลงในเอนไซม์ตรีง บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่เตรียมไว้ผสมให้เข้ากันได้ ทำการเก็บตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS คำนวณอัตราเร็วเริ่มต้น (V_0) ที่ความเข้มข้นซูโครสต่าง ๆ โดยหาค่าความชันสูงสุดของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้กับเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และเขียนกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์กและประมาณค่า K_m และ V_m ของปฏิกิริยาเอนไซม์ตรีงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

3. การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสแบบเบ็ดเสร็จ

3.1 ผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสแบบเบ็ดเสร็จ

เตรียมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร โดยชั่งซูโครส 90 กรัมละลายในบัฟเฟอร์ Sodium acetate ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เตรียมเอนไซม์ให้มีกิจกรรมเอนไซม์ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยดวงเอนไซม์มา 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ลงในสารละลายซูโครสที่เตรียมไว้แล้ว ผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยบัฟเฟอร์ Sodium acetate ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5 ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 300 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร และทำการผลิตที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 54 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ หลังจากนั้นกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองขนาดของรูเท่ากับ 0.45 ไมครอน ก่อนทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลต่าง ๆ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง

3.2 ผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสแบบเบ็ดเสร็จซ้ำ

เตรียมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร โดยชั่งซูโครส 90 กรัมละลายในบัฟเฟอร์ Sodium acetate ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5 ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 300 มิลลิลิตร เตรียมเอนไซม์ตรึงให้มีกิจกรรมเอนไซม์ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยนำเอนไซม์ตรึงมา 100 มิลลิลิตร (โดยการแทนที่น้ำ) จากนั้นเติมสารละลายซูโครสลงในเอนไซม์ตรึงที่เตรียมไว้แล้ว ผสมให้เข้ากัน ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร และทำการผลิตที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำตัวอย่างมาต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ หลังจากนั้นกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองขนาดของรูเท่ากับ 0.45 ไมครอน ก่อนทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลต่าง ๆ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง และเมื่ออัตราการใช้ซับสเตรตจะลดลงจะทำการเติมสารละลายซูโครสเข้าไปใหม่โดยกรองเม็ดเอนไซม์ตรึงออก แล้วนำไปล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 พร้อมคนด้วยเครื่องกวนเป็นเวลา

10 นาที 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำเมล็ดเอ็นไซม์ที่เตรียมไว้มาเติมลงในสารละลายซูโครสที่เตรียมไว้ใหม่ เพื่อทำการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ซึ่งงานกว่าอัตราการใช้ยับยั้งจะลดลง

3. การวิเคราะห์

3.1 กิจกรรมเอ็นไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

กำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอ็นไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส คือ ปริมาณเอ็นไซม์ที่ใช้ย่อยซูโครสในการทำให้เกิดกลูโคส 1.0 ไมโครกรัมต่อนาที ภายใต้สภาวะต่อไปนี้คือ สารผสมปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 600 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร และสารละลายเอ็นไซม์ 0.2 มิลลิลิตร (ที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อยโมเลกุลของซูโครสด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS) โดยมีกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน (คัดแปลงจาก สุภาพร, 2544)

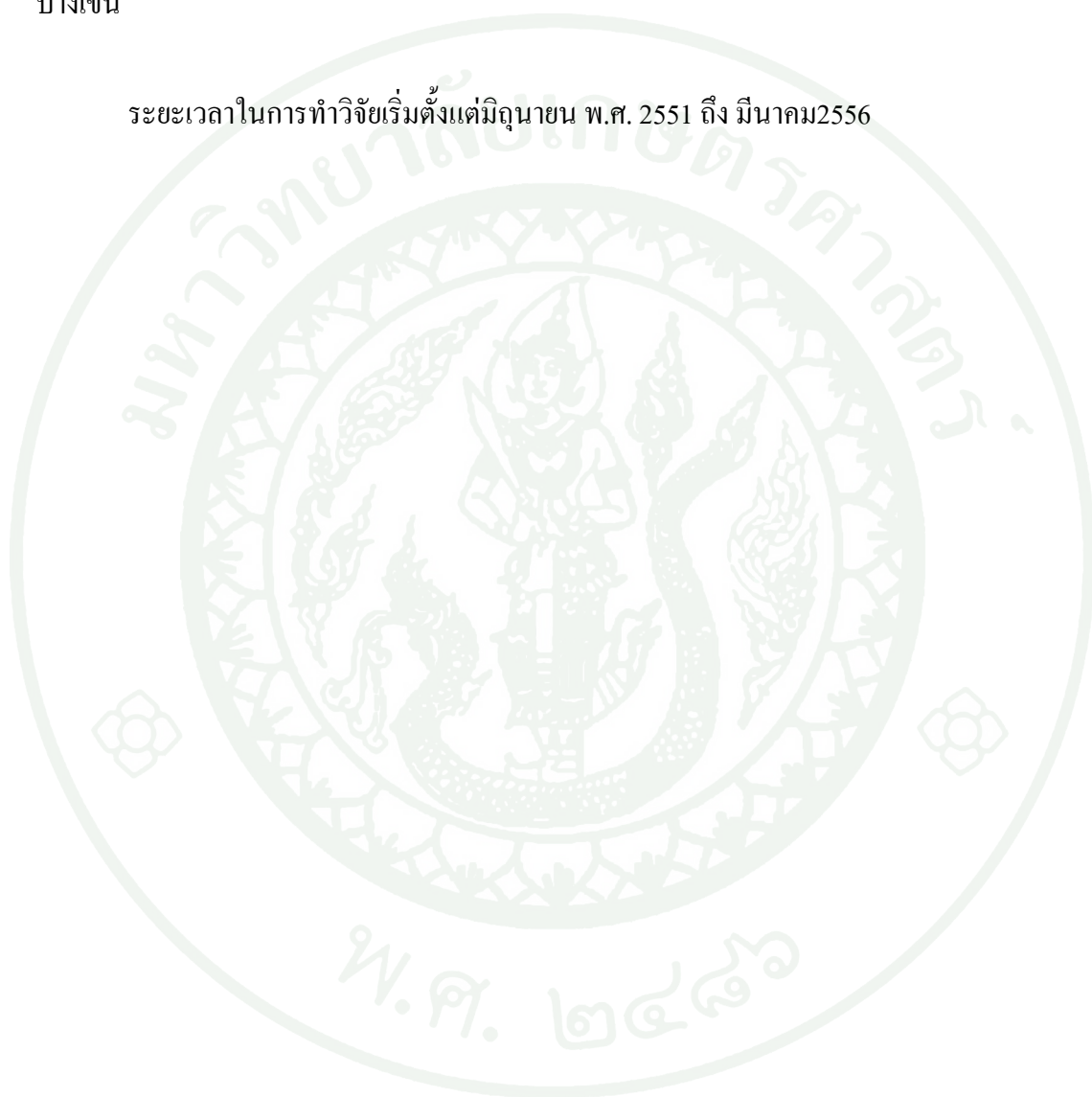
3.2 ปริมาณฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์และน้ำตาลอื่น ๆ

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลต่าง ๆ ได้แก่ ฟรุกโทส (F) กลูโคส (G) ซูโครส (GF) 1-kestose (GF₂) นีสโทส (GF₃) 1^F-ฟรุกโทฟูราโนซีส นีสโทส (GF₄) และน้ำตาลอื่น ๆ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) โดยใช้ดีเทกเตอร์ชนิด Refractive Index (RI detector) และคอลัมน์ VertiseTM SUGAR SOP 10 μ m ขนาด 7.83×30 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้คือ น้ำปราศจากไอออน (deionized water) ควบคุมอัตราการไหลเท่ากับ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 83 องศาเซลเซียส

4. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัยห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการหมัก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ระยะเวลาในการทำวิจัยเริ่มตั้งแต่มิถุนายน พ.ศ. 2551 ถึง มีนาคม 2556



ผลและวิจารณ์

1. สถานะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

1.1 การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทะกุกิ

การศึกษาการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสด้วยแคลเซียมแอลจิเนต โดยออกแบบการทดลองด้วยวิธีทะกุกิ ประกอบด้วยปัจจัยการทดลองทั้งหมด 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจิเนต (A) กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น (B) และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (C) แต่ละปัจจัยกำหนดไว้ 3 ระดับ ได้การทดลองแบบ L_9 ที่มีการทดลองทั้งหมด 9 การทดลอง (แสดงการทดลองดังตารางที่ 3 และ 4 ในวิธีการทดลอง) โดยนำเอนไซม์ผสมกับสารละลายโซเดียมแอลจิเนต ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร หยดสารละลายผสมผ่านหัวเข็มฉีดยาขนาด 0.6 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องสูบที่ปรับอัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ลงในแคลเซียมคลอไรด์ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในพลาสติกขนาด 500 ลิตร ที่วางบนเครื่องกวนสารละลาย เมื่อหยดสารละลายผสมหมดแล้วจึงกวนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีเอนไซม์ตรึงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นกรองเม็ดเอนไซม์ตรึงที่ได้ผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว ล้างเม็ดเอนไซม์ตรึงด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที นำเม็ดเอนไซม์ตรึงที่ได้วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

จากการทดลองทั้ง 9 การทดลอง ได้นำน้ำหนักเปียกของเอนไซม์ตรึงทั้งหมด น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเอนไซม์ตรึง ปริมาตรรวมของเอนไซม์ตรึง ปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเอนไซม์ตรึง ความหนาแน่นรวมของเอนไซม์ตรึง ความหนาแน่นเฉลี่ยของเม็ดเอนไซม์ตรึง และจำนวนเม็ดเอนไซม์ตรึงทั้งหมดที่ตรึงได้ (การคำนวณแสดงดังภาคผนวก ค) สรุปดังตารางที่ 5 และผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส สรุปดังตารางที่ 6 และภาพที่ 5

ตารางที่ 5 ผลของน้ำหนักเปียกของเอนไซม์ตรึงทั้งหมด น้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเอนไซม์ตรึง จำนวนเม็ดเอนไซม์ตรึงทั้งหมด ปริมาตรเอนไซม์ตรึงจากการแทนที่น้ำ ปริมาตรเฉลี่ยของเอนไซม์ตรึงจากการแทนที่น้ำ ความหนาแน่นของเอนไซม์ตรึงทั้งหมด, ความหนาแน่นเฉลี่ยของเอนไซม์ตรึงและขนาดของเอนไซม์ตรึงที่ได้จากวิธีการทะกุกิ

| การทดลอง | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| น้ำหนักเปียกของเอนไซม์ตรึงทั้งหมด (กรัม) | 5.66 | 5.61 | 4.96 | 5.58 | 5.32 | 5.16 | 4.89 | 5.09 | 3.58 |
| น้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเอนไซม์ตรึง (กรัม) ¹ | 0.157 | 0.155 | 0.179 | 0.195 | 0.202 | 0.234 | 0.245 | 0.253 | 0.221 |
| ปริมาตรเอนไซม์ตรึงทั้งหมด (มิลลิลิตร) | 5.6 | 5.4 | 4.6 | 5.4 | 5.1 | 5.7 | 4.8 | 4.9 | 3.9 |
| ปริมาตรเอนไซม์ตรึงเฉลี่ย (มิลลิลิตร) ² | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 0.2 |
| ความหนาแน่นของเอนไซม์ตรึงทั้งหมด (กรัมต่อมิลลิลิตร) | 1.005 | 1.044 | 1.072 | 1.038 | 1.038 | 0.905 | 1.030 | 1.044 | 0.924 |
| ความหนาแน่นเฉลี่ยของเอนไซม์ตรึง (กรัมต่อมิลลิลิตร) ³ | 1.049 | 1.129 | 1.020 | 1.114 | 0.951 | 1.171 | 1.151 | 1.014 | 1.107 |
| จำนวนเอนไซม์ตรึงทั้งหมด (เม็ด) | 36 | 36 | 28 | 29 | 26 | 22 | 20 | 20 | 16 |
| ขนาดของเอนไซม์ตรึง (เซนติเมตร) | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |

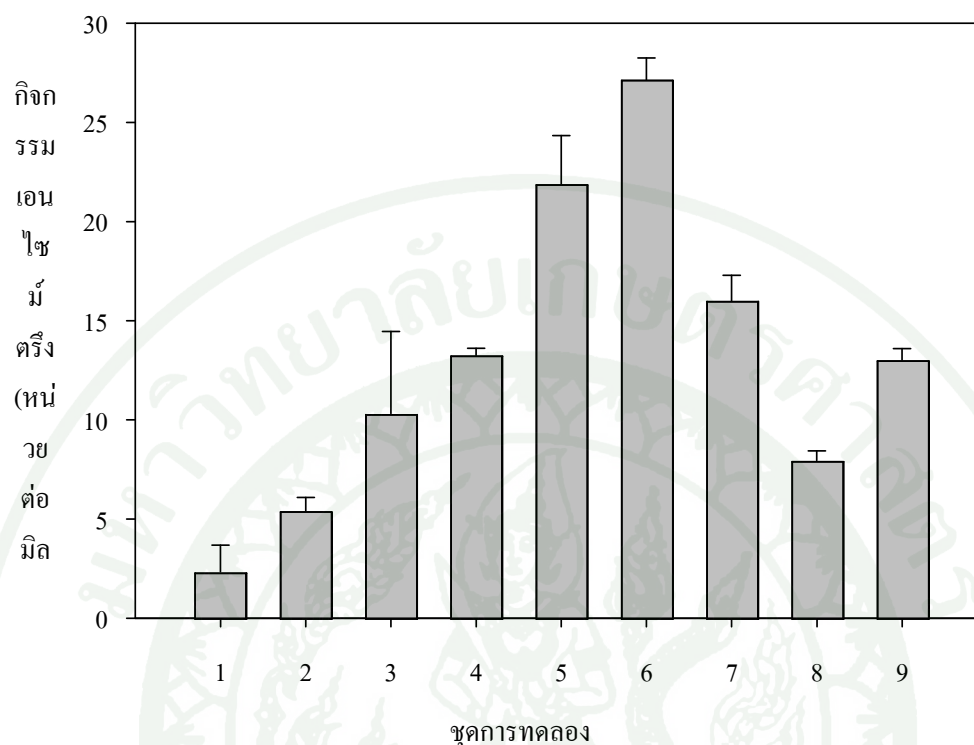
หมายเหตุ วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก

^{1, 2 และ 3} คัดจากจำนวนเม็ดเอนไซม์ตรึง 50 เม็ด

ตารางที่ 6 การตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส โดยออกแบบการทดลองแบบทฤษฎี

| การทดลอง | ปัจจัย | | | กิจกรรมเอนไซม์ตรึง (หน่วยต่อมิลลิลิตร) |
|----------|-----------|-----|-----|---|
| | A | B | C | |
| 1 | 2 | 50 | 0.5 | 2.35 ± 1.34 |
| 2 | 2 | 100 | 1.0 | 5.42 ± 0.67 |
| 3 | 2 | 150 | 1.5 | 10.32 ± 4.15 |
| 4 | 3 | 50 | 1.0 | 13.26 ± 0.35 |
| 5 | 3 | 100 | 1.5 | 21.89 ± 2.45 |
| 6 | 3 | 150 | 0.5 | 27.14 ± 1.11 |
| 7 | 4 | 50 | 1.5 | 16.01 ± 1.28 |
| 8 | 4 | 100 | 0.5 | 7.95 ± 0.49 |
| 9 | 4 | 150 | 1.0 | 13.03 ± 0.57 |
| | ค่าเฉลี่ย | | | 13.04 ± 1.38 |

หมายเหตุการทดลองได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ (\pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; SD) ตามชุดการทดลองที่ออกแบบด้วยวิธีทฤษฎี โดย A คือ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจีเนต (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) B คือ กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น (หน่วยต่อมิลลิลิตร) และ C คือ ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (โมลาร์)



ภาพที่ 5 กิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่คำนวณจากข้อมูลการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง

จากตารางที่ 5 ได้นำหนักเปียกของเอนไซม์ตรึงทั้งหมดอยู่ระหว่าง 3.58-5.66 กรัม น้ำหนักแห้งของเอนไซม์ตรึงอยู่ระหว่าง 0.155-0.253 กรัมต่อเม็ด (คิดจากเม็ดเอนไซม์ตรึง 50 เม็ด) ปริมาตรรวมของเอนไซม์ตรึงอยู่ระหว่าง 3.9-5.7 มิลลิลิตร ปริมาตรเฉลี่ยของเอนไซม์ตรึงอยู่ระหว่าง 0.1-0.3 มิลลิลิตรต่อเม็ด (คิดจากเม็ดเอนไซม์ตรึง 50 เม็ด) ความหนาแน่นรวมของเอนไซม์ตรึงอยู่ระหว่าง 0.905-1.072 กรัมต่อมิลลิลิตร ความหนาแน่นเฉลี่ยของเอนไซม์ตรึงอยู่ระหว่าง 0.951-1.151 กรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนเม็ดเอนไซม์ตรึงทั้งหมดที่ตรึงได้อยู่ระหว่าง 16-36 เม็ดและขนาดของเม็ดเอนไซม์ตรึงอยู่ที่ 0.3 เซนติเมตร

จากตารางที่ 6 และภาพที่ 5 พบว่าการทดลองที่ 6 มีกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสสูงที่สุด โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 27.14 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่สภาวะตรึงดังต่อไปนี้ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินต 3.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น 150 หน่วยต่อมิลลิลิตรและความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ จากการทดลองทั้ง 9 การทดลองซึ่งการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสสาเหตุอาจเกิดจากการ

เลือกใช้ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेटที่ไม่เหมาะสม เช่น ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेटน้อยเกินไป ส่งผลให้เอนไซม์รั่วผ่านรูพรุนขนาดใหญ่ของเม็ดเจลออกมาได้ง่าย เนื่องจากเกิดการเชื่อมขวางภายในโครงสร้างของแคลเซียมแอลจินेटได้ไม่ดี ขณะที่ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेटมากเกินไป ทำให้โซเดียมแอลจินेटมีความหนืดมาก ส่งผลให้รูพรุนของเม็ดเอนไซม์ตรึงมีขนาดเล็กเกินไปซึ่งยากต่อการแพร่ของซับสเตรตเข้าจับกับเอนไซม์ภายในโครงสร้างของเม็ดเจล (Anwar *et al.*, 2009)

จากนั้นผลการทดลองทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง จะถูกนำไปวิเคราะห์ผลโดยวิธีทฤษฎีเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

1.2 ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

การวัดในวิธีทฤษฎีจะแสดงในรูปของอัตราส่วนสัญญาณต่อสิ่งรบกวน (Signal/Noise ratio; S/N ratio) .ซึ่งถูกใช้เพื่อวัดอิทธิพลของ noise factor (ตัวแปรที่ไม่สามารถควบคุมได้ในกระบวนการ) ที่มีต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ หรือกระบวนการ โดยอาศัยการวัดลักษณะของคุณภาพ (Quality Characteristic, QC) ซึ่งสามารถแสดงถึงความต้องการการเปลี่ยนแปลงของผลการทดลองที่ต้องการต่างกันประกอบด้วย 3 รูปแบบ คือ กรณีน้อยกว่าดีกว่า (Smaller is better) กรณีมากกว่าดีกว่า (Bigger is better) และกรณีเป้าหมายที่ดีที่สุด (Normal is best) กรณีของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสด้วยแคลเซียมโซเดียมแอลจินेट จะพิจารณาลักษณะคุณภาพจากพารามิเตอร์ 1 ชนิด คือ กิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส เพื่อวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งจัดอยู่ในประเภทมากกว่าดีกว่า (QC=B) เนื่องจากการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสให้ได้สูงสุด อย่างไรก็ตาม การวัดค่าในวิธีการทฤษฎีสามารถแสดงในรูปของค่าเฉลี่ยของผลการทดลองได้เช่นกัน ดังนั้น การวิเคราะห์จะทำการพิจารณาทั้งค่าอัตราส่วน S/N และค่าเฉลี่ย

1.2.1 ผลของปัจจัยที่พิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N

โดยนำผลการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลองไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าอัตราส่วน S/N แสดงดังตารางที่ 7 จากนั้นจึงนำค่าอัตราส่วน S/N มาคำนวณค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของปัจจัย เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัย และหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส แสดงดังตารางที่ 8 และ

ภาพที่ 6 จากนั้นวิเคราะห์หาค่าอิทธิพลของปัจจัยกิจกรรมเอนไซม์ตรีงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส โดยวิธี ANOVA แสดงดังตารางที่ 10ตามลำดับ

จากตารางที่ 8 แสดงค่าอิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการตรีงเอนไซม์ โดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N ของกิจกรรมเอนไซม์ตรีงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส จะเห็นว่าชุด การทดลองใดมีกิจกรรมเอนไซม์ตรีงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสสูง การทดลองนั้นก็จะมีค่าอัตราส่วน S/N สูงขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการออกแบบการทดลองแบบ QC=B เมื่อพิจารณาอิทธิพลของแต่ละปัจจัย พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेट กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ โดยปัจจัยความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेटมีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเด สมากที่สุด เท่ากับ 51.62 เปอร์เซนต์รองลงมา คือ ปัจจัยกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น และความเข้มข้น แคลเซียมคลอไรด์ เท่ากับ 24.42 และ 23.96 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ค่าอัตราส่วน S/N ของกิจกรรมเอนไซม์ตรีงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่คำนวณจากข้อมูล การทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง

| การทดลอง | กิจกรรมเอนไซม์ตรีงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส (หน่วยต่อมิลลิเมตร) | | | | | | |
|----------|--|-------|-------|--------|------|-------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | SD | MSD | S/N |
| 1 | 3.74 | 2.23 | 1.07 | 2.35 | 1.34 | 0.381 | 4.191 |
| 2 | 4.65 | 5.82 | 5.80 | 5.42 | 0.67 | 0.035 | 14.540 |
| 3 | 14.60 | 6.32 | 10.02 | 10.32 | 4.15 | 0.013 | 18.787 |
| 4 | 13.67 | 13.07 | 13.04 | 13.26 | 0.35 | 0.006 | 22.446 |
| 5 | 20.62 | 20.34 | 24.72 | 21.89 | 2.45 | 0.002 | 26.704 |
| 6 | 25.96 | 27.31 | 28.16 | 27.14 | 1.11 | 0.001 | 28.658 |
| 7 | 14.61 | 17.13 | 16.30 | 16.01 | 1.28 | 0.004 | 24.031 |
| 8 | 7.56 | 7.80 | 8.50 | 7.95 | 0.49 | 0.016 | 17.978 |
| 9 | 13.49 | 13.21 | 12.39 | 13.03 | 0.57 | 0.006 | 22.281 |

หมายเหตุ การคำนวณค่าอัตราส่วน S/N แสดงดังตารางภาคผนวก ข

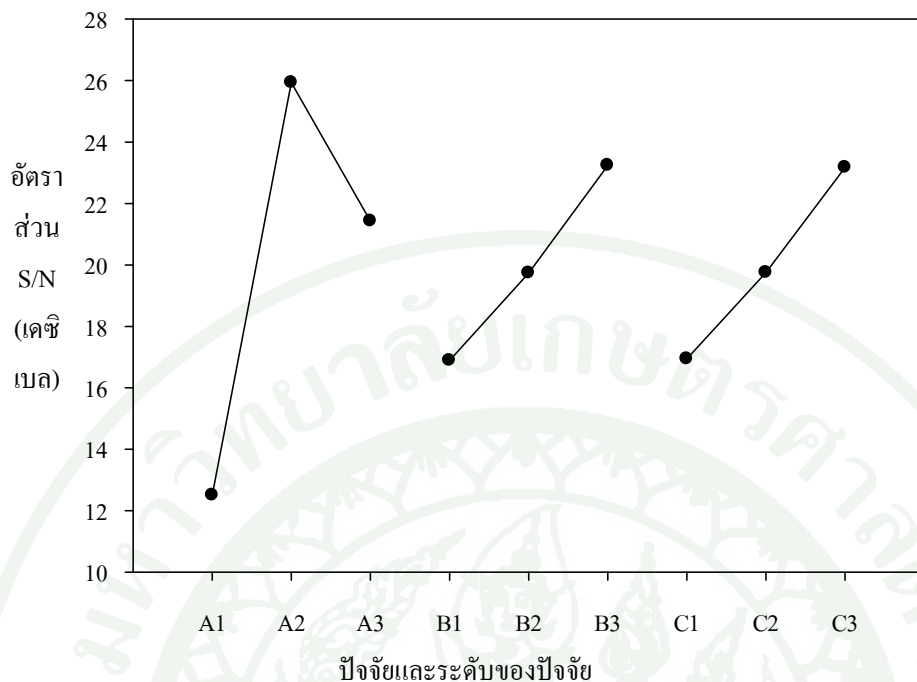
ตารางที่ 8 การวิเคราะห์หือทธิพลของปัจจัยจากค่าอัตราส่วน S/N ที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุคโทฟูราโนซิเดส

| ระดับ | กิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุคโทฟูราโนซิเดส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | | |
|---------------------------|--|-------|-------|
| | A | B | C |
| 1 | 12.50 | 16.89 | 16.94 |
| 2 | 25.94 | 19.74 | 19.75 |
| 3 | 21.43 | 23.24 | 23.17 |
| ค่าต่ำสุด | 12.50 | 16.89 | 16.94 |
| ค่าสูงสุด | 25.94 | 23.24 | 23.17 |
| ค่าอิทธิพล ¹ | 13.43 | 6.35 | 6.23 |
| % ค่าอิทธิพล ² | 51.62 | 24.42 | 23.96 |

หมายเหตุ A คือ ความเข้มข้น โซเดียมแอลจิเนต (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) B คือ กิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา (หน่วยต่อมิลลิลิตร) และ C คือ ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (โมลาร์)

¹ค่าอิทธิพล เท่ากับ ผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

²% ค่าอิทธิพล เท่ากับ $(100 \times \text{ค่าอิทธิพล}) / \text{ค่าอิทธิพลรวม}$ โดยใช้ค่าอิทธิพลของกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุคโทฟูราโนซิเดส เท่ากับ 26.02



ภาพที่ 6สถานะที่เหมาะสมพิจารณาจากค่า S/N ที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

1.2.2 ผลของปัจจัยที่พิจารณาจากค่าเฉลี่ย

นำผลการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง ไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แสดงดังตารางที่ 7 จากนั้นจึงนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของปัจจัย เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัย และหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส แสดงดังตารางที่ 9 และภาพที่ 7 ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสโดยวิธี ANOVA แสดงดังตารางที่ 11

จากตารางที่ 9 แสดงค่าอิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส โดยพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส เมื่อพิจารณาอิทธิพลของแต่ละปัจจัย พบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेट กิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์เริ่มต้น และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ โดยปัจจัยของความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेटมีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสมากที่สุด เท่ากับ 55.94 เปอร์เซ็นต์รองลงมา คือ

ปัจจัยของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ เท่ากับ 24.38 และ 19.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์อิทธิพลหลักของปัจจัยที่พิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

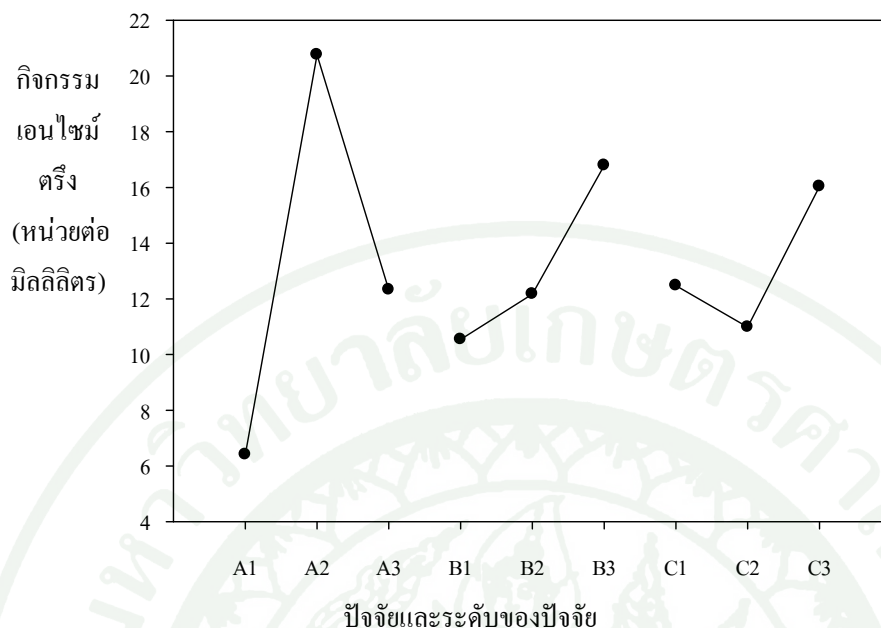
ตารางที่ 9 การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยจากค่าเฉลี่ยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

| ระดับ | กิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) | | |
|--------------|--|-------|-------|
| | A | B | C |
| 1 | 6.41 | 10.54 | 12.48 |
| 2 | 20.76 | 12.17 | 10.99 |
| 3 | 12.33 | 16.79 | 16.04 |
| ค่าต่ำสุด | 6.41 | 10.54 | 10.99 |
| ค่าสูงสุด | 20.76 | 16.79 | 16.04 |
| ค่าอิทธิพล | 14.35 | 6.26 | 5.05 |
| % ค่าอิทธิพล | 55.94 | 24.38 | 19.68 |

หมายเหตุ A คือ ความเข้มข้น โซเดียมแอลจิเนต (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) B คือ กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น (หน่วยต่อมิลลิลิตร) และ C คือ ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (โมลาร์)

¹ค่าอิทธิพล เท่ากับ ผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

²% ค่าอิทธิพล เท่ากับ $(100 \times \text{ค่าอิทธิพล}) / \text{ค่าอิทธิพลรวม}$ โดยใช้ค่าอิทธิพลของกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส เท่ากับ 25.66



ภาพที่ 7สถานะที่เหมาะสมพิจารณาจากค่าเฉลี่ย ที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

1.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธีANOVA

1.3.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่พิจารณาจากค่าอัตราส่วนS/N

จากผลการการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N แสดงดังตารางที่ 10จะเห็นว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพล(Persent contribution) ต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสมากที่สุด ได้แก่ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेट โดยปัจจัยของความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेटที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสมากที่สุด เท่ากับ 57.13เปอร์เซ็นต์ ส่วนปัจจัยของกิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์เริ่มต้นและความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์อิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสน้อย เท่ากับ 6.38 และ 5.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยในตารางที่ 8ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้นและเมื่อพิจารณาจากค่าความเชื่อมั่น (Confidence level) จากค่าดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेट เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.2$ ส่วนกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้นและความเข้มข้น

แคลเซียมคลอไรด์เป็นปัจจัยที่ไม่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.3.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่พิจารณาจากค่าเฉลี่ย

จากผลการการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N แสดงดังตารางที่ 11 จะเห็นว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพล (Percent contribution) ต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสมากที่สุด ได้แก่ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेट โดยปัจจัยของความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेटมีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสมากที่สุด เท่ากับ 60.61เปอร์เซ็นต์ ส่วนปัจจัยของกิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์เริ่มต้นและความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์อิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสน้อยที่สุด เท่ากับ 11.11 และ 6.52เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยในตารางที่ 9 ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้นและเมื่อพิจารณาจากค่าความเชื่อมั่น (Confidence level) จากค่าดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेटและกิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์เริ่มต้นเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ ส่วนความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

จะเห็นว่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรีงเอนไซม์ปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่พิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N และค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेट กิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์เริ่มต้น และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตรีงเอนไซม์ปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่าทุกปัจจัยมีอิทธิพลต่อกระบวนการตรีงเอนไซม์ปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่แตกต่างกัน โดยปัจจัยของความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेटและกิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์เริ่มต้นเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ ส่วนความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ดังนั้นสามารถประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรีงเอนไซม์ปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสได้จากระดับของปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลสูงที่สุดในปัจจัยนั้น ๆ จากนั้นสามารถคำนวณค่าคาดหวังต่าง ๆ ได้ ซึ่งปัจจัยที่นำไปใช้การคำนวณค่าคาดหวังต้องเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตรีงเอนไซม์ปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)¹ ของกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซีเดส พิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N

| Factor | DOF | Sum of Squares | Variance | F-ratio | Pure sum | Percent | Confidence | Significant |
|-------------|-----|----------------|----------|---------|----------|---------|------------|-------------|
| A | 2 | 280.38 | 140.19 | 8.46 | 247.23 | 57.13 | 89.43 | * |
| B | 2 | 60.78 | 30.39 | 1.83 | 27.62 | 6.38 | 64.70 | - |
| C | 2 | 58.47 | 29.23 | 1.76 | 25.32 | 5.85 | 63.82 | - |
| Other/Error | 2 | 33.15 | 16.58 | | | 30.64 | | |
| Total | 8 | 432.78 | | | | 100.00 | | |

หมายเหตุ¹วิธีคำนวณแสดงในตารางผนวกที่ ข1
*มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.2$

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)¹ ของกิจกรรมเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซีเดส พิจารณาจากค่าเฉลี่ย

| Factor | DOF | Sum of Squares | Variance | F-ratio | Pure sum | Percent | Confidence | Significant |
|-------------|-----|----------------|----------|---------|----------|---------|------------|-------------|
| A | 2 | 926.37 | 463.18 | 38.35 | 902.21 | 60.61 | 100.00 | *** |
| B | 2 | 189.48 | 94.74 | 7.84 | 165.33 | 11.11 | 99.69 | *** |
| C | 2 | 121.20 | 60.60 | 5.02 | 97.04 | 6.52 | 98.29 | ** |
| Other/Error | 20 | 241.55 | 12.08 | | | 21.77 | | |
| Total | 26 | 1488.60 | | | | 100.00 | | |

หมายเหตุ¹วิธีคำนวณแสดงในตารางผนวกที่ ข1

** และ *** มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ

1.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

การประเมินการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมจากระดับของปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลสูงที่สุดในปัจจัยนั้น ๆ จากนั้นสามารถประเมินค่าคาดหวังต่าง ๆ ได้ ซึ่งปัจจัยที่นำมาใช้ในการคำนวณค่าคาดหวังต้องเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ในการประเมินค่าคาดหวังต่าง ๆ ที่จะได้จากการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีการทะกุจิ อาศัยสมการดังนี้

$$Y_{opt} = \bar{T} + \sum \bar{F}_i$$

โดย Y_{opt} , \bar{T} และ \bar{F}_i คือ ค่าคาดหวัง ผลรวมทั้งหมดของค่า S/N หรือค่าเฉลี่ยในทุกชุดการทดลอง และผลรวมของค่า S/N หรือค่าเฉลี่ยของผลการทดลองในแต่ละระดับของแต่ละปัจจัยที่เหมาะสม ตามลำดับ

จากภาพที่ 6 และภาพที่ 7 สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสได้ดังตารางที่ 12 และ 13 ตามลำดับ คือ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น 150 หน่วยต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์

หากพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส คือ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น 150 หน่วยต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์ซึ่งไม่ตรงกับชุดการทดลองที่ได้ออกแบบไว้โดยวิธีทะกุจิ ทั้ง 9 ชุดการทดลอง แต่ผลการทดลองก็ได้สอดคล้องกับการทดลองในชุดการทดลองที่ 6 คือ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น 150 หน่วยต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์

ตารางที่ 12 สภาวะที่เหมาะสม และค่าคาดหวังของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่ประเมินได้ โดยพิจารณาจากค่า S/N

| พารามิเตอร์ | สภาวะที่เหมาะสม | | | ค่าคาดหวัง |
|---|-----------------|-----|-----|------------|
| | A | B | C | |
| $Y_{opt} = \bar{T} + (\bar{A}_2 - \bar{T}) + (\bar{B}_3 - \bar{T}) + (\bar{C}_3 - \bar{T})$ | 3 | 150 | 1.5 | 41.865 |

หมายเหตุวิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ข

Y_{opt} คือ ค่าคาดหวังของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส โดยใช้ค่าผลรวมทั้งหมดของค่าอัตราส่วน S/N ในทุกชุดการทดลองของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส; \bar{T} เท่ากับ 19.956

ตารางที่ 13 สภาวะที่เหมาะสม และค่าคาดหวังของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่ประเมินได้ โดยพิจารณาจากค่าเฉลี่ย

| พารามิเตอร์ | สภาวะที่เหมาะสม | | | ค่าคาดหวัง |
|---|-----------------|-----|-----|------------|
| | A | B | C | |
| $Y_{opt} = \bar{T} + (\bar{A}_2 - \bar{T}) + (\bar{B}_3 - \bar{T}) + (\bar{C}_3 - \bar{T})$ | 3 | 150 | 1.5 | 27.256 |

หมายเหตุวิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ข

Y_{opt} คือ ค่าคาดหวังของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส โดยใช้ค่าผลรวมทั้งหมดของค่าเฉลี่ยในทุกชุดการทดลองของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส; \bar{T} เท่ากับ 13.168

1.5 การยืนยันสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

จากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทฤษฎี นำมาทำการทดลองเพื่อยืนยันสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส คือ ความเข้มข้นไซเตียมแอลจินต 3 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น 150 หน่วยต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์

1.5.1 การยืนยันสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

การตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีการทะกุกิ โดยกำหนดสภาวะของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ดังนี้ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น 150 หน่วยต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์

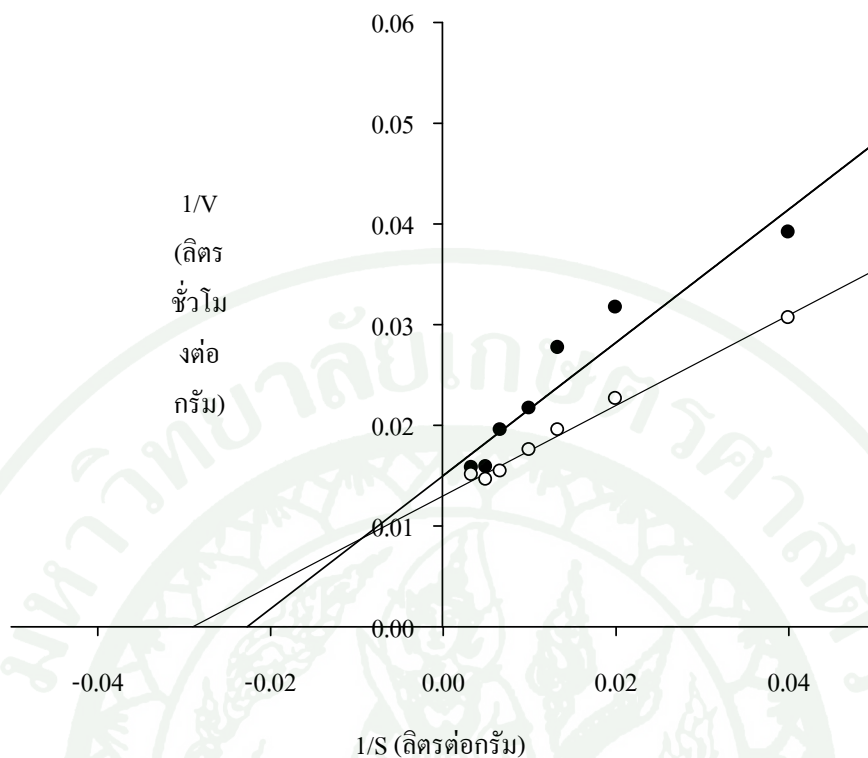
จากผลการทดลองการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีการทะกุกิ แสดงกิจกรรมเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ดังตารางที่ 14 คือ เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์จาก 0.5 โมลาร์ ให้เป็น 1.5 โมลาร์ พบว่า กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นกว่าการทดลองที่ 6 เล็กน้อย ซึ่งแสดงว่า การเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการฟอร์มรูปของเม็ดเจลเอนไซม์ตรึง เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของไอออนในรูปของ Ca^{2+} ในแคลเซียมคลอไรด์จะเป็นการเพิ่มความแข็งแรงของประจุในการจับกันกับโซเดียมแอลจิเนต ซึ่งส่งผลต่อการฟอร์มรูปของเม็ดเอนไซม์ตรึง

ตารางที่ 14 การยืนยันสภาวะการทดลองที่เหมาะสมของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

| การทดลอง | สภาวะที่เหมาะสม | | | กิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) |
|----------|-----------------|-----|-----|---|
| | A | B | C | |
| 1 | 3 | 150 | 1.5 | 29.71 |

2. การประมาณค่าคงที่จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

การประมาณค่าคงที่ไมเคลิส (K_m) และอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุด (V_m) ของเอนไซม์อิสระและตรึง โดยวัดอัตราเร็วปฏิกิริยาเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสที่ความเข้มข้นซูโครสต่าง ๆ โดยกำหนดให้กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้นคงที่ นำมาหาค่าคงที่จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์โดยวิธีการเขียนกราฟแบบไลวีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plots) ระหว่างส่วนกลับของอัตราเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้นและส่วนกลับของความเข้มข้นซูโครสดังแสดงในภาพที่ 8 (ข้อมูลจากการทดลองแสดงดังตารางผนวกที่ ก1 และ ก2)



ภาพที่ 8 การประมาณค่าคงที่ของปฏิกิริยาเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสโดยใช้กราฟแบบไลวีเวอร์-เบิร์กของเอนไซม์อิสระ (○) และ เอนไซม์ตรึง (●)

จากภาพที่ 8 พบว่าค่าจุดตัดแกน X ของกราฟมีค่าเท่ากับ $-1/K_m$ และจุดตัดแกน Y เท่ากับ $1/V$ ประมาณค่าคงที่ไมเคลิสของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงได้เท่ากับ 34.50 และ 43.16 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 0.10 และ 0.13 โมลาร์และอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงเท่ากับ 76.92 และ 65.79 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงตามลำดับดังแสดงค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ประมวลค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสอิสระและตรึง

| ชนิดของเอนไซม์ | การประมวลค่าคงที่ | |
|----------------|--|-------|
| เอนไซม์อิสระ | $V_{m(\text{free})}$ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง) | 77.52 |
| | $K_{m(\text{free})}$ (กรัมต่อลิตร) | 34.97 |
| | $K_{m(\text{free})}$ (โมลาร์) | 0.10 |
| เอนไซม์ตรึง | $V_{m(\text{imm})}$ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง) | 65.79 |
| | $K_{m(\text{imm})}$ (กรัมต่อลิตร) | 43.16 |
| | $K_{m(\text{imm})}$ (โมลาร์) | 0.13 |

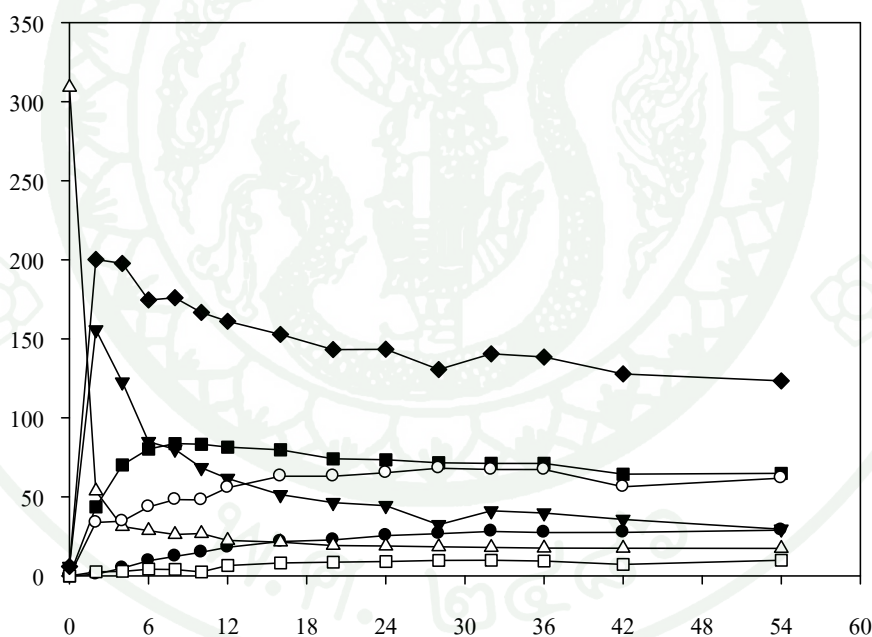
จากตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ตรึงมีค่าคงที่ไมเคลิส (K_m) ที่สูงกว่าเอนไซม์อิสระ ซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถในการจับกัน (affinity) ระหว่างเอนไซม์ที่ถูกตรึงกับซับสเตรตได้ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระกับซับสเตรต นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุด (V_m) ของเอนไซม์ตรึงต่ำกว่าของเอนไซม์อิสระ ซึ่งแสดงถึงว่าเอนไซม์ตรึงมีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยากับซับสเตรตและเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ โดยมีสาเหตุมาจากการแพร่ของซับสเตรตเข้าจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่งเร่ง (active site) ภายในโครงสร้างของเม็ดเจล ได้ยากกว่าเอนไซม์อิสระ และอาจเกิดการสะสมของผลิตภัณฑ์ได้ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเกิดผลิตภัณฑ์ได้ (Anwar *et al.*, 2009)

เปรียบเทียบค่าคงที่จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสเมื่อใช้ชูโครสเป็นซับสเตรตกับผลการทดลองของ Tariseven and Aslan (2005) ที่ประมวลค่าจลนพลศาสตร์เอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสเมื่อใช้ความเข้มข้นชูโครส 10 ถึง 100 กรัมต่อลิตร พบว่าเอนไซม์อิสระมีค่าคงที่ไมเคลิส $K_{m(\text{free})}$ และ อัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุด $V_{m(\text{free})}$ เท่ากับ 47.0 กรัมต่อลิตรและ 86.0 กรัมต่อลิตร นาที ส่วนเอนไซม์ตรึงมีค่า $K_{m(\text{imm})}$ และ $V_{m(\text{imm})}$ เท่ากับ 91.0 กรัมต่อลิตรและ 82.0 กรัมต่อลิตร นาทีที่จะเห็นได้ว่าการทดลองนี้ประมวลค่าคงที่ไมเคลิส (K_m) ของทั้งเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงได้ต่ำกว่าค่าของ Tariseven and Aslan (2005) ซึ่งแสดงว่าค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของทั้งเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงในส่วนของค่าคงที่ไมเคลิสให้ค่าที่ดีกว่า แต่ค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุด (V_m) ของทั้งเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงได้ค่าที่ต่ำกว่าค่าของ Tariseven and Aslan (2005) แสดงถึงความเร็วในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ตรึงกับซับสเตรตและเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้ต่ำกว่า

3. ผลิตฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์บีตา-ฟรุทโทฟูราโนซิเดส

3.1 ผลิตฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุทโทฟูราโนซิเดสแบบเปิดเสรี

เตรียมสารละลายซูโครสให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 300 กรัมต่อลิตร เติมเอนไซม์ให้มีกิจกรรมเอนไซม์ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยบัฟเฟอร์ Sodium acetate ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5 ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 300 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร และทำการผลิตที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 54 ชั่วโมง สรุปผลการทดลองได้ดังภาพที่ 9 และตารางที่ 15



ภาพที่ 9 การผลิตฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์อิสระแบบเปิดเสรีระดับพลาสติก

ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส (Δ) กลูโคส (○) ฟรุทโทส (□) 1-เฟสโทส (▼) นีสโทส (■) 1^F-ฟรุทโทฟูราโนซิลนีสโทส (●) และฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (◆)

ตารางที่ 16 จลนพลศาสตร์ของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสแบบเบ็ดเสร็จ

| พารามิเตอร์ | |
|--|--------|
| อัตราการใช้ซับสเตรตเชิงปริมาณ; Q_s (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง) | 127.73 |
| อัตราการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เชิงปริมาณ; Q_p (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง) | 97.18 |
| ผลได้ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์; Y_{ps} (กรัมต่อกรัม) | 0.76 |

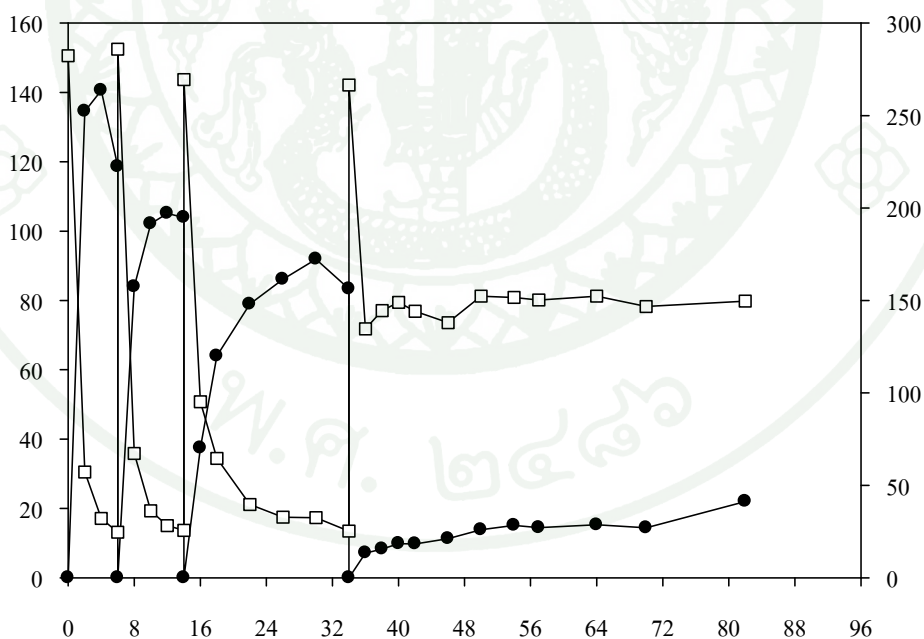
หมายเหตุ วิธีคำนวณแสดงในตารางผนวกที่ ข2(คำนวณที่เวลา 0-2 ชั่วโมงของการผลิต)

จากภาพที่ 9 และตารางที่ 16 แสดงปริมาณฟรุกโทส กลูโคส ซูโครส และฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่ได้จากการนำเอนไซม์อิสระมาย่อยซูโครสเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเลส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น กลูโคสและฟรุกโทส และปฏิกิริยาฟรุกโทซิลทรานส์เฟอเรสจะทำการย้ายหมู่ฟรุกโทสไปต่อที่ตำแหน่ง บีตา 2,1 ของซูโครส โดยพบว่าที่เวลา 2 ชั่วโมง เกิดฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 200.3 กรัมต่อลิตร และพบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเอนไซม์จะทำการย้ายหมู่ของจาก 1-kestose (GF_2) ไปเป็นนิสโทส (GF_3) และ 1-ฟรุกโทฟูราโนซิลนิสโทส (GF_4) ตามลำดับ โดยที่เวลา 8 และ 54 ชั่วโมง พบว่ามีการเปลี่ยน 1-kestose ไปเป็นนิสโทสและ 1-ฟรุกโทฟูราโนซิลนิสโทสมากที่สุดเท่ากับ 83.7 และ 29.0 ตามลำดับ (ข้อมูลจากการทดลองแสดงดังตารางที่ภาคผนวกที่ ก3)

3.2 ผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสแบบเบ็ดเสร็จซ้ำ ในระดับฟลาสก์

ผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบเบ็ดเสร็จซ้ำด้วยเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ระดับฟลาสก์ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นซับสเตรต 300 กรัมต่อลิตร และกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 สรุปผลการทดลองได้ดังภาพที่ 10 และตารางที่ 16

เตรียมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร โดยชั่งซูโครส 90 กรัมละลายในบัฟเฟอร์ Sodium acetate ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5 ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 300 มิลลิลิตร เตรียมเอนไซม์ตรีงให้มิกิจกรรมเอนไซม์ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยนำเอนไซม์ตรีงมา 100 มิลลิลิตร (โดยการแทนที่น้ำ) จากนั้นเติมสารละลายซูโครสลงในเอนไซม์ตรีงที่เตรียมไว้แล้วผสมให้เข้ากัน ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร และทำการผลิตที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำตัวอย่างมาต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ หลังจากนั้นกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองขนาดของรูเท่ากับ 0.45 ไมครอน ก่อนทำการวิเคราะห์หปริมาณน้ำตาลต่าง ๆ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง และเมื่ออัตราการใช้ซับสเตรตจะลดลงจะทำการเติมสารละลายซูโครสเข้าไปใหม่โดยกรองเม็ดเอนไซม์ตรีงออก แล้วนำไปล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 พร้อมคนด้วยเครื่องกวนเป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำเม็ดเอนไซม์ตรีงที่ได้มาเติมลงในสารละลายซูโครสที่เตรียมไว้ใหม่เพื่อทำการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ซึ่งงานกว่าอัตราการใช้ซับสเตรตจะลดลง



ภาพที่ 10 การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์ตรีงแบบเบ็ดเสร็จซ้ำระดับพลาสติก ความเข้มข้นน้ำตาลฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (●) และซูโครส (□)

ตารางที่ 17 จลนพลศาสตร์ของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์ตรีงปีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสแบบเบ็ดเสร็จซ้ำ

| รอบของการผลิต | พารามิเตอร์ | | |
|---------------|-------------|-------|-----------|
| | Q_s | Q_p | $Y_{p/s}$ |
| รอบที่ 1 | 135.06 | 96.69 | 0.72 |
| รอบที่ 2 | 109.33 | 42.01 | 0.41 |
| รอบที่ 3 | 87.15 | 18.74 | 0.39 |
| รอบที่ 4 | 65.94 | 3.58 | 0.19 |

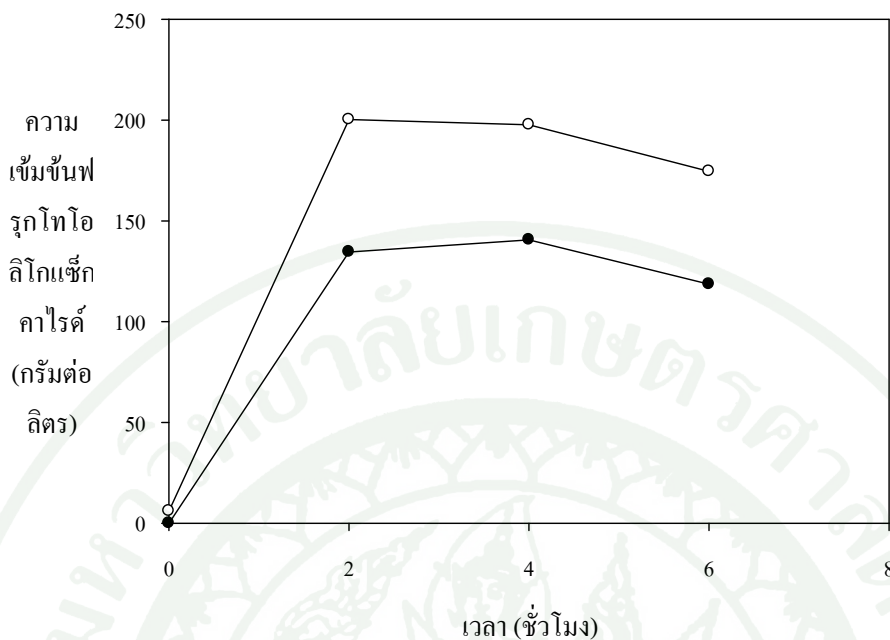
หมายเหตุ วิธีการคำนวณแสดงในตารางผนวกที่ ข2

อัตราการใช้ซับสเตรตเชิงปริมาตร; Q_s (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง) และอัตราการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เชิงปริมาตร; Q_p (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง) ของรอบที่ 1 ถึง 4 ได้จากการคำนวณที่เวลา 0-2 ชั่วโมงของการผลิต

ผลได้ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์; $Y_{p/s}$ (กรัมต่อกรัม) ได้จากการคำนวณที่เวลา (รอบที่ 1) 0-2 ชั่วโมง (รอบที่ 2) 0-4 ชั่วโมง (รอบที่ 3) 0-16 ชั่วโมง และ (รอบที่ 4) 0-48 ชั่วโมง

ผลการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์ตรีงปีตาด้วยการผลิตแบบเบ็ดเสร็จซ้ำแสดงดังภาพที่ 10 และตารางที่ 17 โดยพบว่าการผลิตในรอบแรกให้ผลการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ดีที่สุด จากนั้นการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จะค่อย ๆ ลดลงในรอบต่อไป รวมทั้งการผลิตในแต่ละรอบจะใช้เวลานานขึ้นด้วย โดยเอนไซม์ตรีงปีตาที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมจากวิธีหาคูสามารถผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ 4 รอบ และเมื่อดูจากค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิต ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์พบว่าอัตราการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เชิงปริมาตร (Q_p) และอัตราการการใช้ซับสเตรตเชิงปริมาตร (Q_s) มีค่าลดลงในแต่ละรอบของการผลิต นอกจากนี้เอนไซม์ตรีงปีตาจะผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ช้ากว่าเอนไซม์อิสระและผลิตได้ในปริมาณที่น้อยกว่า ซึ่งมีผลมาจากการแพร่ของซับสเตรตเข้าไปจับกับเอนไซม์ภายในเม็ดเจลได้ยากกว่าเอนไซม์อิสระ

จากนั้นเปรียบเทียบผลการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรีงปีตาแบบเบ็ดเสร็จ ที่เวลา 6 ชั่วโมง สรุปผลการทดลองได้ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 เปรียบเทียบการผลิตฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงปีตาฟรุทโทฟูราโนซิเดส

ความเข้มข้นฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์อิสระ (○) และ เอนไซม์ตรึง (●)

จากภาพที่ 11 แสดงปริมาณฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่ได้จากการนำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงมาย่อยซูโครสเกิดปฏิกิริยาไฮโดรเลส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและฟรุทโทส จากนั้นจะทำการย้ายหมูฟรุทโทสไปต่อที่ตำแหน่ง บีตา 2,1 ของซูโครส โดยพบว่า ฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์อิสระกับซูโครส ให้ความเข้มข้นฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 200.3 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 2 ชั่วโมง ขณะที่ฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ตรึงกับซูโครส ให้ความเข้มข้นฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 195.8 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 4 ชั่วโมง และพบว่า การผลิตฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์อิสระ ให้ความเข้มข้นฟรุทโทโอลิโกแซ็กคาไรด์มากกว่าการผลิตด้วยเอนไซม์ตรึง 1.5 เท่า

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสเพื่อผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีข้อดี คือ ทำให้เอนไซม์มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และพีเอช เป็นต้น และสามารถนำเอนไซม์ตรึงกลับมามีใช้ในการผลิตซ้ำได้โดยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสโดยใช้วิธีหะกุกิและศึกษาผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบเบ็ดเสร็จซ้ำ เพื่อทดสอบความสามารถเอนไซม์ตรึงต่อสภาวะการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

จากการการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสโดยใช้วิธีหะกุกิ โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ด้วยแคลเซียมแอลจินेट 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेट กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้นและความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์พบว่าความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेट 3.0 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น 150 หน่วยต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์ ให้กิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสเท่ากับ 29.71 หน่วยต่อมิลลิลิตร และพบว่าทุกปัจจัยมีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ความเข้มข้นโซเดียมแอลจินेटมีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดสมากที่สุด

การศึกษากการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบเบ็ดเสร็จซ้ำภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีหะกุกิในระดับพลาสก์ พบว่าในรอบแรกของการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จะให้ผล การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ดีที่สุดเท่ากับ 195.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1-เคสโทส 122.4 กรัมต่อลิตร นิสโทส 67.7 กรัมต่อลิตร และ 1^F-ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส 5.6 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จะค่อย ๆ ลดลงในรอบต่อ ๆ ไป รวมทั้งการผลิตในแต่ละรอบจะใช้เวลาเพิ่มขึ้นด้วย โดยเอนไซม์ตรึงที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมจากวิธีหะกุกิสามารถผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ 4 รอบ โดยมีอัตราการใช้ซับสเตรตเชิงปริมาณและอัตราการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เชิงปริมาณเท่ากับ 96.69 และ 135.96 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง และผลได้ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เท่ากับ 0.72 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการตรึงเอนไซม์ด้วยแอลจินเตตด้วยวิธีห่อหุ้มภายในเจล (entrapment) ให้กิจกรรมเอนไซม์ตรึงไม่ดีนัก ดังนั้นการใช้สารเชื่อมไขว้ เช่น กลูทาร์ลดีไฮด์ (glutaraldehy) ใช้สารประกอบพอลิเอมีน เช่น พอลิเอทิลีนอิมิน พอลิโพรพิลีนอิมิน น่าจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการตรึงเอนไซม์ให้ดีขึ้น(ภาวิณี, 2537) และจากการศึกษาของ Prashanthand Mulimani (2005) พบว่าการใช้กลูทาร์ลดีไฮด์ 1 เปอร์เซ็นต์ มาใช้เป็นตัวเชื่อมไขว้หลังจากการตรึงเอนไซม์ β -galactosidase ด้วยแอลจินเตตจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ตรึงมีความคงตัวมากขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิตติพงษ์ รัตนกรกุล. 2547. การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์บีต้าฟรุกโทฟูเรโนซิเดสที่ถูกตรึงด้วยวิธีการห่อหุ้ม (Entrapment) ในแคลเซียมโซเดียมแอลจีเนต. เทคนิควิจัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปราณีอ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหารตอนที่ 1. ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ภาวิณี คณาสวัสดิ์. 2537. การตรึงเอนไซม์และเซลล์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สุภาพรบุญเที่ยง. 2544. การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีทางเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล 2551. วิศวกรรมกระบวนการหมัก กรรมวิธีการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วรสิทธิ์ โทจำปา และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2551. วิศวกรรมเคมีชีวภาพ พื้นฐาน 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Anwar, A., S. A. U. Qader, A. Raiz, S. Iqbal and A. Azhar. 2009. Calcium Alginate: A Support Material for Immobilization of Proteases from Newly Isolated Strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. **World App. Sciences Jour.** 7 (10): 1281-1286.

Bisswanger, H. 2002. **Enzyme kinetics : principles and methods.** Weinheim : Wiley-VCH, Germany.

- Cheng, T.C., K.J. Duan and D.C. Sheu. 2005. Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* on chitosan using tris (hydroxy methyl) phosphine or glutaraldehyde as a coupling agent. **Biotechnol.Lett.** 27: 335-338.
- Crittenden, R.G. and M.J. Playne. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends Food Sci Tech.** 7:353-361.
- Csanádi, Zs. and Cs. Sisak. 2006. Immobilization of Ultra SP-L pectinase and its application to production of fructooligosaccharides. **Acta.Aliment. Hung.** 35: 205-212.
- Ghazi, I., A.G. De Segura, L.F. Arrojo, M. Alcalde, M. Yates, M.L.R. Cervantes, F.J. Plou and A. Ballesteros. 2005. Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. **J. Mol.Catal. B-Enzym.** 35: 19-27.
- Hang, Y.D. and E.E. Woodams. 1996. Optimization of enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. **Lebensm.Wiss. Technol.** 29:578–580.
- Hernalsteens, S. and F. Maugeri. 2008. Properties of thermostable extracellular FOS-producing fructofuranosidase from *Cryptococcus* sp. **Eur. Food Res.Technol.** 228: 213–221.
- Hussein, H.S., J.M. Campbell, L.L. Bauer, G.C. Fahey, A.J.C. Lewis Hogarth, B.W. Wolf and D.E. Hunter. 1998. Selected Fructooligosaccharide Composition of Pet-Food Ingredients. **J. Nutr.** 128: 2803S–2805S.
- Kim, B.W., H.J. Kwon, H.Y. Park, S.W. Nam, J.P. Park and J.W. Yun. 2000. Production of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Bioprocess Eng.** 23: 11-16.

- Nishizawa, M., R. Masumoto, K. Maguma, A. Kamata, E. Saito, N. Ukita and T. Komaki. 2010. Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae* KB. **J. Agric. Food Chem.** 58: 488–492.
- Oku, T. and S. Nakamura. 2002. Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. **Pure Appl. Chem.** 74: 1253–1261.
- Onderkovà, Z., J. Bryjak and M. Polakovič. 2007. Properties of fructosyltransferase from *Aureobadium pullulans* immobilized on an acrylic carrier. **Chem. Pep.** 61(5): 359-363.
- Prashanth, S.J. and V. H. Mulimani. 2005. Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* α -galactosidase immobilized in calcium alginate. **Process Biochem.** 40: 1199-1205. Cited Ates, S. and U. Mehmetoglu. 1997. A new method for immobilization of β -galactosidase and its utilization in a plug flow reactor. **Process Biochem.** 32: 433-436.
- Roy, R.K. 2001. **Design of Experiments using the Taguchi Approach.** John Wiley & Sons, Inc.
- Sánchez, O.F., A.M. Rodriguez, E. Silva and L.A. Caicedo. 2010. Sucrose biotransformation of fructooligosaccharides by *Aspergillus* sp. N74 free cells. **Food Bioprocess Tech.** 3:662-673.
- Sangeetha, P.T., M.N. Ramesh and S.G. Prapulla. 2005a. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. **Trends Food Sci Tech.** 16:442–457.
- Scholz-Ahrens, K.E. and J. Schrezenmeir. 2007. Inulin and oligofructose and mineral metabolism: The Evidence from Animal Trials. **J. Nutr.** 137: 2513–2523.

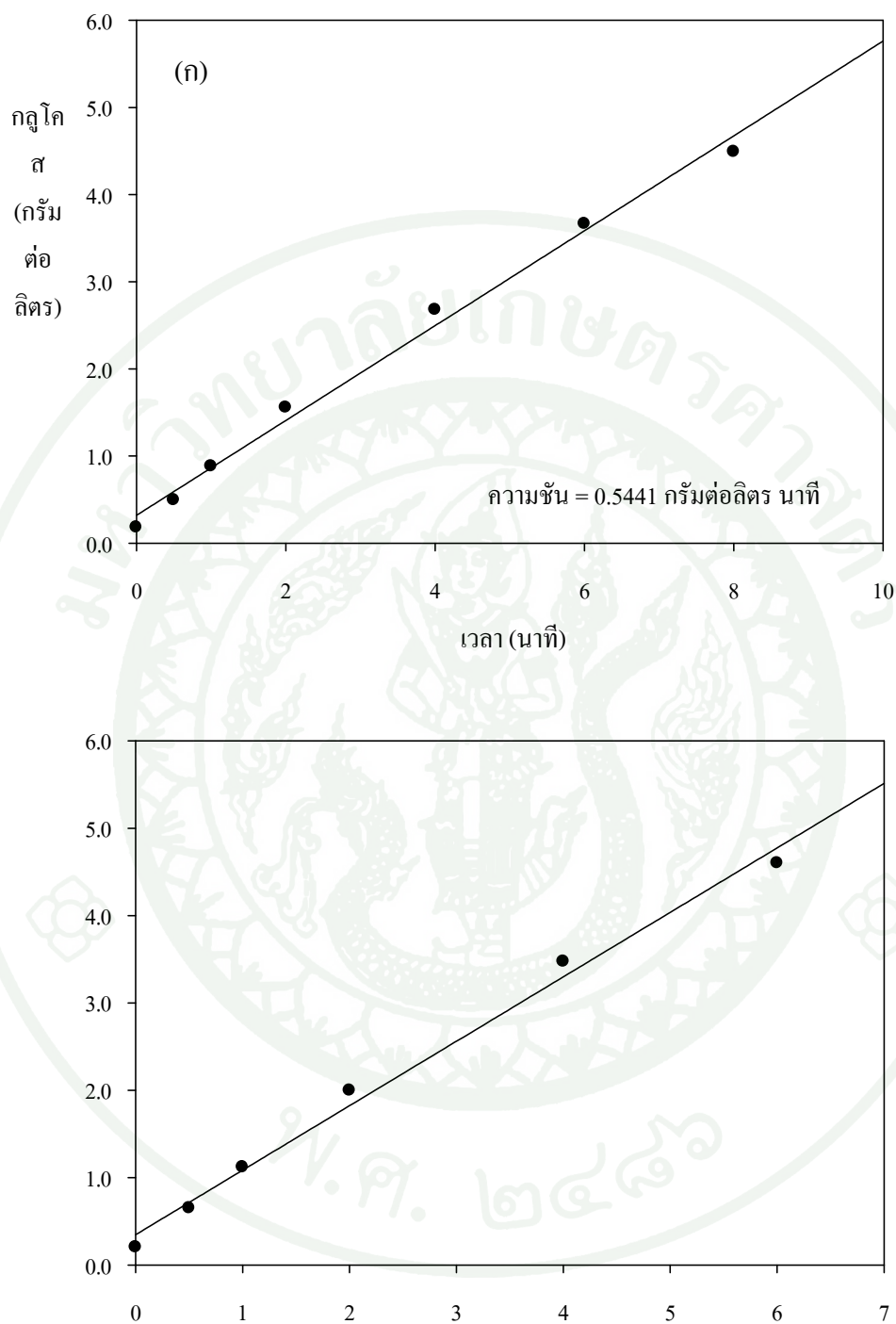
- Sirisansaneeyakul, S., S. Lertsiri, P. Tonsagunrathanachai and P. Luangpituksa. 2000. Enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 34: 262-269.
- Tariseven, A. and Y. Aslan. 2005. Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. **Enzyme Microb. Tech.** 36:550-554.
- Wayne, R.G. and S.F. Wee. 1998. Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliver Rev.**31: 267-285.
- Yoshikawa, J., S. Amachi, H. Shinoyama and T. Fujii. 2007. Purification and some properties of β -fructofuranosidaseformed by *Aureobasidium pullulans* DSM 2402. **J. Biosci. Bioeng.** 103 (5): 491-493.
- Yun, J.W. 1996. Fructooligosaccharides-occurrence, preparation and application.**Enzyme Microb. Tech.** 19: 107-117.
- Ziemer, C.J. and G.R. Gibson. 1998. An Overview of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in the Functional Food Concept: Perspectives and Futere Strategies. **Int. Dairy J.** 8: 473-479.



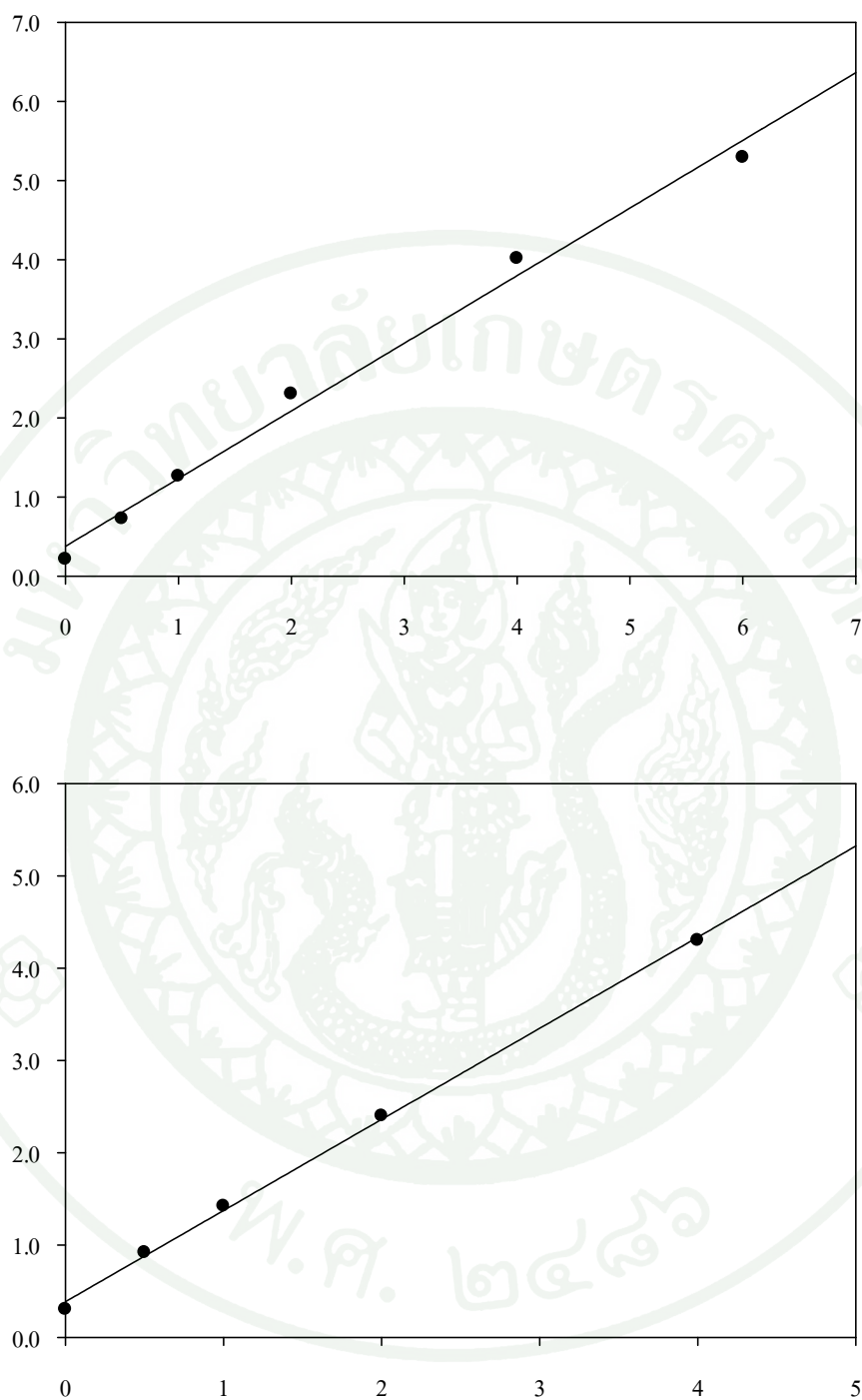
ภาคผนวก



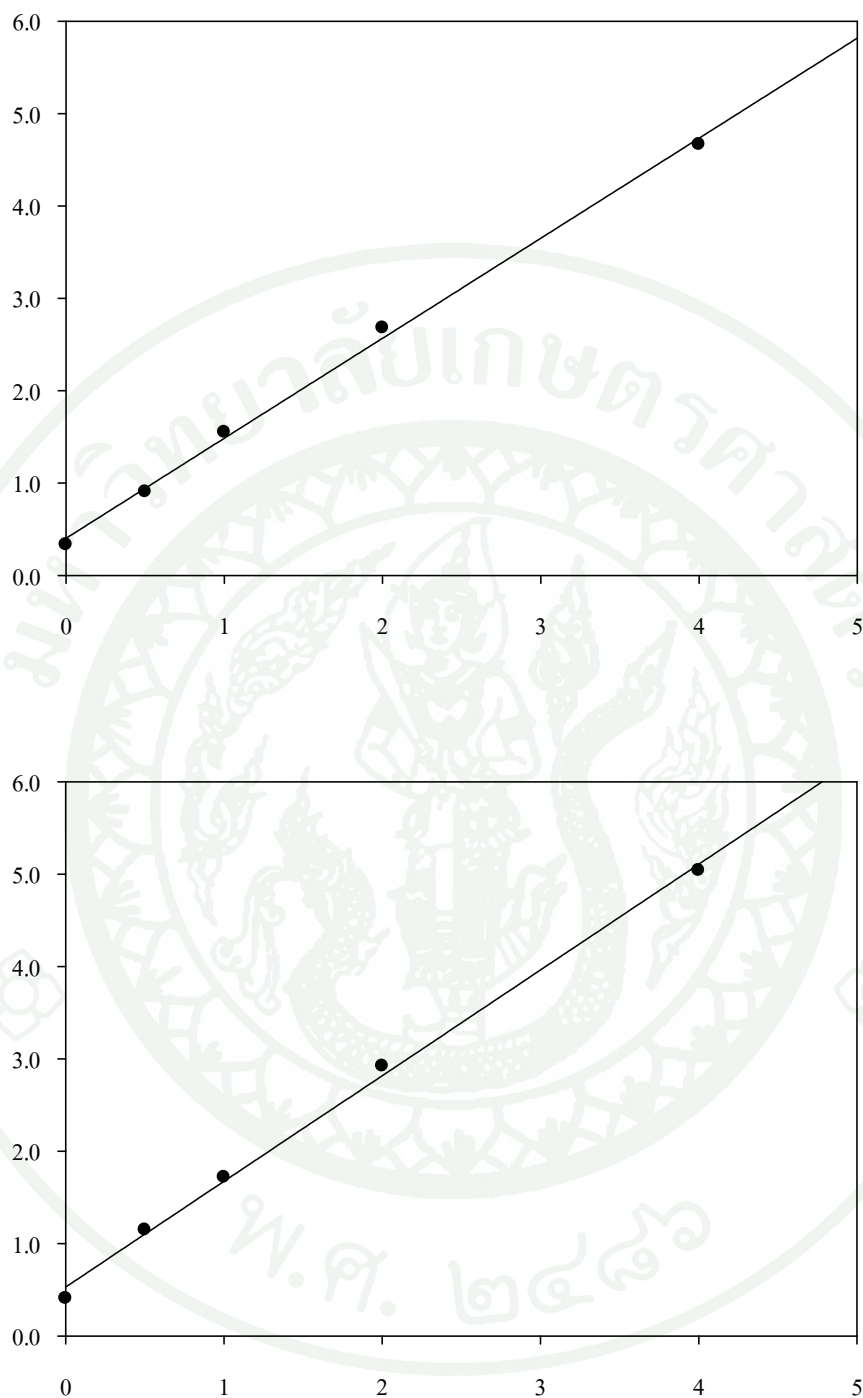
ภาคผนวก ก
ข้อมูลจากการทดลอง



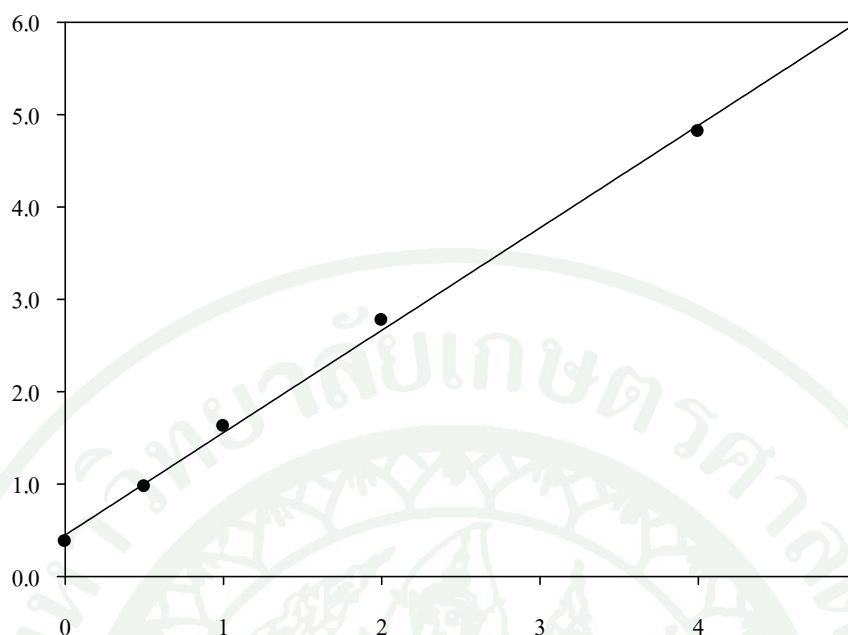
ภาพผนวกที่ ๑ การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส (ก) 25 และ (ข) 50 กรัมต่อลิตร



ภาพผนวกที่ ก2การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์อิสระบิตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส (ค) 75และ(ง) 100 กรัมต่อลิตร



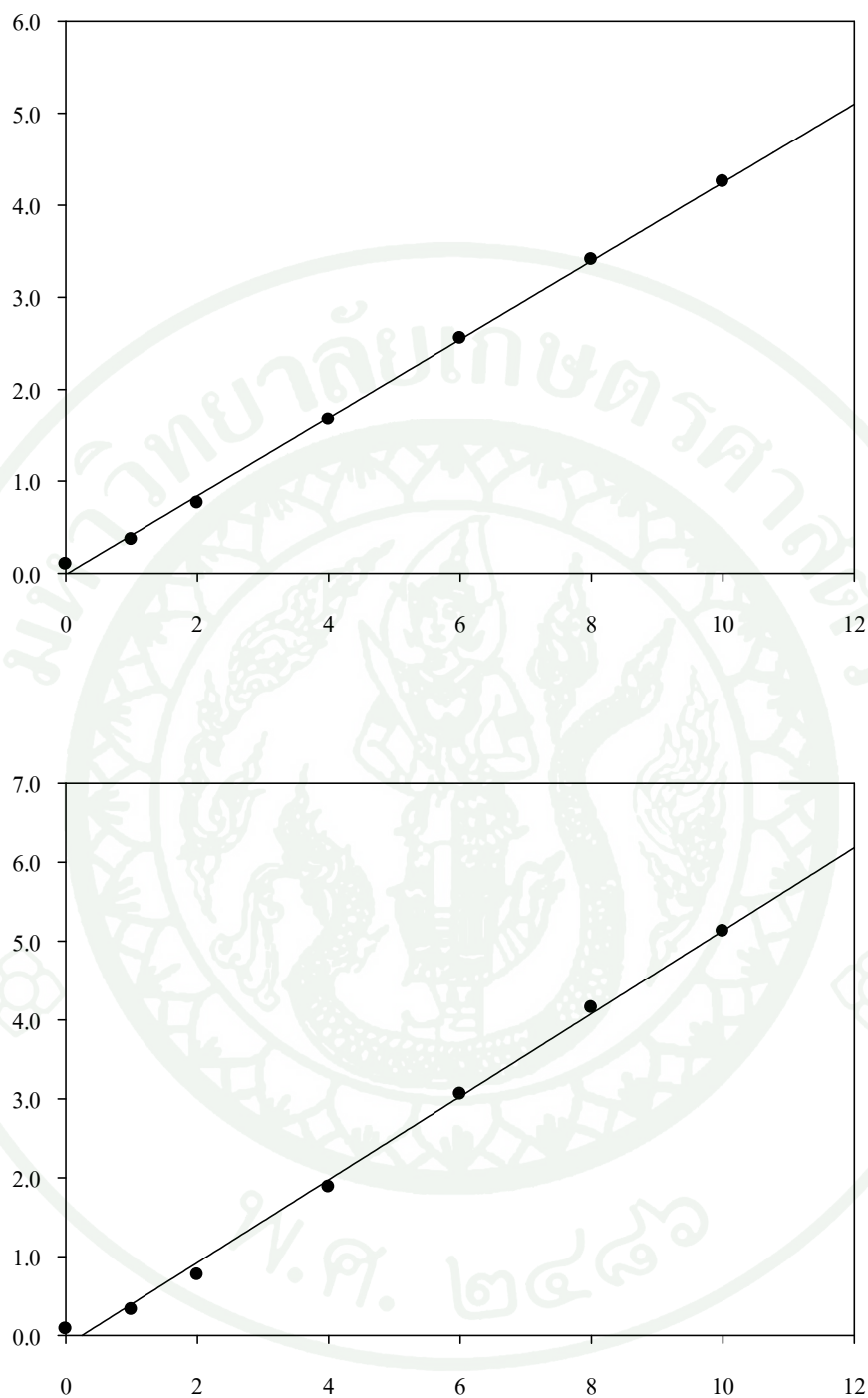
ภาพผนวกที่ ๓3 การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนไซด์ ที่ความเข้มข้นซูโครส (จ) 150 และ (ข) 200 กรัมต่อลิตร



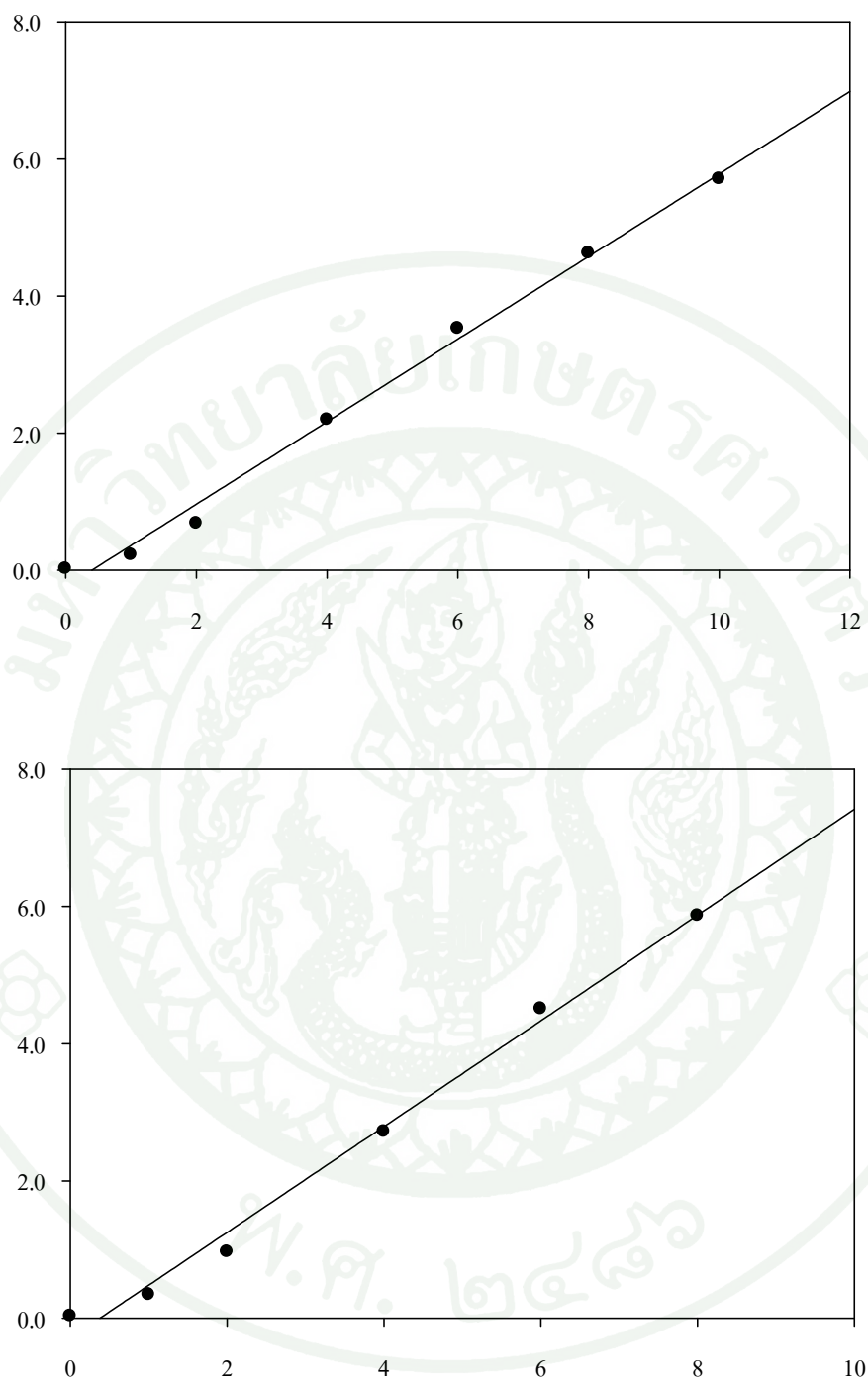
ภาพผนวกที่ 4 การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส (ซ) 300 กรัมต่อลิตร

ตารางผนวกที่ 1 ค่าความเข้มข้นของซับสเตรตกับอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์อิสระบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

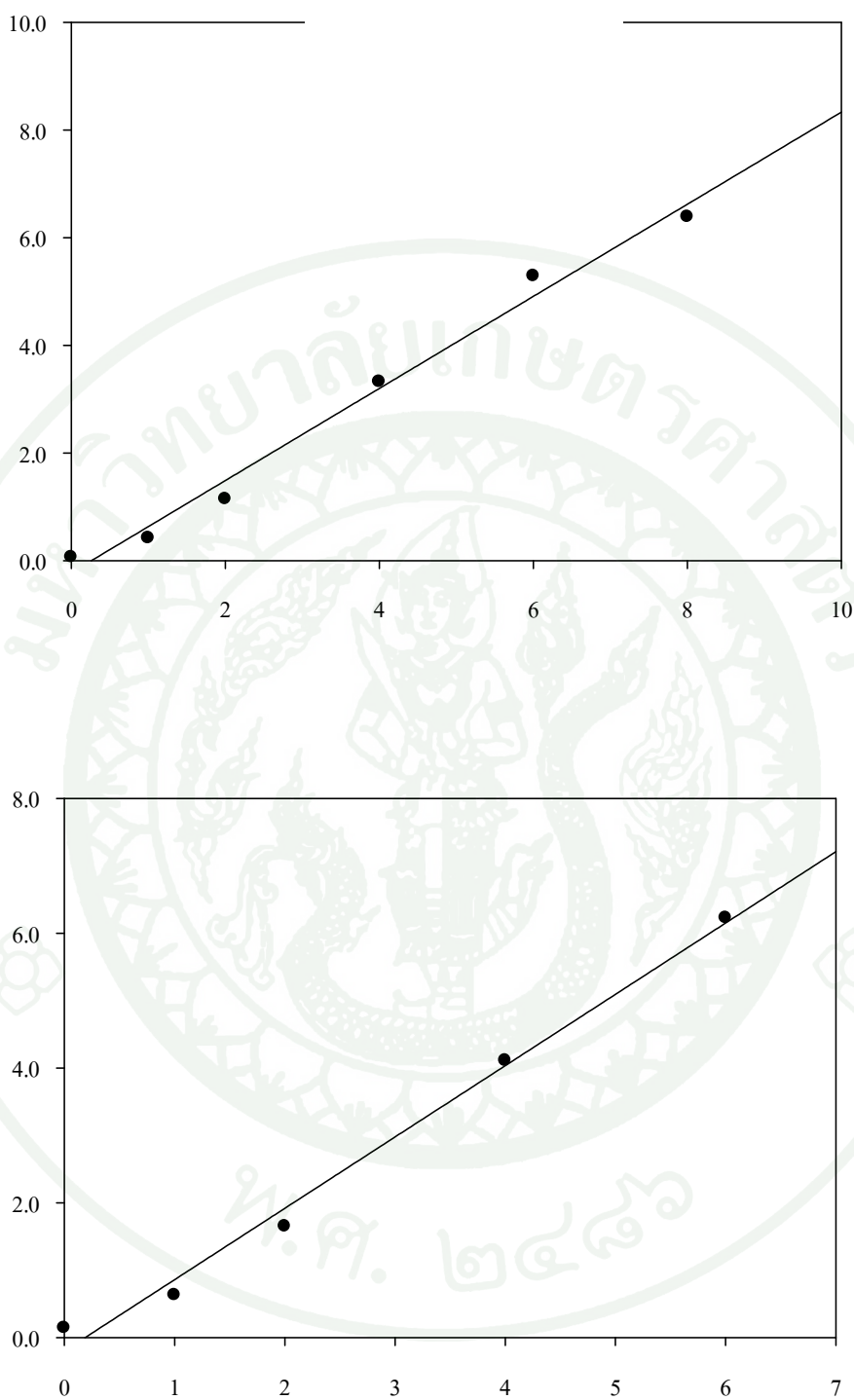
| ซูโครส [S] (กรัมต่อลิตร) | อัตราเร็วเริ่มต้น $[V_0]$ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง) | 1/S (ลิตรต่อกรัม) | 1/V (ลิตร ชั่วโมงต่อกรัม) |
|-----------------------------|--|----------------------|------------------------------|
| 25 | 32.6460 | 0.0400 | 0.0306 |
| 50 | 44.2740 | 0.0200 | 0.0226 |
| 75 | 51.3120 | 0.0133 | 0.0195 |
| 100 | 59.2380 | 0.0100 | 0.0175 |
| 150 | 64.9800 | 0.0067 | 0.0154 |
| 200 | 68.6580 | 0.0050 | 0.0146 |
| 300 | 66.5100 | 0.0033 | 0.0150 |



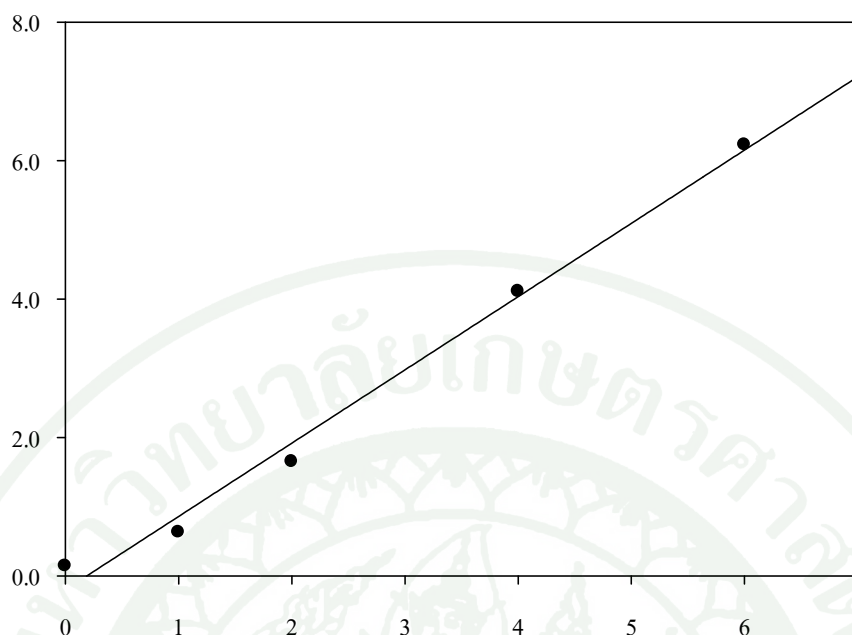
ภาพผนวกที่ ๓ การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอทิลอะซิเตท-ฟรุกโทฟูราโนไซด์ ที่ความเข้มข้นซูโครส (ก) 25 และ (ข) 50 กรัมต่อลิตร



ภาพผนวกที่ 6 การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส (ค) 75 และ (ง) 100 กรัมต่อลิตร



ภาพผนวกที่ ๗ การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส (จ) 150 และ (ฉ) 200 กรัมต่อลิตร



ภาพผนวกที่ 8 การประมาณค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส ที่ความเข้มข้นซูโครส (ซ) 300 กรัมต่อลิตร

ตารางผนวกที่ 2 ค่าความเข้มข้นของซับสเตรตกับอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์ตรึงบีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส

| ซูโครส [S] (กรัมต่อลิตร) | อัตราเร็วเริ่มต้น [V ₀] (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง) | 1/S (ลิตรต่อกรัม) | 1/V (ลิตร ชั่วโมงต่อกรัม) |
|-----------------------------|--|----------------------|------------------------------|
| 25 | 25.5600 | 0.0400 | 0.0391 |
| 50 | 31.5780 | 0.0200 | 0.0317 |
| 75 | 36.1440 | 0.0133 | 0.0277 |
| 100 | 46.2420 | 0.0100 | 0.0216 |
| 150 | 51.3360 | 0.0067 | 0.0195 |
| 200 | 63.1800 | 0.0050 | 0.0158 |
| 300 | 63.5280 | 0.0033 | 0.0157 |

ตารางผนวกที่ 3 ผลการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์อิสระแบบเบ็ดเสร็จระดับ
พลาสติก

| เวลา (ชั่วโมง) | ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) | | | | | | |
|-------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|---------|--------|-------|---------|
| | GF ₄ | GF ₃ | GF ₂ | GF | G | F | FOS |
| 0 | 0.000 | 0.000 | 5.939 | 309.154 | 0.000 | 0.000 | 5.939 |
| 2 | 0.909 | 43.664 | 155.721 | 53.698 | 33.792 | 2.520 | 200.294 |
| 4 | 4.910 | 70.199 | 122.652 | 31.240 | 34.512 | 2.869 | 197.761 |
| 6 | 9.508 | 80.201 | 84.922 | 28.639 | 43.655 | 4.297 | 174.631 |
| 8 | 12.338 | 83.680 | 80.003 | 26.175 | 48.289 | 4.030 | 176.021 |
| 10 | 14.993 | 83.239 | 68.483 | 26.761 | 48.052 | 2.400 | 166.715 |
| 12 | 18.044 | 81.436 | 61.649 | 22.457 | 55.736 | 6.585 | 161.129 |
| 16 | 21.755 | 79.756 | 51.385 | 21.302 | 63.085 | 8.113 | 152.897 |
| 20 | 22.760 | 74.028 | 46.342 | 19.290 | 63.079 | 8.665 | 143.130 |
| 24 | 25.468 | 73.449 | 44.481 | 18.826 | 65.237 | 9.004 | 143.398 |
| 28 | 26.682 | 71.580 | 32.310 | 18.368 | 68.175 | 9.710 | 130.571 |
| 32 | 28.116 | 71.158 | 41.160 | 17.994 | 67.202 | 9.896 | 140.434 |
| 36 | 27.489 | 71.198 | 39.718 | 17.526 | 67.234 | 9.337 | 138.406 |
| 42 | 27.597 | 64.357 | 35.796 | 17.468 | 56.384 | 7.286 | 127.750 |
| 54 | 28.963 | 64.894 | 29.532 | 17.355 | 61.815 | 9.812 | 123.390 |

หมายเหตุ ผลิตภัณฑ์สถานะ ซูโครสความเข้มข้นเริ่มต้น 300 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นเอนไซม์อิสระ
บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในพลาสติก
ขนาด 500 มิลลิลิตร ความคมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อ
นาที พีเอช 5.0

G, F, GF, GF₂, GF₃, GF₄ หมายถึง กลูโคสฟรุกโทส ซูโครส 1-เคสโทส นีสโทส และ 1^F-
ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ ก4 การผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเอนไซม์ตรีงแบบเบ็ดเสร็จชำระคัปลาสก์

| รอบที่ | เวลา (ชั่วโมง) | ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) | | | | | | |
|--------|-------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|---------|--------|--------|---------|
| | | GF ₄ | GF ₃ | GF ₂ | GF | G | F | FOS |
| 1 | 0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 282.395 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 2 | 2.49 | 37.596 | 94.485 | 57.233 | 57.494 | 6.620 | 134.574 |
| | 4 | 5.155 | 55.500 | 79.917 | 32.057 | 69.945 | 8.416 | 140.571 |
| | 6 | 7.192 | 54.523 | 56.873 | 24.617 | 74.524 | 10.351 | 118.588 |
| 2 | 0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 285.891 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 2 | 1.046 | 18.049 | 64.916 | 67.239 | 39.353 | 4.431 | 84.012 |
| | 4 | 2.329 | 32.202 | 67.630 | 36.202 | 53.686 | 6.338 | 102.161 |
| | 6 | 3.238 | 40.364 | 61.520 | 28.251 | 62.251 | 7.536 | 105.122 |
| | 8 | 4.161 | 44.595 | 55.204 | 25.685 | 64.225 | 8.518 | 103.960 |
| 3 | 0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 269.472 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 2 | 0.320 | 5.288 | 31.875 | 95.176 | 21.176 | 3.867 | 37.484 |
| | 4 | 0.197 | 12.384 | 51.394 | 64.586 | 37.450 | 4.416 | 63.975 |
| | 8 | 1.067 | 21.219 | 56.688 | 39.607 | 47.374 | 6.202 | 78.973 |
| | 12 | 1.427 | 25.325 | 59.386 | 32.791 | 50.275 | 6.731 | 86.137 |

ตารางผนวกที่ ก4 (ต่อ)

| รอบที่ | เวลา (ชั่วโมง) | ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) | | | | | | |
|--------|-------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|---------|--------|--------|--------|
| | | GF ₄ | GF ₃ | GF ₂ | GF | G | F | FOS |
| 3 | 16 | 1.628 | 28.913 | 61.364 | 32.561 | 50.027 | 6.579 | 91.905 |
| | 20 | 1.636 | 28.008 | 53.694 | 25.228 | 43.798 | 5.196 | 83.338 |
| 4 | 0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 266.560 | 3.283 | 4.915 | 0.000 |
| | 2 | 0.000 | 2.020 | 5.142 | 134.675 | 1.112 | 1.366 | 7.162 |
| | 4 | 0.000 | 2.032 | 6.279 | 144.566 | 3.521 | 2.272 | 8.310 |
| | 6 | 0.000 | 2.115 | 7.741 | 148.998 | 4.771 | 2.345 | 9.855 |
| | 8 | 0.000 | 1.879 | 7.867 | 144.188 | 4.035 | 1.897 | 9.746 |
| | 12 | 0.000 | 2.214 | 9.034 | 138.076 | 3.749 | 1.380 | 11.249 |
| | 16 | 0.000 | 2.354 | 11.516 | 152.364 | 2.626 | 0.000 | 13.870 |
| | 20 | 0.000 | 2.186 | 12.902 | 151.673 | 4.464 | 1.824 | 15.088 |
| | 23 | 0.000 | 2.357 | 12.116 | 150.333 | 4.912 | 1.831 | 14.473 |
| | 30 | 0.000 | 2.197 | 13.115 | 152.337 | 4.700 | 1.199 | 15.312 |
| | 36 | 0.000 | 1.699 | 12.721 | 146.806 | 3.234 | 0.875 | 14.420 |
| 48 | 0.000 | 2.897 | 19.133 | 149.716 | 5.736 | 1.614 | 22.030 | |



ภาคผนวก ข
การประมาณค่าพารามิเตอร์

ตารางผนวกที่ ข1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

| พารามิเตอร์ | สูตรคำนวณ |
|--|--|
| ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) | $SD = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N - 1}}$ |
| เปอร์เซ็นต์อิทธิพลหลัก (% main effect) | $\% \text{ main effect} = \frac{(\text{ค่าอิทธิพลสูงสุด} - \text{ค่าอิทธิพลต่ำสุด})}{\text{ค่าอิทธิพลรวม}} \times 100$ |
| ค่าองศาอิสระของปัจจัย (DOF_{Factor}) | $DOF_{\text{Factor}} = L - 1$ |
| ค่าองศาอิสระรวม (DOF_{Total}) | $DOF_{\text{Total}} = (N \times r) - 1$ |
| ค่าองศาอิสระของความคลาดเคลื่อน (DOF_{Error}) | $DOF_{\text{Error}} = DOF_{\text{Total}} - \text{Total of all factor DOF}$ |
| Correction factor (C.F.) | $(C.F.) = \frac{(\sum y)^2}{N}$ |
| Sum square of factor (SS_{Factor}) | $SS_{\text{Factor}} = \sum_{k=1}^L \left(\frac{y_k^2}{N} \right) - C.F.$ |
| Sum square of total (SS_{Total}) | $SS_{\text{Total}} = \sum y^2 - C.F.$ |
| Sum square of error (SS_{Error}) | $SS_{\text{Error}} = SS_{\text{Total}} - \sum SS_{\text{Factor}}$ |

ตารางผนวกที่ ข1(ต่อ)

| พารามิเตอร์ | สูตรคำนวณ |
|--|---|
| Variance of factor (V_{Factor}) | $V_{\text{Factor}} = \frac{SS_{\text{Factor}}}{DOF_{\text{Factor}}}$ |
| Variance of error (V_{Error}) | $V_{\text{Error}} = \frac{SS_{\text{Error}}}{DOF_{\text{Error}}}$ |
| Variance of ratio; F-ratio (F) | $F\text{-ratio} = \frac{V_{\text{Factor}}}{V_{\text{Error}}}$ |
| Pure sum (S') | $S' = SS_{\text{Factor}} - (V_{\text{Error}} \times DOF_{\text{Factor}})$ |
| Percent contribution (P) | $P = \frac{100 \times S'}{SS_{\text{Total}}}$ |
| Confidence | $\text{Confidence} = 100 - F_{\text{DIST}}(F\text{-Ratio}, DOF_{\text{Factor}}, DOF_{\text{Error}}) \times 100$ |

หมายเหตุ, N, r, L และ k หมายถึง ผลการทดลอง จำนวนการทดลอง จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง
จำนวนระดับของปัจจัย และระดับของปัจจัยตามลำดับ

F_{DIST} เป็นค่าที่คำนวณ โดยใช้ฟังก์ชันสำเร็จรูปในโปรแกรม Excel โดยเป็นความสัมพันธ์
ระหว่าง F-Ratio, DOF_{Factor} และ DOF_{Error}

การคำนวณค่าอัตราส่วน S/N

การตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมจัดอยู่ในประเภท bigger is better มีสูตรการคำนวณค่าอัตราส่วน S/N คือ

$$\text{S/N ratio} = -10 \times \log \left[\frac{\sum \left(\frac{1}{y} \right)^2}{N} \right]$$

โดย y , y_0 และ N หมายถึง ผลการทดลอง ผลการทดลองที่กำหนด และจำนวนการทดลองตามลำดับ

การประมาณค่าคาดหวังภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทฤษฎี

(ก) กรณีการประมาณค่าคาดหวังที่อยู่ในรูปของอัตราส่วน S/N ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีการทฤษฎี

กรณีของการตรึงเอนไซม์บีตา-ฟรุกโทฟูราโนซิเดส พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมอยู่ในประเภท bigger is better ดังนั้น การประมาณค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทฤษฎี อาศัยสมการดังต่อไปนี้

$$Y_{\text{opt}} = \bar{Y} + (\bar{A}_2 - \bar{Y}) + (\bar{B}_3 - \bar{Y}) + (\bar{C}_3 - \bar{Y})$$

โดย โดย Y_{opt} , \bar{Y} และ $\bar{A}_2, \bar{B}_3, \bar{C}_3$ คือ ค่าคาดหวัง ผลรวมทั้งหมดของค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ในทุกชุดการทดลอง และค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองในแต่ละปัจจัย (A B และ C) ที่ระดับของปัจจัยที่เหมาะสม ตามลำดับ ดังนั้น

$$Y_{\text{opt}} = 19.956 + (25.935 - 19.956) + (23.241 - 19.956) + (23.174 - 19.956)$$

$$Y_{\text{opt}} = 32.437 \text{ dB}$$

ค่าคาดหวังที่ได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีการทฤษฎีจะอยู่ในรูปของอัตราส่วน S/N มีหน่วยเป็นเดซิเบล (dB) ดังนั้น ผลลัพธ์ที่ได้จะถูกแปลงค่ากลับจากอัตราส่วน S/N ไปเป็นค่าคาดหวังจริง ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$Y_{\text{opt}} = -10 \log (\text{MSD})$$

ดังนั้น

$$32.437 = -10 \log (\text{MSD})$$

$$\text{MSD} = 10^{(-32.437/10)}$$

$$\text{MSD} = 0.000571$$

จากนั้นแทนค่า MSD ในสมการ

$$\text{MSD} = \frac{\left(\frac{1}{Y_1^2}\right) + \left(\frac{1}{Y_2^2}\right) + \dots + \left(\frac{1}{Y_n^2}\right)}{N}$$

$$\text{MSD} = \frac{1}{Y_{\text{opt}}^2}$$

$$Y_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{1}{\text{MSD}}}$$

$$Y_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{1}{0.000571}}$$

$$Y_{\text{opt}} = 41.865 \text{ หน่วยต่อมิลลิเมตร}$$

(ข) กรณีการประมาณค่าคาดหวังที่อยู่ในรูปของค่าเฉลี่ยภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีการทฤษฎี

การประมาณค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรีงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทฤษฎีอาศัยสมการดังต่อไปนี้

$$Y_{opt} = \bar{T} + (\bar{A}_2 - \bar{T}) + (\bar{B}_3 - \bar{T}) + (\bar{C}_3 - \bar{T})$$

โดย Y_{opt} , \bar{T} และ $\bar{A}_2, \bar{B}_3, \bar{C}_3$ คือ ค่าคาดหวัง ผลรวมทั้งหมดของค่าเฉลี่ยในทุกชุดการทดลอง และค่าเฉลี่ยของผลการทดลองในแต่ละปัจจัย (A B และ C) ที่ระดับของปัจจัยที่เหมาะสมตามลำดับ ดังนี้

$$Y_{opt} = 13.168 + (20.763 - 13.168) + (16.794 - 13.168) + (16.038 - 13.168)$$

$$Y_{opt} = 27.256 \text{ หน่วยต่อมิลลิลิตร}$$

ตารางผนวกที่ ข2 การคำนวณค่าพารามิเตอร์สำหรับการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

| พารามิเตอร์ | สูตร |
|---|--|
| อัตราการใช้ซับสเตรตเชิงปริมาตร; Q_s (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง) | $\frac{dS}{dt} = \frac{S^{\max} - S^0}{t - t^0}$ |
| อัตราการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เชิงปริมาตร; Q_p (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง) | $\frac{dP}{dt} = \frac{P^{\max} - P^0}{t - t^0}$ |
| ผลได้ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์; $Y_{p/s}$ (กรัมต่อกรัม) | $\frac{(P^{\max} - P^0)}{(S^{\max} - S^0)}$ |

หมายเหตุ เมื่อ S P และ t หมายถึง ความเข้มข้นซูโครส (กรัมต่อลิตร) ความเข้มข้นฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) และเวลา (ชั่วโมง) ตามลำดับ โดยตัวห้อย 0 และ t หมายถึงที่เริ่มต้นและที่เวลาใด ๆ ตามลำดับ และด้วย \max หมายถึง ที่สูงสุด



1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีDNS(Miller, 1959; อ้างโดยสารโจนันและคณะ, 2544)

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

2. สารละลาย DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) เตรียมโดยละลาย DNS 10 กรัมในน้ำกลั่น ปริมาตร 250 มิลลิลิตรเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปอย่างช้า ๆ จนครบ 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อย ๆ เติมโพแทสเซียมโซเดียม จำนวน 300 กรัม โดยกวนผสมให้เข้ากันตลอดเวลา ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วบรรจุในขวดสีชา สามารถเก็บรักษาสารละลาย DNS ได้นานประมาณ 3 เดือน

3. สารละลายมาตรฐานกลูโคส เตรียมโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางแผนวทที่ ค1

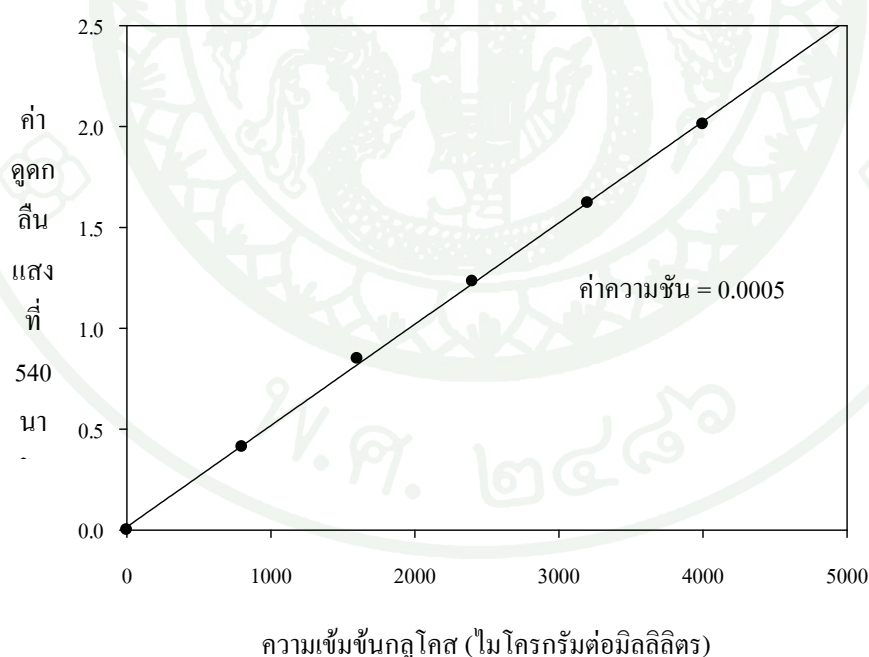
ตารางแผนวทที่ ค1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

| ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไมโครลิตร) | น้ำกลั่น (มิลลิลิตร) |
|--|--|-------------------------|
| 0 | 0 | 500 |
| 800 | 100 | 400 |
| 1600 | 200 | 300 |
| 2400 | 300 | 200 |
| 4000 | 400 | 100 |

วิธีการ

1. ปิเปิดตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานกลูโคส (ความเข้มข้น 0-4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองกรณีของ Blank ให้ใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิกิริยาให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในน้ำเย็น เป็นเวลาอีก 5 นาทีเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
4. สร้างกราฟมาตรฐานกลูโคส แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง ดังแสดงในภาพผนวกที่ ค1 เพื่อหาความชันของกราฟเส้นตรง สำหรับใช้คำนวณหาความเข้มข้นกลูโคสของตัวอย่าง

$$\text{ความเข้มข้นกลูโคส(กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times 1,000}$$



ภาพผนวกที่ ค1 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์กลูโคสโดยวิธี DNS

2. การหาน้ำหนัก ปริมาตร และความหนาแน่นของเอนไซม์ตรีง

2.1 การหาน้ำหนักเปียกของเอนไซม์ตรีงทั้งหมด

2.1.1 นำบีกเกอร์เปล่าอบแห้ง ปริมาตร 250 มิลลิลิตร มาชั่งน้ำหนัก

2.1.2 นำเอนไซม์ตรีงทั้งหมดที่ฝังบนตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว นาน 10 นาทีบรรจุในบีกเกอร์เปล่าที่ทราบน้ำหนักแล้วในข้อ 2.1.1 นำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาน้ำหนักเปียกทั้งหมดของเอนไซม์ตรีง ดังนี้

น้ำหนักเปียกของเอนไซม์ตรีงทั้งหมด(กรัม) =

น้ำหนักบีกเกอร์และเม็ดเอนไซม์ตรีงทั้งหมด - น้ำหนักบีกเกอร์เปล่า

2.2 การหาน้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีง

2.2.1 นำ petri dish เปล่าอบแห้ง มาชั่งน้ำหนัก

2.2.2 นำเอนไซม์ตรีงทั้งหมดที่ฝังบนตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว นาน 10 นาทีจำนวน 50 เม็ดใส่ลงใน petri dish ที่ทราบน้ำหนักแล้วในข้อ 2.2.1 นำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาน้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีงดังนี้

น้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีง(กรัมต่อเม็ด) =

$$\frac{\text{น้ำหนัก petri dish และเม็ดเอนไซม์ตรีง 50 เม็ด} - \text{น้ำหนัก petri dish เปล่า}}$$

จำนวนเม็ดเอนไซม์ตรีง 50 เม็ด

2.3 การหาจำนวนเอนไซม์ตรีงทั้งหมด

คำนวณจำนวนเม็ดเอนไซม์ตรีงทั้งหมดจากน้ำหนักเปียกทั้งหมดของเอนไซม์ตรีง และน้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีง ดังนี้

$$\text{จำนวนเม็ดเอนไซม์ตรีงทั้งหมด (เม็ด)} = \frac{\text{น้ำหนักเปียกของเม็ดเอนไซม์ตรีงหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเม็ดเอนไซม์ตรีง (กรัมต่อเม็ด)}}$$

2.4 การหาปริมาตรของเอนไซม์ตรีงทั้งหมด

2.4.1 เตรียมกระบอกลง ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.4.2 นำเอนไซม์ตรีงทั้งหมดหลังจากที่ผ่านการชั่งน้ำหนักแล้วใส่ลงในกระบอกลง ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.4.1 สามารถคำนวณปริมาตรของเอนไซม์ตรีงทั้งหมด ดังนี้

ปริมาตรของเม็ดเฉลี่ยทั้งหมด (มิลลิลิตร) =

$$\text{ปริมาตรน้ำกลั่นและเอนไซม์ตรีงทั้งหมด (มิลลิลิตร)} - \text{ปริมาตรน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร}$$

2.5 การหาปริมาตรเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีง

2.5.1 เตรียมกระบอกลง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.5.2 นำเอนไซม์ตรีงจำนวน 50 เม็ด ใส่ลงในกระบอกลงที่เตรียมไว้ในข้อ 2.5.1 สามารถคำนวณปริมาตรเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีงดังนี้

ปริมาตรเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีง (มิลลิลิตรต่อเม็ด) =

$$\frac{\text{ปริมาตรน้ำกลั่นและเอนไซม์ตรีง 50 เม็ด (มิลลิลิตร)} - \text{ปริมาตรน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร}}{\text{จำนวนเม็ดเอนไซม์ตรีง 50 เม็ด}}$$

2.6 การหาความหนาแน่นของเอนไซม์ตรีงทั้งหมด

จากค่าน้ำหนักเปียกของเอนไซม์ตรีงทั้งหมดและปริมาตรของเอนไซม์ตรีงทั้งหมดในข้อ 2.1 และ 2.4 ตามลำดับ สามารถคำนวณความหนาแน่นของเอนไซม์ตรีงดังนี้

$$\text{ความหนาแน่นของเอนไซม์ตรีง (กรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักเปียกของเอนไซม์ตรีงทั้งหมด (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของเอนไซม์ตรีงทั้งหมด (มิลลิลิตร)}}$$

2.7 การหาความหนาแน่นเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีง

จากค่าน้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีงและปริมาตรเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีงในข้อ 2.2 และ 2.5 ตามลำดับ สามารถคำนวณความหนาแน่นเฉลี่ยของเม็ดเจล ดังนี้

$$\text{ความหนาแน่นเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีง (กรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักเปียกเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีง (กรัมต่อเม็ด)}}{\text{ปริมาตรเฉลี่ยของเอนไซม์ตรีง (มิลลิลิตรต่อเม็ด)}}$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโทส กลูโคส ซูโครส 1-เคสโทส นีสโทส และ 1^F-ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส เตรียมโดยชั่งอย่างละ 0.01 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายของแต่ละสารเป็น 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานฟรุกโทส กลูโคส ซูโครส 1-เคสโทส นีสโทส และ 1^F-ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทสความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร กรองสารละลายมาตรฐานฟรุกโทส กลูโคส ซูโครส 1-เคสโทส นีสโทส และ 1^F-ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทสผ่านตัวกรอง (cellulose nitrate filter, Sartorius) เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 13 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.2 ไมครอน จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่าน

กระดาษกรอง (PTFE filter, Sartorius) เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 47 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมครอน ให้ได้ความเข้มข้นฟรุกโทส กลูโคส ซูโครส 1-kestose นีสโทส และ 1^F-ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทสมาตรฐานตั้งแต่ 0.0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางผนวกที่ ค2

2. วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) เตรียมโดยนำน้ำปราศจากไอออน (deionized water) มากรองด้วยกระดาษกรอง (PTFE filter, Sartorius) เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 47 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมครอน และทำการไล่อากาศออกด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง

ตารางผนวกที่ ค2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟรุกโทส กลูโคส ซูโครส 1-kestose นีสโทส และ 1^F-ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส

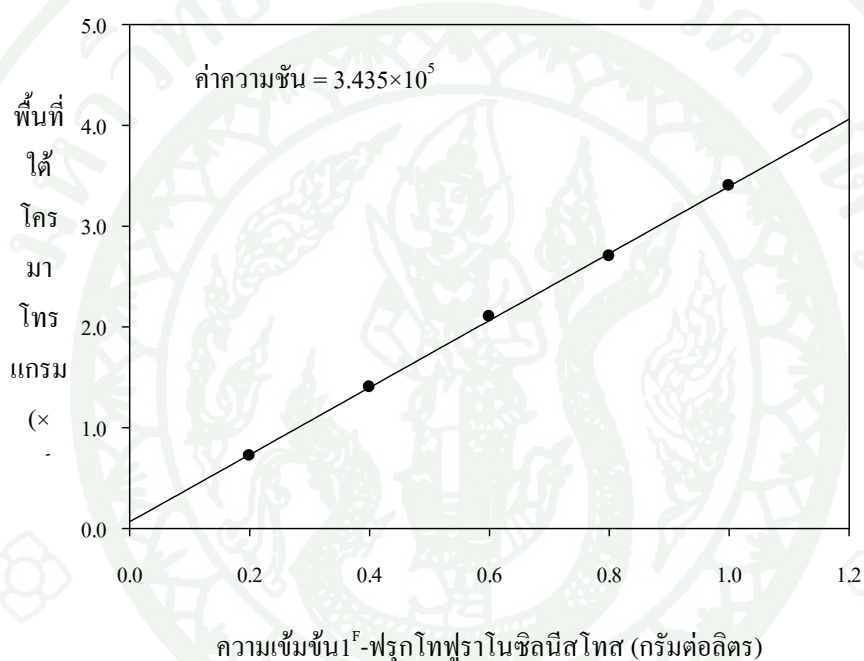
| ความเข้มข้นน้ำตาล (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไมโครลิตร) | น้ำกลั่น (ไมโครลิตร) |
|--|--|-------------------------|
| 0 | 0 | 1000 |
| 0.2 | 200 | 800 |
| 0.4 | 400 | 600 |
| 0.6 | 600 | 400 |
| 0.8 | 800 | 200 |
| 1.0 | 1000 | 0 |

วิธีการ

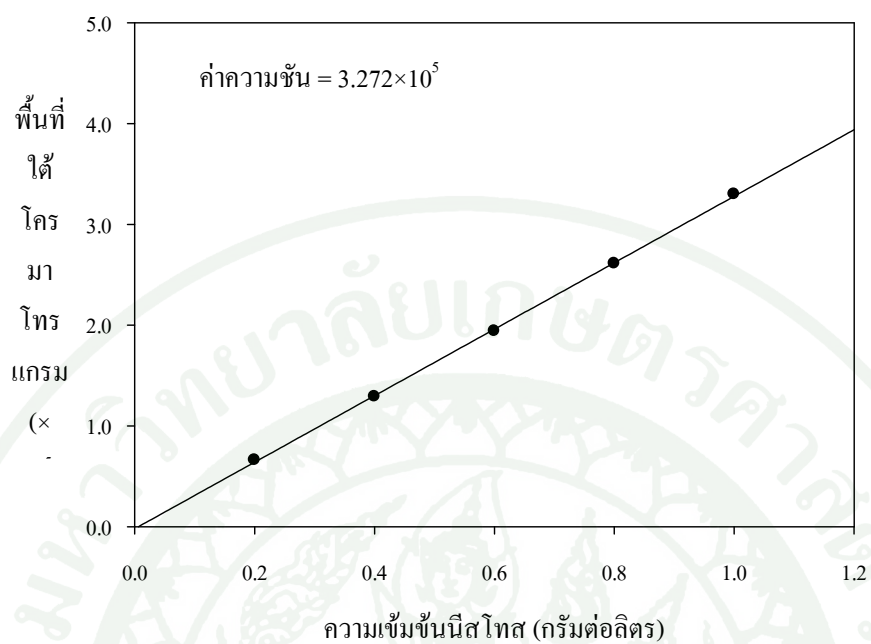
1. ทำการวิเคราะห์หองค์ประกอบของน้ำตาลต่าง ๆ ได้แก่ ฟรุกโทส (F) กลูโคส (G) ซูโครส (GF) 1-kestose (GF₂) นีสโทส (GF₃) และ 1^F-ฟรุกโทฟูราโนซิลนีสโทส (GF₄) ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) โดยใช้ดีเทกเตอร์ชนิด Refractive Index (RI detector) และคอลัมน์ Vertisep™ SUGAR SOP 10 µm ขนาด 7.8×30 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้คือ น้ำปราศจากไอออน (deionized water) ควบคุมอัตราการไหลเท่ากับ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 83 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์ตัวอย่าง แสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรมและนำค่าพื้นที่ใต้โครมาโทแกรม

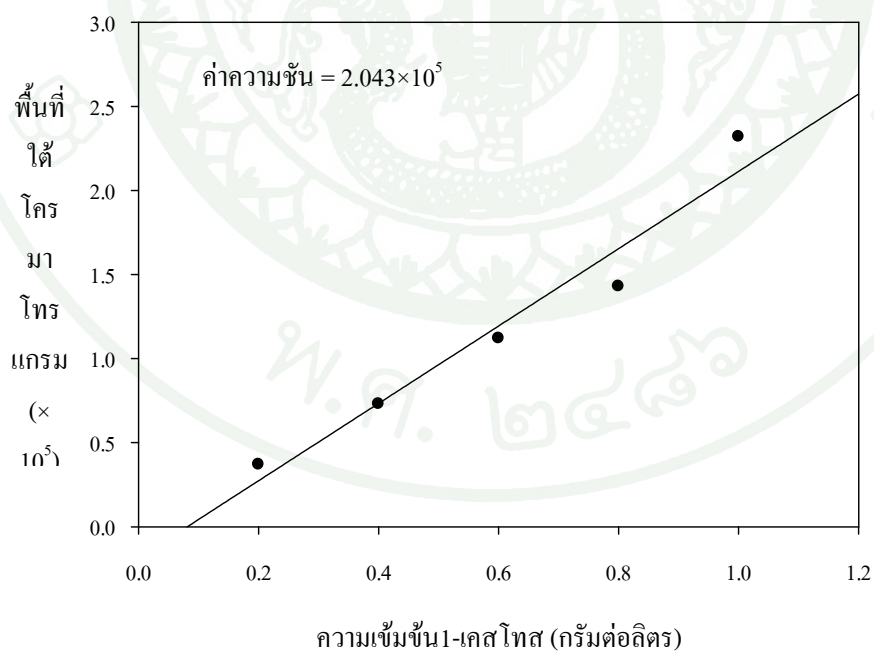
$$\text{ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้โครมาโทแกรม}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times 1,000}$$



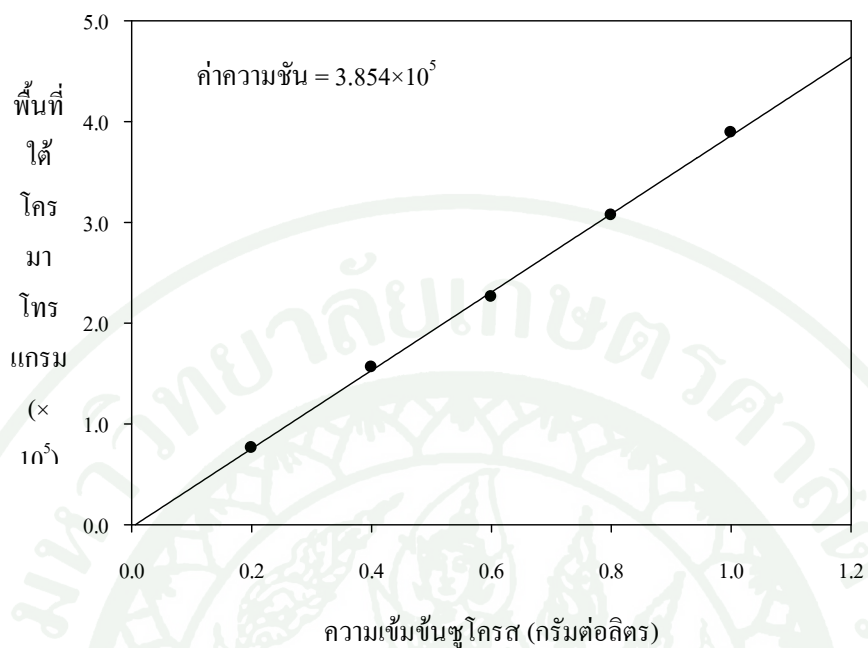
ภาพผนวกที่ ๒ กราฟมาตรฐาน 1^F-ฟรุคโทฟูรานอซิลนีสโทส



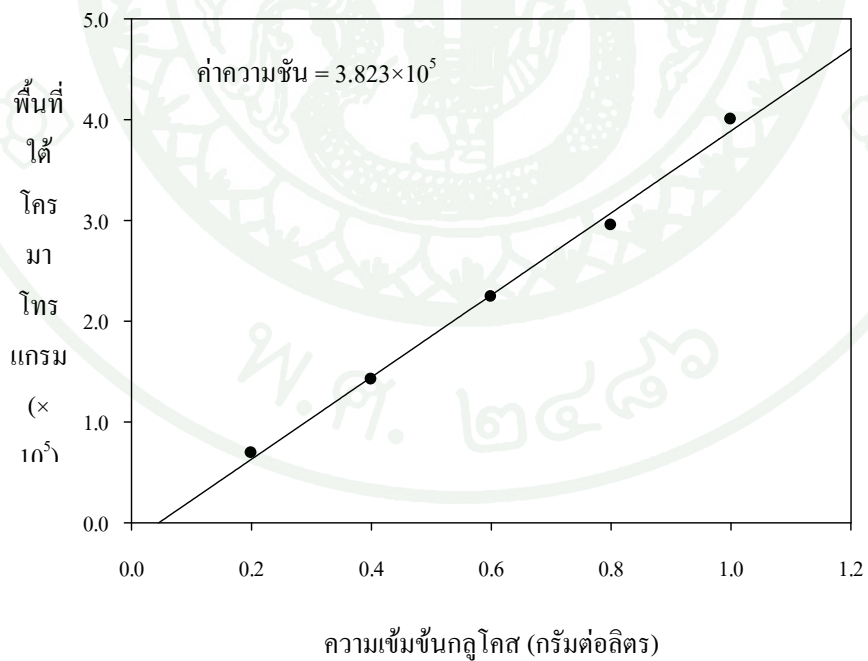
ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานนิสโทส



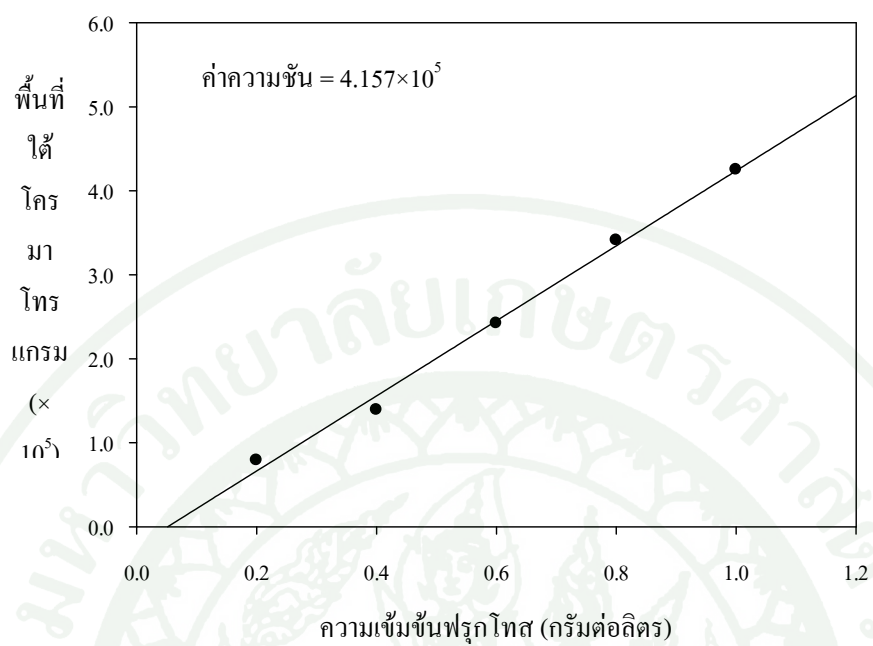
ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐาน 1-เซลโทส



ภาพผนวกที่ ๕ กราฟมาตรฐานซูโครส



ภาพผนวกที่ ๖ กราฟมาตรฐานกลูโคส



ภาพผนวกที่ ๑๗ กราฟมาตรฐานฟรุคโทส

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

| | |
|---------------------------------|--|
| ชื่อ | นางสาวเอื้องกาญจน์ ทาทอง |
| เกิดวันที่ | 12 กรกฎาคม 2528 |
| สถานที่เกิด | อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี |
| ประวัติการศึกษา | วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| ตำแหน่งปัจจุบัน | - |
| สถานที่ทำงานปัจจุบัน | - |
| ผลงานดีเด่นและ/รางวัลทางวิชาการ | - |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ | - |