หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิจารณ์ผลและข้อเสนอแนะ

4.1 การตรึงเซลโดยใช้ไคโตแซนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์

จากการทดลองตรึงเซลที่มีกลูโคสไอโซเมอเรสด้วยวิธีต่างๆนั้น ปัจจัยสำคัญที่ใช้ในการพิจารณาคือความคงทนต่อการแตกสลาย (mechanical strength) ของเซลตรึงรูป เนื่องจากในกระบวนการผลิตต้นทุนของเซลตรึงรูปเป็นสิ่งสำคัญ เซลตรึงรูปที่มีอายุใช้งานได้นานจะช่วยลดต้นทุนการผลิตได้

จากการทดลองพบว่าวิธีที่ให้ความคงทนต่อการแตกสลายของเซลตรึงรูปสูงได้แก่วิธีการตรึงในกลูตารัลดีไฮด์ แต่วิธีนี้ให้แอคติวิตีคงเหลือต่ำมากคือประมาณ 10% อีกทั้งยังมีปัญหาคือมีการสูญเสียเซลในระหว่างการตรึงมาก เนื่องจากเซลที่ขึ้นรูปแล้วก่อนนำไปตรึงมีขนาดเล็ก เมื่อผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในการตรึงซึ่งมีการเขย่าและการล้างทำให้เซลเหล่านี้แตกสลายไป วิธีที่เหมาะสมควรเป็นวิธีที่มีการขึ้นรูปหลังการตรึง

วิธีการตรึงโดยใช้โซเดียมอัลจิเนทนั้นแม้ให้แอคติวิตีสูงและมีความคงทนต่อการแตกสลายปานกลาง แต่เป็นวิธีที่มีข้อจำกัดหลายประการ กล่าวคือเซลตรึงรูปชนิดนี้ต้องอยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ตลอดเวลาทั้งในสภาพใช้งานและในการเก็บรักษา ในสภาพการใช้งานแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) มีผลยับยั้งการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส จึงต้องเพิ่มปริมาณแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ให้สูงขึ้นเพื่อลดผลของการยับยั้ง (26) ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในเรื่องสารเคมีและการกำจัดอิออนในผลิตภัณฑ์

ส่วนวิธีการตรึงโดยใช้ไคโตแซนนั้นให้แอคติวิตีคงเหลือสูงเพราะเป็นการตรึงโดยการใช้การยึดติดทางกายภาพ(physical adsorption) ไม่มีการเกิดพันธะทางเคมีกับเอนไซม์จึงมีการสูญเสียแอคติวิตีน้อย ต่างจากการตรึงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ซึ่งมีการเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์ จึงมีการสูญเสียแอคติวิตีไปมากเนื่องจากตำแหน่งแอคทีฟ (active site) ของเอนไซม์ถูกทำลายไปด้วย อย่างไรก็ตามการตรึงโดยใช้ไคโตแซนเพียงอย่างเดียว

ยังให้เซลตริงรูปที่มีความคงทนต่อการแตกสลายต่ำ ดังนั้นวิธีการตริงโดยใช้ไคโตแซนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์จึงเป็นการประยุกต์เพื่อแก้ปัญหาต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น โดยนำเซลมาตริงด้วยไคโตแซน จากนั้นจึงนำไปตริงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่ำและระยะเวลาสั้น ๆ เพื่อเพิ่มความคงทนต่อการแตกสลาย ซึ่งผลการทดลองในขั้นต้นเป็นที่น่าพอใจ คือเซลตริงรูปมีแอคติวิตีคงเหลือ 16% ซึ่งสูงกว่าการตริงโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เพียงอย่างเดียว และยังมีความคงทนต่อการแตกสลายสูงกว่าอีกด้วย นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่มีการขึ้นรูปหลังการตริงซึ่งสามารถขจัดปัญหาการสูญเสียเซลในระหว่างการตริงไปได้ งานวิจัยนี้จึงเลือกวิธีการตริงนี้เพื่อหาสภาวะในการตริงที่เหมาะสมเพื่อปรับปรุงแอคติวิตีคงเหลือให้สูงขึ้นต่อไป

จากผลการศึกษาการตริงโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ร่วมกับไคโตแซน โดยผันแปรพีเอช ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ และเวลาที่ใช้ในการตริง พีเอช 5.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสม แต่แอคติวิตีคงเหลือจะลดลงเมื่อเพิ่มเวลาในการตริง ดังแสดงในรูปที่ 19 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากตำแหน่งแอคทีฟของกลูโคสไอโซเมอเรสถูกทำลายโดยเกิดพันธะโควาเลนท์กับกลูตารัลดีไฮด์ เนื่องจากการเกิดพันธะระหว่างเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์นั้นเป็นแบบสุ่ม (random) เมื่อใช้เวลาในการตริงนาน โอกาสที่ตำแหน่งแอคทีฟจะถูกทำลายจึงมีสูงขึ้น แต่ในขณะเดียวกันความคงทนต่อการแตกสลายของเซลตริงรูปนี้เมื่อพิจารณาในรูปที่ 20 จะพบว่า เซลจะมีความคงทนต่อการแตกสลายสูงเมื่อตริงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ในช่วงระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง ความคงทนจะต่ำลงเมื่อใช้เวลาในการตริงนานขึ้น ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากการละลายของไคโตแซนในเซลตริงรูป เนื่องจากไคโตแซนสามารถละลายได้ที่พีเอชเป็นกรด (47) การตริงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่พีเอช 5.0 เป็นเวลานานจะทำให้ไคโตแซนที่ตริงเซลอยู่ก่อนแล้วละลายออกมาในสารละลาย ความคงทนต่อการแตกสลายของเซลตริงรูปจึงลดลง

4.2 สมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสในเซลตริงรูป

กลูโคสไอโซเมอเรสในเซลตริงรูปจะมีสมบัติเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเมื่อเทียบกับเซลที่ผ่านการตริงด้วยความร้อน สมบัติต่าง ๆ ที่ทำการศึกษาคือพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน ค่าคงที่ไมคาลิส เสถียรภาพต่ออุณหภูมิและพีเอช

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเซลตริงรูปเป็นผลมาจากกระบวนการตริง (29, 63)

การเปลี่ยนแปลงของพีเอชที่เหมาะสมของเซลตรึงรูปจะเลื่อนมาทางพีเอชต่ำลง (รูปที่ 18) โดยเลื่อนจากพีเอชที่ 7.Ø และ 9.Ø มาเป็น 6.5 และ 8.Ø ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากประจุบวกบนไคโตแซนและกลูตารัลดีไฮด์ ซึ่ง Trevan (63) อธิบายไว้ว่าผลของประจุบวกบนตัวยึดจะขับโปรตอนออกจากอาณาบริเวณ ดังนั้นสภาพแวดล้อมจุลภาค (microenvironment) ภายในเซลตรึงรูปจึงมีพีเอชสูงกว่าเมื่อเทียบกับสภาพแวดล้อมภายนอกคือในสารละลายของปฏิกิริยา และสูงกว่าพีเอชของสภาพแวดล้อมจุลภาคเดิมที่ไม่ผ่านการตรึง แอคติวิตีของเอนไซม์จึงลดลงเนื่องจากพีเอชของสภาพแวดล้อมจุลภาคเดิมไม่เหมาะสม

การปรับพีเอชของสภาพแวดล้อมจุลภาคให้ต่ำลงคืนสู่พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดังเดิมก็คือการลดพีเอชของสารละลายภายนอก ผลที่ปรากฏออกมาให้เห็นคือพีเอชที่เหมาะสมของเซลตรึงรูปเลื่อนไปทางกรดเมื่อเทียบกับเซลที่ไม่ผ่านการตรึง แต่ในความหมายที่แท้จริงแล้วคือการปรับสภาพแวดล้อมจุลภาคให้มีพีเอชคงเดิมนั่นเอง

เซลตรึงรูปที่ได้จะมีค่าคงที่ไมคาลิส ($K_{m(app)}$) ของกลูโคสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยคือจาก Ø.22 โมลาร์ (เอนไซม์บริสุทธิ์) เป็น Ø.31 โมลาร์ Chibata (29) อธิบายว่าเป็นผลเนื่องมาจากประจุไฟฟ้าสถิต (electrostatic charge) ของตัวยึด หากตัวยึดมีประจุไฟฟ้าสถิตชนิดเดียวกับสับสเตรท(substrate) ซึ่งในที่นี้ประจุบวกของตัวยึดคือไคโตแซนและกลูตารัลดีไฮด์มีประจุบวกเช่นเดียวกับกลูโคสจะทำให้เกิดการผลักกัน โดยประจุบวกของตัวยึดจะผลักโมเลกุลของสับสเตรทออกมาภายนอก ทำให้ความเข้มข้นของสับสเตรทในสภาพแวดล้อมจุลภาคของเอนไซม์ต่ำลงกว่าภายนอก ค่า $K_{m(app)}$ ของเซลตรึงรูปจึงสูงขึ้น เพราะความสามารถในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับ สเตรท (affinity) ต่ำลง ตัวยึดที่อาศัยหลักการตรึงโดยพันธะอิออนิกจะทำให้ค่า $K_{m(app)}$ แตกต่างไปจากเดิมมากกว่าพวกที่อาศัยการเกาะติดทางกายภาพเพราะมีปริมาณของประจุมากกว่า

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งมีผลต่อค่า $K_{m(app)}$ ของเซลตรึงรูปเช่นกัน ได้แก่ข้อจำกัดของการถ่ายเทมวลของสับสเตรทจากสารละลายภายนอกเข้าสู่เซลตรึงรูป ทำให้ความเข้มข้นของสับสเตรทภายในเซลตรึงรูปต่ำกว่าภายนอก ค่า $K_{m(app)}$ ต่ำลง ซึ่งค่า $K_{m(app)}$ ของเซลตรึงรูปที่ได้ในงานวิจัยนี้มีค่าใกล้เคียงกับการตรึงโดยวิธีอื่น ดังแสดงในตารางที่ 15

เซลตรึงรูปที่ได้จะมีเสถียรภาพในช่วงที่เป็นกรดลดลงเมื่อเทียบกับเซลที่ตรึงด้วยความร้อน ส่วนความเสถียรในช่วงอุณหภูมิสูงก็ลดลงเล็กน้อย สำหรับความเสถียรของพีเอชและความร้อนของเซลตรึงรูปนั้น Chibata (29) อธิบายไว้ว่าไม่มีความสัมพันธ์ที่แน่นอนระหว่างวิธีการตรึง

ตารางที่ 15 ค่าคงที่ไมคาลิสปรากฏ ($K_{m(app)}$) ของเซลตรึงรูปที่ตรึงโดยวิธีต่าง ๆ

วิธี	$K_{m(app)}$ (โมลาร์)	เอกสารอ้างอิง
ตรึงในเจลาตินร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์	Ø.29	53
ตรึงใน HEMA	Ø.36-Ø.38	54
ตรึงในกลูตารัลดีไฮด์	Ø.23	48
Taka-Sweet (ไม่ระบุวิธีตรึง)	1.92	62
ตรึงสเตรพโตมัยซิส 19Ø-1 ด้วยไคโตแซนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์	Ø.31	ผลงานวิจัยนี้

และความเสถียรของเอนไซม์ ดังนั้นจึงเป็นสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อวิธีการตรึงแต่ละแบบ

สำหรับความเสถียรในการเก็บรักษานั้นการเก็บโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.15 โมลาร์ที่ 4 °ซ เป็นวิธีการที่เก็บได้นานที่สุด แต่การเก็บโดยวิธีนี้อาจมีปัญหาในเรื่องบรรจุภัณฑ์และการขนส่ง หากมีการผลิตในปริมาณมาก รวมทั้งการเก็บในบัฟเฟอร์เป็นเวลานาน ๆ อาจมีการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้ ปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อาจแก้ไขได้โดยเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีกลูโคส 3.0 โมลาร์อยู่ด้วย เพราะกลูโคสที่ความเข้มข้นสูง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

ในการวิจัยแม้จะศึกษาในระดับห้องทดลอง แต่ควรคำนึงการนำไปใช้ประโยชน์ที่เป็นจริงในระดับขยายส่วนด้วย สำหรับเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสสามารถทำงานได้ดีเมื่อมีโคบอลท์อิออนเป็นตัวกระตุ้น แต่ในการผลิตเพื่อบริโภคจะทำให้เกิดปัญหาในการกำจัดโคบอลท์อิออนซึ่งเป็นสารพิษ จึงได้ทดลองใช้เฟอรัสซัลเฟตทดแทนซึ่งได้ผลดีกว่าการใช้โคบอลท์และไม่จำเป็นต้องกำจัดออกจากผลิตภัณฑ์เพราะเป็นสารที่รับประทานได้และคงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ในปริมาณน้อย (28)

4.3 สมบัติของเซลตรึงรูปที่มีกลูโคสไอโซเมอเรสในปฏิกรณ์แบบแพคเบด

เซลตรึงรูปที่ได้มีครึ่งชีวิตประมาณ 26 วัน ซึ่งจัดว่ามีครึ่งชีวิตนานพอควรเมื่อเทียบกับผลที่ได้จากการทดลองโดยกระบวนการตรึงอื่น ๆ (ตารางที่ 16) สำหรับสภาวะการผลิตที่เหมาะสมนั้นขึ้นกับเงื่อนไขทางเศรษฐศาสตร์ด้วย จึงควรมีการศึกษาในแง่นี้ต่อไป สำหรับในแง่กลไกของการเกิดปฏิกิริยานั้น ปัจจัยที่สำคัญซึ่งมีผลอย่างมากต่อแอคติวิตีของเอนไซม์คือข้อจำกัดในการแพร่ของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ผ่านฟิล์ม (film diffusion limitation) ซึ่งล้อมรอบเซลตรึงรูป (63) แผ่นฟิล์มนี้เกิดจากแรงพันธะสัมพันธ์ระหว่างของเหลวล้อมรอบและเซลตรึงรูป ทำให้ของเหลวซึ่งล้อมรอบเซลตรึงรูปประพฤติเสมือนฟิล์มบาง ๆ กั้นการถ่ายเทมวลระหว่างของเหลวภายนอกและภายในเซลตรึงรูป ซึ่งมีผลต่อ maximum conversion ของเอนไซม์ด้วย กล่าวคือแม้จะลดอัตราเร็วการไหลของสับสเตรทเพียงใด อัตราการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทสที่ได้ก็จะไม่เกินค่า maximum conversion นอกเหนือไปจากปัจจัยธรรมชาติของเอนไซม์เอง ในทางปฏิบัติจึงเลือกใช้อัตราเร็วการไหลให้สูงพอที่จะลดข้อจำกัดในการแพร่ผ่านฟิล์มนี้

ปัญหาในเรื่องการเกิดตะกอนของแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ($Mg(OH)_2$) สามารถแก้ไข

ตารางที่ 16 อายุครึ่งชีวิตของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ตรึงด้วยวิธีต่างๆ ในสภาวะใช้งาน

วิธีการตรึง/ชื่อการค้า	อายุครึ่งชีวิต(วัน)	เอกสารอ้างอิง
การตรึงเอนไซม์ที่สกัดแยกแล้ว		
อลูมินาและกลูตารัลดีไฮด์	78	30
ดูโอไลท์ เอ-7	28	33
ซิลิกาแขวนลอยและกลูตารัลดีไฮด์	24	38
แอมเบอร์ไลท์ ไออาร์เอ-904	23	38
ทากะ-สวีท (Taka-Sweet)	33	64
การตรึงเซล		
ตรึงในถุงโพลีเอสเธอร์	19	43
เจลาตินและกลูตารัลดีไฮด์	260	45
กลูตารัลดีไฮด์	115	65
สวีทไซม์ (Sweetzyme)	23	3
เสตรพโตมัยซิส 190-1 ตรึงในไคโตแซนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์	26	ผลงานวิจัยนี้

ได้ด้วยการเติมอีดีทีเอ(EDTA)ซึ่งเป็นสารคีเลตสารมารถป้องกันการเกิดแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ได้โดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของแมกนีเซียมอีดีทีเอซึ่งมีความเสถียรสูงแทน (66) อีดีทีเอนี้โดยทั่วไปเป็นสารยับยั้ง (inhibitor) ในงานวิจัยนี้พบว่าอีดีทีเอมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แต่สามารถลดการยับยั้งได้โดยปรับอัตราส่วนของแมกนีเซียมอิออนและเฟอรัสอิออนให้เหมาะสม (รูปที่ 27 ก และ ข)

ในการวิจัยนี้สามารถพัฒนาจนได้วิธีการตรึงเซลที่เหมาะสมและมีแอคติวิตีคงเหลือสูงประมาณ 5Ø% เมื่อเทียบกับแอคติวิตีของเซลที่ตรึงด้วยความร้อนซึ่งมีแอคติวิตีประมาณ 11ØØ หน่วย/กรัม(น้ำหนักแห้ง) คือประมาณ 54Ø หน่วย/กรัม(น้ำหนักแห้ง) ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์ของบริษัท Novo Industri ซึ่งผลิตในเชิงการค้า คือ 5ØØ ยูนิต/กรัม (น้ำหนักแห้ง) (26) นับว่าเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการผลิตสูง ดังนั้นควรที่จะมีการศึกษาการใช้งานในระดับปฏิกรณ์ขยายส่วนต่อไป