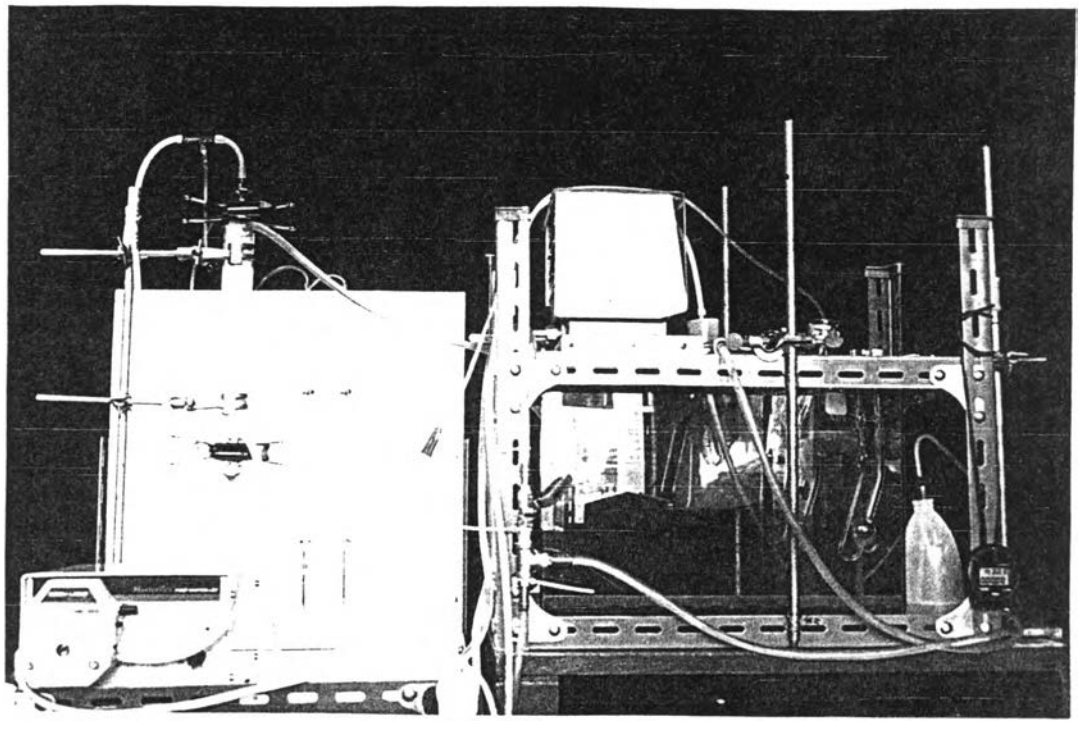
บทที่ 4

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

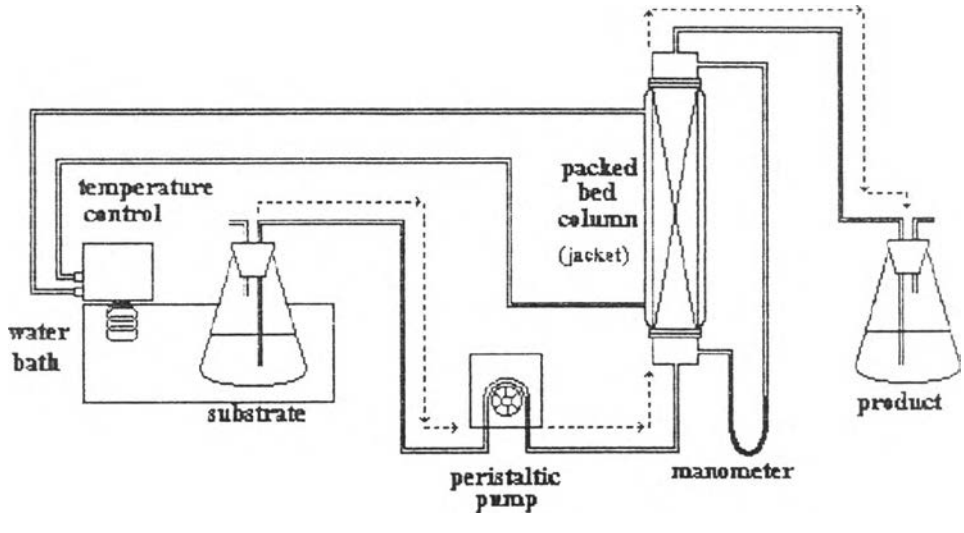
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
3. เครื่องวัดความหนืด (Oswald viscometer)
4. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath and temperature control)
5. หอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบด (Packed bed column)

หอปฏิกิริยานี้มีลักษณะเป็นคอลัมน์แก้วใส รูปทรงกระบอก 2 ชั้น ชั้นในเป็นส่วนที่บรรจุเม็ดเรซินที่ถูกตรึงรูปด้วยเอนไซม์เพกติเนสซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.6 เซนติเมตร และมีความสูงของเบด 30 เซนติเมตร ส่วนชั้นนอกจะหล่อน้ำเพื่อควบคุมอุณหภูมิของเบด ด้านบนและด้านล่างของคอลัมน์จะกั้นด้วยตะแกรงโลหะเพื่อกันไม่ให้เม็ดเรซินหลุดออกไป ในการปฏิบัติงานนั้นสับสเตรตจะถูกนำเข้าสู่คอลัมน์เพื่อทำปฏิกิริยาทางท่อซึ่งอยู่ด้านล่างโดยปั๊มแบบเพอร์ริสตอลติก (peristaltic pump) หลังจากเกิดปฏิกิริยาแล้วผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเอาออกทางท่อซึ่งอยู่ด้านบนคอลัมน์ และที่ส่วนบนและส่วนล่างของคอลัมน์จะมีท่อเพื่อใช้ต่อกับมาโนมิเตอร์ (manometer) เพื่อวัดความดันลดที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2



รูปที่ 4.1 แสดงภาพถ่ายของหอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบด ที่บรรจุเรซินที่ถูกตรึงรูปด้วยเอนไซม์เพกติเนส ในระหว่างกระบวนการย่อยสลายเพกติน



รูปที่ 4.2 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของหอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบด และทิศทางการไหลของเพกตินซึ่งเป็นสับสเตรตและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. เอนไซม์เพกติเนส (pectinase) บริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอนไซม์เพกติเนสนี้มีชื่อทางการค้าว่า NOVOFERM 14 ของบริษัท NOVO NORDISK FERMENT จำกัด ประเทศเดนมาร์ก ซึ่งมีแอกติวิตีของโพลีกาแลกทูโรเนส (polygalacturonase, PG) เท่ากับ 26,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แต่จากการหาค่าแอกติวิตีตามวิธีที่ใช้ในการทดลองนี้โดยใช้เทียบกับกราฟมาตราฐาน (standard curve) จากการทดลอง ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

2. เพกติน (pectin) บริษัทแกล็กโซ-วิทยาศรม จำกัด สมุทรปราการ ประเทศไทย
3. ซิตริกแอซิด (citric acid) บริษัท Carlo-Erba ประเทศอิตาลี
4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-sodium hydrogen phosphate) บริษัท Carlo-Erba ประเทศอิตาลี
5. อะซิติกแอซิด (acetic acid) บริษัท Carlo-Erba ประเทศอิตาลี
6. โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) บริษัท Carlo-Erba ประเทศอิตาลี
7. อะซิโตน (acetone) บริษัท AJAX Chemical ประเทศออสเตรเลีย
8. เรซินที่ใช้เป็นตัวพยุง บริษัท Dow Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา

เรซินที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเรซินแลกเปลี่ยนประจุลบชนิดเบสอ่อน (weakly basic anion exchange resin) ที่มีชื่อทางการค้าว่า Dowex MWA-1

สารเคมีที่ใช้และกล่าวมาแล้วทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) ยกเว้นเพกติน จะใช้เกรดที่สามารถใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารได้ (food grade) ส่วนสารเคมีพื้นฐานที่มีใช้กันประจำในห้องปฏิบัติการก็เป็นเกรดวิเคราะห์เช่นกันทั้งหมด

วิธีทดลอง

1. การหาแอกติวิตีของเอนไซม์เพกติเนสอิสระและตรึงรูปในการย่อยสลายสารละลายเพกติน

1.1 แอกติวิตีของเอนไซม์เพกติเนสอิสระ

การหาแอกติวิตีของเอนไซม์อิสระนั้นทำโดย นำสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 เติมลงในสารละลายเพกตินเข้มข้น 1

เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (citrate phosphate buffer) ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 เขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 168 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆมาทำการวัดความหนืดของสารละลายสับสเตรต โดยใช้ Oswald viscometer ตามวิธีในข้อ 2

1.2 แอกติวิตีของเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูป

การหาแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปนั้นทำได้โดย นำเอนไซม์ตรึงรูปมาเติมสารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5 เขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 168 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆมาทำการวัดค่าความหนืดของสารละลายสับสเตรต โดยใช้ Oswald viscometer ตามวิธีในข้อ 2

กำหนดให้แอกติวิตี 1 หน่วยของเอนไซม์ เป็นปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าความหนืดสัมพัทธ์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ของค่าเริ่มต้นสำหรับสารละลายเพกติน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรภายในเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

2. วิธีการวัดความหนืดโดยใช้ Oswald viscometer

การวัดความหนืดนี้จะวัดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยปิเปตสารตัวอย่างที่ต้องการวัดความหนืดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Oswald viscometer ทางปลาย A (ดูรูปที่ 4.3) จากนั้นดูดสารตัวอย่างที่อยู่ใน Oswald viscometer ขึ้นมาทางปลาย B ให้สารตัวอย่างขึ้นมาเหนือขีด C จากนั้นปล่อยให้สารตัวอย่างไหลลงมา เมื่อถึงขีด C ให้เริ่มจับเวลาจนกระทั่งสารตัวอย่างไหลลงมาถึงขีด D แล้วนำเวลาที่ได้ไปคำนวณหาค่าความหนืดและเปอร์เซ็นต์ความหนืดสัมพัทธ์ที่ลดลง (%RV) ตามสมการข้างล่างนี้

$$\mu = \nu\rho \qquad \text{..... (4.1)}$$

เมื่อ $\nu = t * C_o$

μ คือ ความหนืด (viscosity, mPa.s,cP)

ν คือ ความหนืดไคนีเมติก (Kinematic viscosity, mm^2/s,cSt)

ρ คือ ความหนาแน่นของสารละลาย (density, g/ml)

t คือ เวลาที่วัดได้ของสารละลายตัวอย่าง (efflux time, sec)

C_o คือ ค่าคงที่ของเครื่องวัดความหนืดที่ใช้ (viscometer constant, mm^2/s^2, cSt/s) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.03333 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

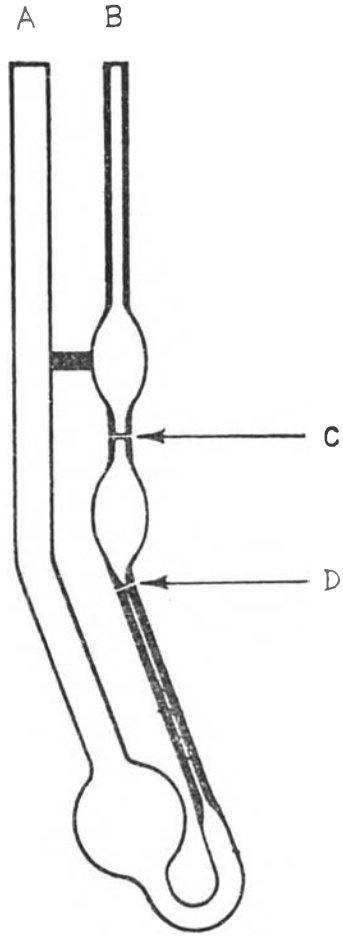
$$\%RV = \frac{t_0 - t}{t_0 - t_s} * 100 \qquad \text{..... (4.2)}$$

เมื่อ %RV คือ ความหนืดสัมพัทธ์ (relative viscosity,%)

t_0 คือ เวลาที่วัดได้ของสารละลายเริ่มต้น (sec)

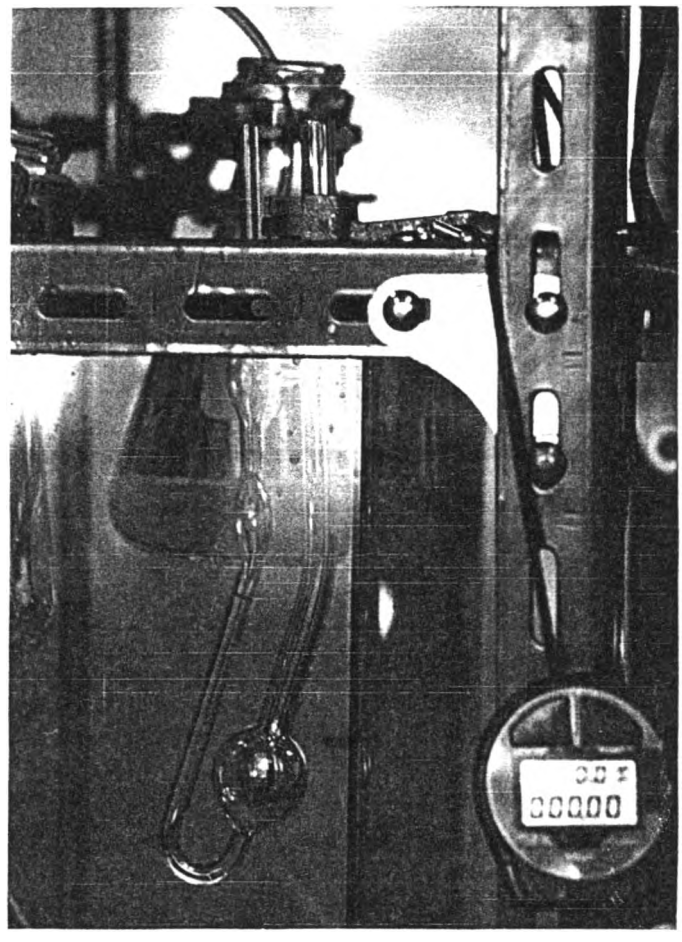
t_s คือ เวลาที่วัดได้ของตัวทำละลาย (sec)

t คือ เวลาที่วัดได้ของสารละลายตัวอย่าง ณ เวลาใดๆ (sec)



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะและวิธีการใช้ Oswald viscometer

I16758298



รูปที่ 4.4 ภาพถ่ายแสดงการวัดความหนืดโดยใช้ Oswald viscometer ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3. วิธีการตรึงรูปเอนไซม์เพกติเนสบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

ชั่งเรซิน Dowex MWA-1 จำนวน 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (3.5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์เพกติเนส (NOVOFERM 14) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป แล้วนำสารผสมที่ได้ไปเขย่าในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 168 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงเทสารผสมออก และล้างเรซินที่ถูกตรึงรูปแล้วด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ (deionized water) เพื่อให้สารละลายเอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึงหลุดออกไป จากนั้นนำเรซินที่ได้แช่ในน้ำดีไอออนไนซ์และเก็บไว้ในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) เพื่อที่จะนำไปใช้ในการย่อยสลายสารละลายเพกตินและหาค่าแอกติวิตีต่อไป

4. วิธีการศึกษาหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์เพกติเนส

ทำตามวิธีในข้อ 3 แต่แปรเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 3-6 แล้วนำเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ไปหาค่าแอกติวิตีโดยใช้ Oswald viscometer ตามวิธีในข้อ 1.2 เพื่อหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด

5. วิธีการศึกษาหาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์เพกติเนส

ทำตามวิธีในข้อ 3 แต่แปรเปลี่ยนค่าอุณหภูมิตั้งแต่ 25-40 องศาเซลเซียส แล้วนำเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ไปหาค่าแอกติวิตีโดยใช้ Oswald viscometer ตามวิธีในข้อ 1.2 เพื่อหาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด

6. วิธีการศึกษาหาค่าความเข้มข้นของเอนไซม์เพกติเนสที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์เพกติเนส

ทำตามวิธีในข้อ 3 แต่แปรเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของเอนไซม์เพกติเนสตั้งแต่ 0.1-2 มิลลิลิตร ต่อเรซิน 5 กรัม แล้วนำเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ไปหาค่าแอกติวิตีโดยใช้ Oswald viscometer ตามวิธีในข้อ 1.2 เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด และใช้ปริมาณเอนไซม์น้อยที่สุด

7. วิธีการศึกษาผลกระทบของความเป็นกรด-ด่างต่อแอกติวิตีของเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูป

นำเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปที่สภาวะที่เหมาะสมไปทำการหาค่าแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 1.2 แต่แปรเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเพกตินตั้งแต่ 3-6

8. วิธีการศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูป

นำเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปที่สภาวะที่เหมาะสมไปทำการหาค่าแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 1.2 แต่แปรเปลี่ยนค่าอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลายสารละลายเพกตินตั้งแต่ 25-40 องศาเซลเซียส

9. วิธีการศึกษาผลกระทบของความเร็วรอบของการกวนที่ใช้ในการย่อยสลายสารละลายเพกตินต่อแอกติวิตีของเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูป

นำเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปที่สภาวะที่เหมาะสมไปทำการหาค่าแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 1.2 แต่แปรเปลี่ยนค่าความเร็วรอบของการกวนที่ใช้ในการย่อยสลายสารละลายเพกตินตั้งแต่ 86-224 รอบต่อนาที

10. วิธีการหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ (kinetic constant, K_m, V_{max}) ของเอนไซม์เพกติเนสอิสระ และตรึงรูป

10.1 หาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เพกติเนสอิสระ

นำเอนไซม์เพกติเนสอิสระไปทำการหาค่าแอกติวิตีที่สภาวะที่เหมาะสมตามวิธีในข้อ

1.2 แต่แปรเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของสารละลายเพกตินตั้งแต่ 0.1-0.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และหาค่า K_m และ V_{max} โดยสร้างความสัมพันธ์ตามวิธีของ Lineweaver-Burk

10.2 หาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูป

นำเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปที่สภาวะที่เหมาะสมไปทำการหาค่าแอกติวิตีที่สภาวะที่เหมาะสมตามวิธีในข้อ 1.2 แต่แปรเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของสารละลายเพกตินตั้งแต่ 0.1-0.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และหาค่า K_m และ V_{max} โดยสร้างความสัมพันธ์ตามวิธีของ Lineweaver-Burk

11. การย่อยสลายเพกตินด้วยกระบวนการแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบด

ทำการติดตั้งเครื่องมือดังรูปที่ 1 หรือ 2 นำเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปที่สภาวะที่เหมาะสม 200 กรัม มาบรรจุลงในหอปฏิกิริยาที่ติดตั้งไว้ จากนั้นป้อนสารละลายเพกตินเข้าทางด้านล่างของหอปฏิกิริยาด้วยเพอร์ริสตอลติกปั๊มที่ควบคุมอัตราการไหล แล้วทำการเก็บตัวอย่างสารละลายเพกตินที่ออกมาทางด้านบนของหอปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆ เพื่อทำการวิเคราะห์หาค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปในหอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบดโดยการวัดค่าความหนืดด้วย Oswald viscometer ตามวิธีในข้อ 2 จนกว่าค่าความหนืดสัมพัทธ์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

12. วิธีการศึกษาผลกระทบของอัตราการไหลของสารละลายเพกตินต่อการย่อยสลายเพกตินแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบด

ทำตามวิธีในข้อ 11 โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายเพกตินที่เข้าสู่หอปฏิกิริยา 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่แปรเปลี่ยนค่าอัตราการไหลของสารละลายเพกตินที่เข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 10, 20, 30, 40, 60, 80 มิลลิลิตรต่อนาที

13. วิธีการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของสารละลายเพกตินต่อการย่อยสลายเพกตินแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบด

ทำตามวิธีในข้อ 11 โดยใช้ค่าอัตราการไหลที่เหมาะสมจากข้อ 12 แต่แปรเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของสารละลายเพกตินที่เข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

14. การศึกษาเสถียรภาพในการทำงานของเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปในหอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบด

ทำตามวิธีในข้อ 11 โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายเพกตินที่เข้าสู่หอปฏิกิริยา 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของสารละลายเพกตินที่เข้าสู่หอปฏิกิริยาที่เหมาะสมจากข้อ 12 แล้วทำการเก็บตัวอย่างสารละลายเพกตินที่ออกมาทางด้านบนของหอปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆ เพื่อทำการวิเคราะห์หาค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปในหอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบดโดยการวัดค่าความหนืดด้วย Oswald viscometer ตามวิธีในข้อ 2