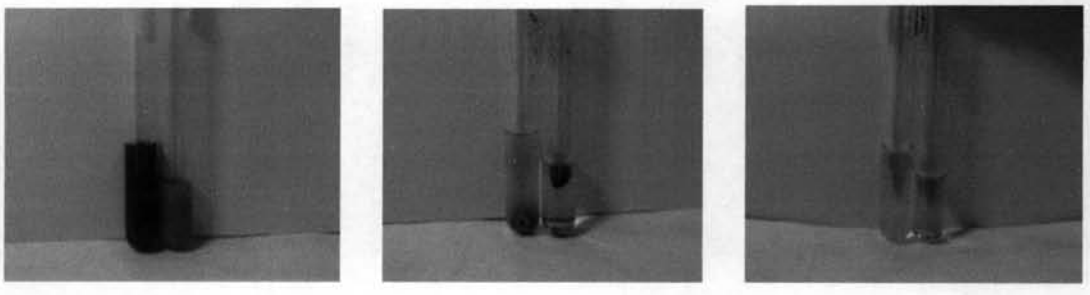
บทที่ 5
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

การศึกษาการห่อหุ้มเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสในวัสดุประกอบแต่งไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนเงินสามารถแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ส่วน โดยในส่วนแรกศึกษาผลการวัดขนาดอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง particle size analyzer จากนั้นในส่วนที่สองศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชของไคโตซานต่อเอนไซม์ตรึงรูป อิทธิพลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นไพโรแกลลอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอิทธิพลของขนาดของแผ่นฟิล์มไคโตซาน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยา โดยข้อมูลที่ได้นี้จะนำไปศึกษาต่อในส่วนที่สาม คือ ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการห่อหุ้มเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสในวัสดุประกอบแต่งไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนเงินด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ box-behnken ต่อมาในส่วนที่สี่ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพของวัสดุประกอบแต่งที่สภาวะเหมาะสม และในส่วนสุดท้ายทำการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ในวัสดุประกอบแต่งที่สภาวะเหมาะสม

5.1 ขนาดอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้

เนื่องจากงานวิจัยของการตรึงเอนไซม์ที่ผ่านมานั้นได้มีการใช้อนุภาคนาโนเงินเป็นองค์ประกอบหนึ่งของวัสดุตรึงเพื่อช่วยในการดูดติดเอนไซม์เพื่อลดการหลุดออกของเอนไซม์จากวัสดุตรึง (Luo และคณะ,2004) และยังสามารถช่วยในการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปยังอิเล็กโทรดได้ดีในงานไบโอเซนเซอร์ ซึ่งจะทำให้ไบโอเซนเซอร์ที่ได้มีคุณสมบัติไวต่อการตอบรับสัญญาณมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุตรึงที่ไม่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นองค์ประกอบ ดังเช่นในงานวิจัยของ Ren และคณะ (2005) ซึ่งพบว่า วัสดุตรึงที่มีอนุภาคนาโนเงินจะใช้เวลาในการตอบรับสัญญาณลดลงจาก 60 วินาทีเหลือเพียง 20 วินาทีเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุตรึงที่ไม่มีอนุภาคนาโนของเงิน จึงเป็นเหตุให้ในงานวิจัยนี้เลือกใช้อนุภาคนาโนเงินเป็นองค์ประกอบหนึ่งในการตรึงเอนไซม์ ทั้งนี้อนุภาคนาโนเงินที่ใช้ในงานวิจัยนี้จะได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีการเติมตัวรีดิวซ์ลงไปในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตจนเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และรีดักชันกลายเป็นอนุภาคนาโนเงินซึ่งจะสังเกตได้จากสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงจากสีใสไปเป็นสีเขียวเข้ม ดังในรูปที่ 5.1(ก) โดยในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 0.001 โมล่าร์ และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดร์ 0.010 โมล่าร์ ซึ่งมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า ทั้งนี้เพื่อให้ซิลเวอร์ไอออนทั้งหมดถูกรีดิวซ์ไปเป็นอนุภาคนาโนเงิน (Huang และคณะ,2004) ได้ทั้งหมด โดยมีปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นตามสมการที่ 2.1 (ตามหัวข้อ 2.4.1)

แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า ความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรตและความเข้มข้นของโซเดียมโบโรไฮไดร์จะมีค่าแตกต่างกันเป็น 10 เท่าแล้ว ก็ไม่แน่เสมอไปว่าอนุภาคนาโนเงินที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะของอนุภาคที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง particle size analyzer ดังในกรณีที่ความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรตสูงขึ้นเป็น 0.010 โมล่าร์ และความเข้มข้นของโซเดียมโบโรไฮไดร์สูงขึ้นเป็น 0.100 โมล่าร์ จะพบว่าอนุภาคนาโนเงินที่ได้มีลักษณะรวมกันเป็นตะกอนก้อนใหญ่ดังรูปที่ 5.1 (ข) ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณอนุภาคนาโนเงินที่มีมากจนทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นก้อนใหญ่ และเมื่อความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรตมีค่าต่ำลงเป็น 0.0001 โมล่าร์ และความเข้มข้นของโซเดียมโบโรไฮไดร์เป็น 0.001 โมล่าร์ จะพบว่าสารแขวนลอยของอนุภาคนาโนเงินที่ได้เป็นสีเหลืองใสดังรูปที่ 5.1 (ค) ถึงแม้ว่าอนุภาคนาโนเงินที่เกิดขึ้นนั้นจะไม่รวมกันเป็นก้อนก็จริงแต่เมื่อนำไปวัดด้วยเครื่อง particle size analyzer แล้วไม่สามารถวัดได้เนื่องจากความเข้มแสงของสารละลายที่สังเคราะห์ได้นั้นมีค่าน้อยเกินไป จึงทำให้อนุภาคนั้นมีลักษณะโปร่งแสงส่งผลให้แสงที่ตกกระทบกับอนุภาคไม่สามารถกระเจิงแสงตกลงที่ตัวตรวจจับสัญญาณ (detector) ได้ จึงทำให้ในงานวิจัยนี้ไม่ได้เลือกความเข้มข้นดังกล่าวมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน



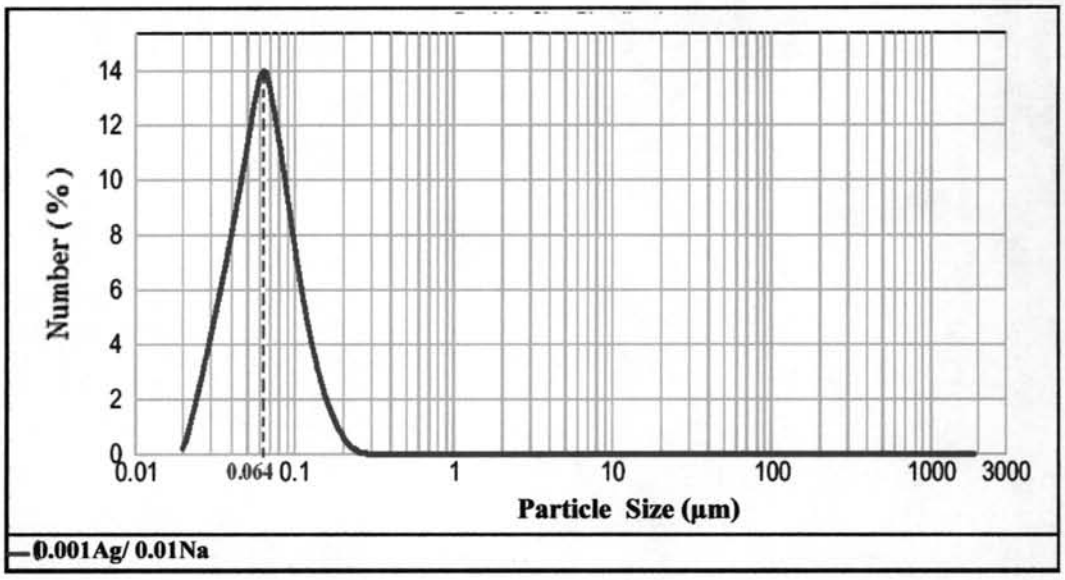
(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 5.1 แสดงลักษณะของอนุภาคนาโนเงินที่อัตราส่วนของความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรตต่อความเข้มข้นของโซเดียมโบโรไฮไดร์ (ก) 0.001 โมล่าร์/0.010โมล่าร์ (ข) 0.010 โมล่าร์/0.100โมล่าร์ (ค) 0.0001 โมล่าร์/0.001โมล่าร์ ตามลำดับ โดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

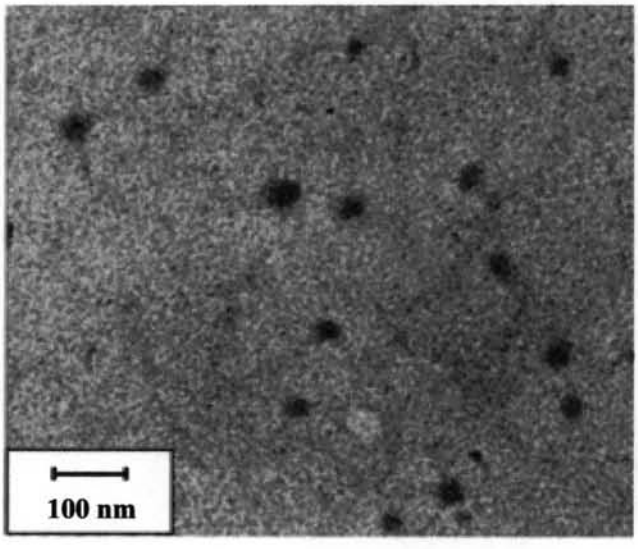
ต่อมาเมื่อนำสารละลายของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้จากความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรต 0.001 โมล่าร์ และความเข้มข้นของโซเดียมโบโรไฮไดร์ 0.010 โมล่าร์ มาวัดขนาดของอนุภาคนาโนเงินด้วยเครื่อง particle size analyzer ดังรูปที่ 5.2 จะพบว่าการกระจายตัวของอนุภาคนาโนเงินมีขนาดอยู่ในช่วง 20 ถึง 224 นาโนเมตร ซึ่งจะมีการกระจายตัวของอนุภาคนาโนเงินสูงสุดในช่วงขนาดอนุภาค 63 ถึง 71 นาโนเมตร โดยมีจำนวนอนุภาคประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์

ของจำนวนอนุภาคทั้งหมดในสารละลาย ดังนั้น จึงพบว่าขนาดเฉลี่ยของอนุภาคนาโนเงินที่ได้จากสารละลายทั้งหมดจะมีค่า 64 นาโนเมตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าขนาดเฉลี่ยของอนุภาคนาโนเงินที่ได้จากการวัดขนาดด้วยเครื่อง particle size analyzer นี้มีขนาดใหญ่พอสมควรเมื่อเปรียบเทียบกับการวัดขนาดของอนุภาคนาโนเงินด้วย TEM ดังรูปที่ 5.3 ซึ่งพบว่า ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคนาโนเงินที่ได้นั้นมีค่าเพียง 37 นาโนเมตร ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าขนาดของอนุภาคนาโนเงินที่ได้จากการวัดด้วย TEM มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของอนุภาคนาโนเงินในงานวิจัย Xu และคณะ (2004) ที่ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสลงในซิลิก้าโซล - เจลที่มีอนุภาคนาโนของเงินจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีรีเวิสไมเซลล์ ซึ่งพบว่า ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคนาโนเงินมีค่าเท่ากับ 40 นาโนเมตร โดยที่อนุภาคนาโนเงินในงานวิจัยดังกล่าวสามารถช่วยในการนำไฟฟ้า และดูดติดเอนไซม์เพื่อช่วยรักษาเสถียรภาพของไบโอเซนเซอร์ได้ดี

เป็นที่น่าสังเกตว่า ขนาดของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้นั้นมีขนาดของอนุภาคอยู่ในระดับปานกลาง และมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสซึ่งมีขนาด 4.8 นาโนเมตร (Takahashi และคณะ,2001) อยู่ประมาณ 8 เท่า จึงอาจกล่าวได้ว่า พื้นที่ผิวของอนุภาคนาโนเงินนี้จะมีค่าอยู่ในระดับปานกลางส่งผลให้ปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกดูดติดที่พื้นที่ผิวของอนุภาคนาโนเงินนั้นน่าที่จะมีค่าปานกลางเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคนาโนเงินที่มีพื้นที่ผิวมากจะมีความสามารถในการดูดติดเอนไซม์ได้มากตามไปด้วย (Ren และคณะ,2005) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าขนาดของอนุภาคนาโนเงิน 37 นาโนเมตรที่ได้จากการสังเคราะห์นี้มีความเหมาะสมพอสมควรที่จะนำไปใช้สำหรับการตรึงเอนไซม์ในการทดลองตอนต่อไปเพื่อให้เกิดประโยชน์ในงานด้านไบโอเซนเซอร์ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว



รูปที่ 5.2 แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคนาโนเงินที่วัดด้วยเครื่อง particle size analyzerในสารแขวนลอยอนุภาคนาโนเงินที่ได้จากการสังเคราะห์ความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรต 0.001 โมล่าร์ และโซเดียมโบโรไฮไดร์ 0.010 โมล่าร์ บนเครื่องปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที



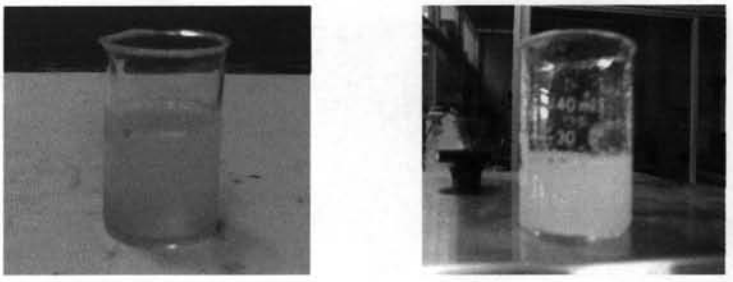
รูปที่ 5.3 แสดงภาพ TEM ของอนุภาคนาโนเงินในไคโตซานที่ได้จากการสังเคราะห์ความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรต 0.001 โมล่าร์ และโซเดียมโบโรไฮไดร์ 0.01 โมล่าร์ บนเครื่องเครื่องปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

5.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยา

5.2.1 พีเอชของไคโตซานต่อเอนไซม์ตรึงรูป

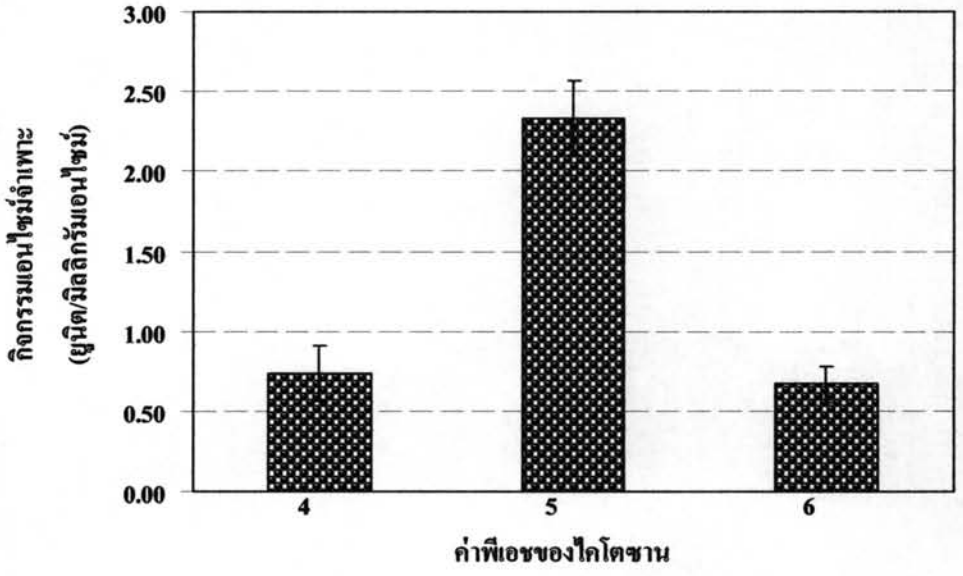
การทดลองหาค่าพีเอชของไคโตซานที่เหมาะสมสำหรับการห่อหุ้มเอนไซม์ในไคโตซานที่ปราศจากอนุภาคนาโนเงินจะทำการทดลองที่ค่าพีเอช 4 5 และ6 โดยพบว่าสารละลายของไคโตซานที่ช่วงพีเอชนี้จะมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน ดังในรูปที่ 5.4 (ก) และเป็นช่วงพีเอชที่เอนไซม์มีการทำงานได้ปกติโดยมีค่าเหมาะสมที่สุดที่พีเอช 6 (Fernandes และคณะ,2004) ดังนั้นจึงเป็นช่วงที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาทำการทดลอง ในขณะที่พีเอช 7 พบว่าสารละลายของไคโตซานมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ ขาวขุ่น ไม่เป็นเนื้อเดียวกันดังรูปที่ 5.4 (ข) และที่พีเอชมีค่าต่ำกว่า 4 พบว่า เอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปอยู่นั้นอาจมีการเสื่อมสภาพได้เนื่องจากสารละลายของไคโตซานมีความเป็นกรดมากเกินไป โดยในการทดลองนี้จะเตรียมไคโตซาน 1.0 % น้ำหนัก/ปริมาตรที่ค่าพีเอชต่างๆ เพื่อห่อหุ้มเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำเอนไซม์ตรึงรูปบนแผ่นฟิล์มของไคโตซานที่ได้ซึ่งจะมีความหนาเฉลี่ย 0.148 มิลลิเมตร มาตัดแบ่งให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ (ดูหัวข้อ 4.2.3) ที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นไพโรแกลลอล 0.013 โมล่าร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.050 โมล่าร์

จากการทดลองอิทธิพลของพีเอชของไคโตซานที่ พีเอช 4 5 และ 6 ที่แสดงในรูปที่ 5.5 พบว่า ที่ไคโตซานพีเอช 5 เอนไซม์มีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 2.33 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ในขณะที่ไคโตซานพีเอช 4 และ 6 เอนไซม์มีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเพียง 0.73 และ 0.66 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ของไคโตซานพีเอช 5 สูงกว่าไคโตซานพีเอช 4 และ6 ประมาณ 4 เท่า ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการแตกตัวเป็นประจุของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งกัมมันต์ของเอนไซม์มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในสภาวะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดี โดยภาวะทางประจุที่ตำแหน่งกัมมันต์ของเอนไซม์เป็นตัวกำหนดความสามารถในการเร่งปฏิริยาของเอนไซม์ จึงทำให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในเฉพาะช่วงพีเอชใดพีเอชหนึ่งเท่านั้น ดังเช่นในงานวิจัยของ Fernandes และคณะ(2004) พบว่า เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในสารตั้งต้นที่พีเอช 6 ทั้งนี้เมื่อเอนไซม์ถูกนำไปตรึงรูปในไคโตซานแล้วอาจทำให้ค่าพีเอชที่เหมาะสมเปลี่ยนแปลงไปเป็นพีเอช 5 โดยค่าพีเอชของไคโตซานที่เหมาะสมที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Luo และคณะ(2005) ,Lu และคณะ(2006) และTangkuaram และคณะ(2006) ซึ่งพบว่า พีเอชของไคโตซานที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส คือ พีเอช 5 ดังนั้น พีเอชของไคโตซาน 5 จึงมีความเหมาะสมมากที่สุดในการนำไปใช้สำหรับห่อหุ้มเอนไซม์ในการทดลองตอนต่อไป



(ก) (ข)

รูปที่ 5.4 แสดงลักษณะของสารละลายไคโตซานที่ (ก) พีเอช 5 และ (ข) พีเอช 7



รูปที่ 5.5 แสดงการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปในไคโตซานที่ปราศจากอนุภาคนาโนเงินที่พีเอช 4 5 และ 6 โดยทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร บนเครื่องปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6 (กิจกรรมของเอนไซม์อิสระ มีค่าเท่ากับ 666.00 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์)

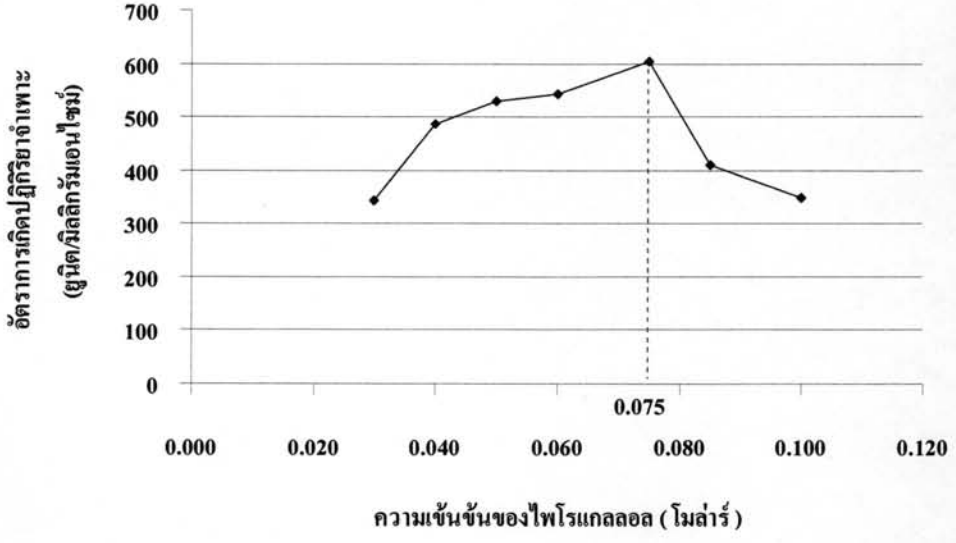
5.2.2 <u>ความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อการทำงานของเอนไซม์อิสระ</u>

ในการทดลองนี้จะทำการศึกษาหาความเข้มข้นของสารตั้งต้นไพโรแกลลอล และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อิสระ 0.012 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

5.2.2.1 <u>ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล</u>

การทดลองหาค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นไพโรแกลลอลที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อิสระที่ความเข้มข้น 0.012 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจะทำการทดลองศึกษาความเข้มข้นของไพโรแกลลอลทั้งหมด 7 ค่า คือ 0.030 , 0.040 , 0.050 , 0.060 , 0.075 , 0.085 และ 0.100 โมล่าร์ โดยที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีค่าคงที่ 0.50 โมล่าร์

แล้วนำค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้มาเปรียบเทียบกันในรูปของค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์



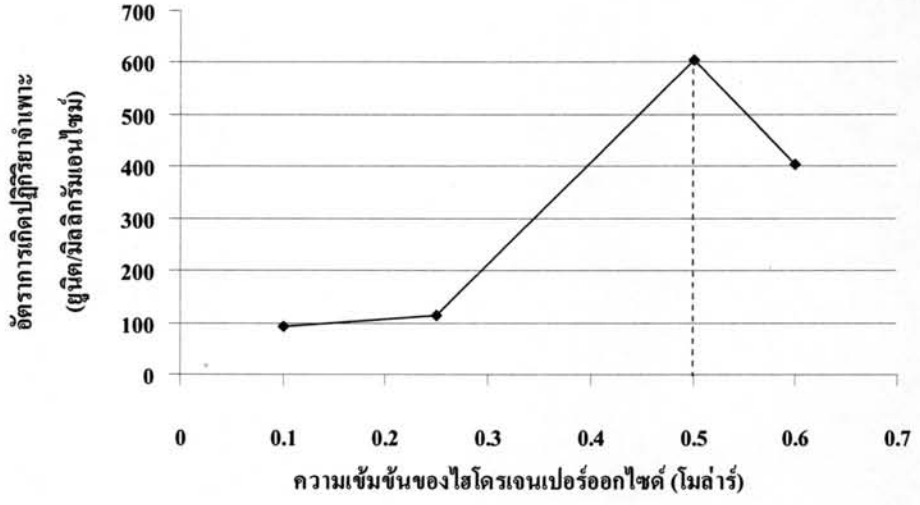
รูปที่ 5.6 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์อิสระที่ความเข้มข้นของไพโรแกลลอลต่างๆ โดยมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์คงที่ที่ 0.50 โมล่าร์ สภาวะในการทดลอง : ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6

จากรูปที่ 5.6 พบว่า ที่ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 604.60 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าที่ได้นี้มีค่าใกล้เคียงกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์อิสระที่ความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ในหัวข้อ 5.2.2) ในขณะที่ ที่ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.030 และ 0.100 โมล่าร์ เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะต่ำสุด โดยมีค่าเท่ากับ 344.60 และ349.46 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ตามลำดับ ซึ่งสาเหตุที่ทำให้อัตราเกิดปฏิกิริยาจำเพาะต่ำสุดที่ทั้ง 2 ความเข้มข้นนั้น อาจมีสาเหตุที่แตกต่างกันออกไป โดยในกรณีของความเข้มข้นไพโรแกลลอล 0.030 โมล่าร์ อาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่น้อยเกินไป จึงทำให้สารตั้งต้นมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการจับกับเอนไซม์ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสารตั้งต้นอยู่มาก ส่งผลให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ถูกจำกัด ส่วนในกรณีของความเข้มข้นไพโรแกลลอล 0.100 โมล่าร์นั้นอาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่มากเกินไป จนเกิดการยับยั้งปฏิกิริยาจากสารตั้งต้นกันเองทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์มีค่าต่ำลงไป ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ มีความเหมาะสมในการนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ที่ความเข้มข้น

0.012 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยจะส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ในการทดลองต่อไปมีความน่าเชื่อถือ

5.2.2.2 ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

จากการทดลองที่ผ่านมาในหัวข้อ 5.2.2.1 พบว่า ที่ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีค่าคงที่ 0.50 โมล่าร์ จึงเป็นเหตุให้มีการศึกษาต่อเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสม โดยทำการทดลองศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทั้งหมด 4 ค่า คือ 0.10 , 0.25 , 0.50 และ 0.60 โมล่าร์



รูปที่ 5.7 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์อิสระที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่างๆ โดยมีความเข้มข้นของไพโรแกลลอลคงที่ที่ 0.075 โมล่าร์ สภาวะในการทดลอง : ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6

จากรูปที่ 5.7 พบว่า ในช่วงแรกที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.10 และ 0.25 โมล่าร์ เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะเพียง 93.73 และ 114.83 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุที่สารตั้งต้นมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการจับกับเอนไซม์ จึงทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นน้อยส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะมีค่าต่ำ ต่อมาเมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีค่าสูงขึ้นเป็น 0.50 โมล่าร์ เอนไซม์มีค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะสูงสุดถึง 604.60 ยูนิต/มิลลิกรัม โดยมีค่าสูงกว่าที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ค่าอื่นๆอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็น

0.6 โมล่าร์ เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะเพียง 405.00 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ โดยอาจมีสาเหตุมาจากการยับยั้งปฏิกิริยาจากสารตั้งต้น (ดูหัวข้อ5.2.2.1)

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้นจึงทำให้เราสามารถสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.50 โมล่าร์ มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์อิสระที่ความเข้มข้น 0.012 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรได้เป็นอย่างดี ซึ่งความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมทั้ง 2 ชนิดนี้จะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการนำไปศึกษาต่อเพื่อหาความเข้มข้นของสารตั้งต้นในกรณีของเอนไซม์ตรึงรูป

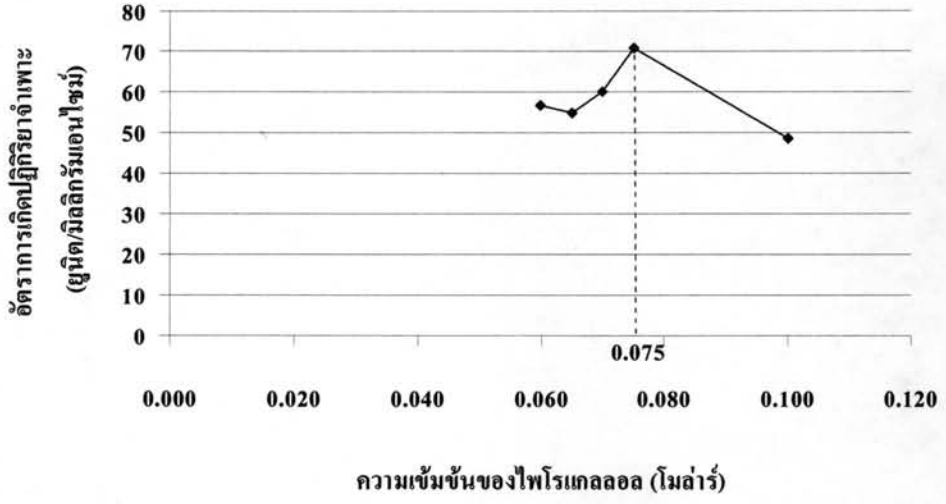
5.2.3 <u>ความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูป</u>

หลังจากการทดลองหาค่าความเข้มข้นของไพโรแกลลอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์อิสระแล้วนั้น ทำให้เราทราบว่าความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.50 โมล่าร์ เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด เราจึงใช้ข้อมูลเหล่านี้เป็นแนวทางในการศึกษาหาความเข้มข้นของไพโรแกลลอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมในกรณีของเอนไซม์ตรึงรูป

5.2.3.1 <u>ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล</u>

การทดลองหาค่าความเข้มข้นของไพโรแกลลอลที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในไคโตซาน 1.0 % น้ำหนัก/ปริมาตร ที่ปราศจากอนุภาคนาโนเงิน ซึ่งจะทำการทดลองศึกษาความเข้มข้นของไพโรแกลลอลทั้งหมด 5 ค่า คือ 0.060 , 0.065 , 0.070 , 0.075 และ 0.100 โมล่าร์ โดยความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีค่าคงที่ที่ 0.50 โมล่าร์

จากรูปที่ 5.8 พบว่า ที่ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะสูงสุด 70.75 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ในขณะที่ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.060 , 0.065 และ 0.070 โมล่าร์ เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ 56.56 , 54.73 และ 60.16 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ตามลำดับ และเมื่อความเข้มข้นของไพโรแกลลอลมีค่าสูงขึ้นเป็น 0.100 โมล่าร์ เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะต่ำที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 48.50 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ที่ทุกๆค่าความเข้มข้นของไพโรแกลลอล เอนไซม์ตรึงรูปมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะต่ำกว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์อิสระคิดเป็น 8.5 เท่า ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากเอนไซม์ตรึงรูปอยู่คนละวัฏภาคกับสารตั้งต้น ทำให้เกิดปัญหาการถ่ายเทมวลสารของสารตั้งต้นจากสารละลายไปยังตำแหน่งกัมมันต์ของเอนไซม์ได้ไม่ดี(Chang และคณะ ,2005) แต่อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ ก็ยังคงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เช่นเดียวกันกับในกรณีเอนไซม์อิสระ



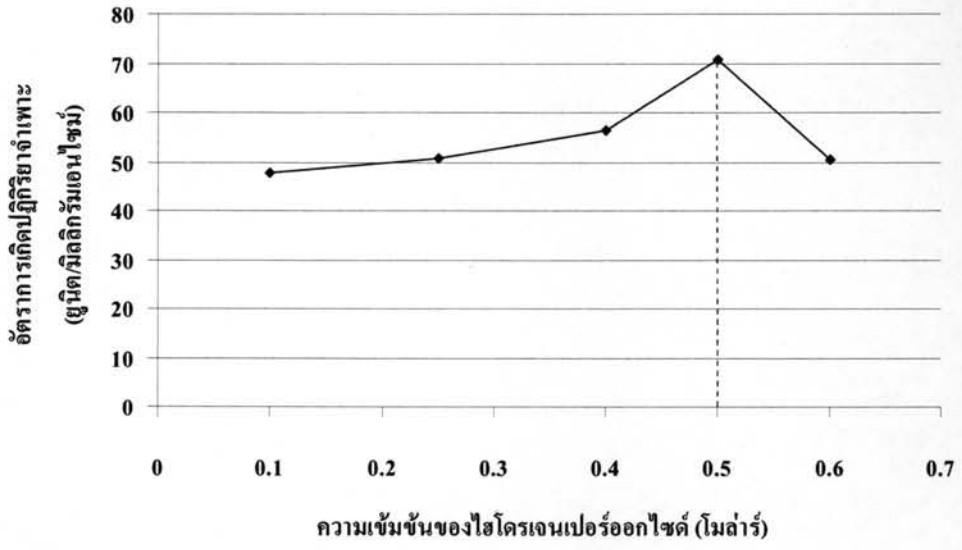
รูปที่ 5.8 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปที่ความเข้มข้นของไพโรแกลลอลต่างๆ โดยมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์คงที่ที่ 0.50 โมล่าร์ สภาวะในการทดลอง : ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6

5.2.3.2 <u>ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์</u>

จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า ทั้งในกรณีเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปความเข้มข้นของไพโรแกลลอลที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ คือ 0.075 โมล่าร์ ที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.50 โมล่าร์ ดังนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้นี้มาศึกษาต่อเพื่อหาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมในกรณีของเอนไซม์ตรึงรูปที่สภาวะเดียวกัน(หัวข้อ 5.2.3.1) โดยจะทำการศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทั้งหมด 5 ค่า คือ 0.10 , 0.25 , 0.40 , 0.50 และ 0.60 โมล่าร์

จากรูปที่ 5.9 พบว่า ในช่วงแรกที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.10 , 0.25 และ 0.40 โมล่าร์ เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 47.70 , 50.76 และ 56.46 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุที่สารตั้งต้นมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการจับกับเอนไซม์ จึงทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นน้อยส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะมีค่าต่ำ ต่อมาเมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีค่าสูงขึ้นเป็น 0.50 โมล่าร์ เอนไซม์มีค่าอัตราปฏิกิริยาจำเพาะสูงสุดถึง 70.75 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ โดยมีค่าสูงกว่าที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ค่าอื่นๆ และเมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นเป็น 0.60 โมล่าร์ เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะเพียง 50.36 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ โดยอาจ

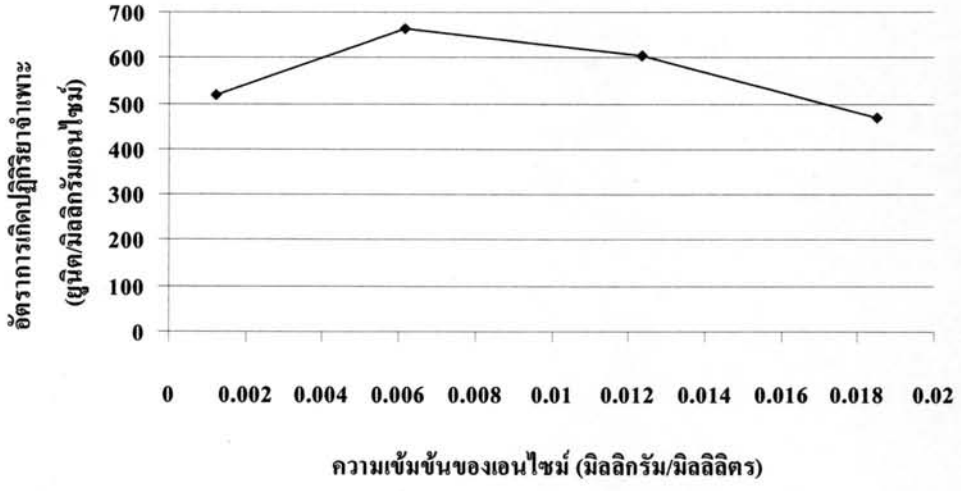
มีสาเหตุมาจากการยับยั้งปฏิกิริยาจากสารตั้งต้นที่มีปริมาณมากเกินพอ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.50 โมล่าร์ มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 5.9 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่างๆ โดยมีความเข้มข้นของไพโรแกลลอลคงที่ที่ 0.075 โมล่าร์ สภาวะในการทดลอง : ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6

จากผลการทดลองข้างต้นที่แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.50 โมล่าร์ มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นเมื่อนำความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมที่ได้นี้ไปทดสอบในการเร่งปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระต่างๆ ดังรูปที่ 5.10 พบว่า ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.006 และ 0.012 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะมีค่าสูงประมาณเดียวกัน โดยมีค่าเท่ากับ 665.06 และ 604.60 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ในขณะที่เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ลดลงเป็น 0.001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะมีค่าลดลงเป็น 520.00 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ทั้งนี้อาจจะเกิดการยับยั้งจากสารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นมากเกินไปเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเอนไซม์ที่มีอยู่ในสารละลาย และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 0.018 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะมีค่าลดลงเป็น 468.00 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่สาร

ตั้งต้นมีปริมาณไม่เพียงพอกับปริมาณเอนไซม์ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าที่ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.50 โมล่าร์มีความเหมาะสมสำหรับในการเร่งปฏิกิริยาของความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.006 และ 0.012 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรมากกว่าในการเร่งปฏิกิริยาของความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.001 และ 0.018 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเนื่องจากในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ฮอร์ สแรดิชเปอร์ออกซิเดสในวัสดุประกอบแต่งไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนเงินด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ box-behnken ซึ่งมีลักษณะรูปแบบการทดลองเป็นลูกบาศก์ และกำหนดระดับของตัวแปรเป็น 3 ระดับที่มีระยะห่างเท่าๆกัน ดังนั้นจึงทำให้เราเลือกใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.006 และ 0.012 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะที่มีค่าสูงใกล้เคียงกันอยู่แล้วมาใช้เป็นช่วงความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการศึกษาของงานวิจัยนี้

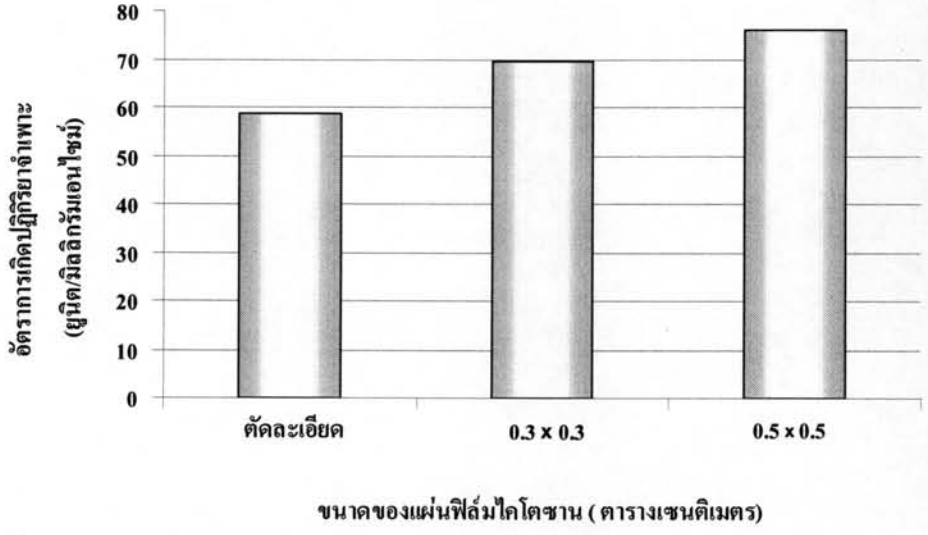


รูปที่ 5.10 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์อิสระที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.001 , 0.006 , 0.012 และ 0.018 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.50 โมล่าร์ และไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ สภาวะในการทดลอง : ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6

5.2.4 <u>ขนาดของแผ่นฟิล์มไคโตซานที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา</u>

จากผลการทดลองในหัวข้อ 5.2.2 และ 5.2.3 ทำให้เราพบว่า อัตราการเร่งปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าน้อยกว่าเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุสามประการ คือ การที่ขั้นตอนการถ่ายเทมวลสารเป็นขั้นตอนกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยาในกรณีเอนไซม์ตรึงรูป

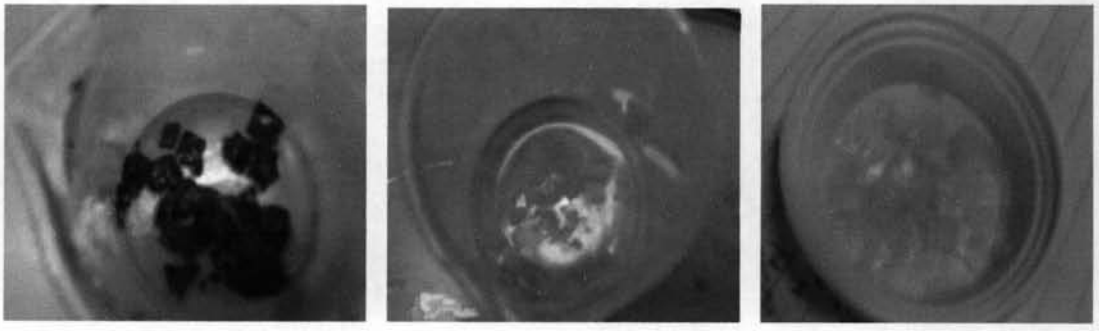
การเสื่อมสภาพของเอนไซม์เมื่อผ่านกระบวนการตรึงรูป และการที่ผลิตภัณฑ์ถูกดูดซับไว้เป็นปริมาณมากในฟิล์มไคโตซานจึงทำให้การวัดปริมาตรผลิตภัณฑ์ในสารละลายนั้นมีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง ดังนั้นเราจึงทำการทดสอบผลของขั้นตอนการถ่ายเทมวลสารต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะโดยการเปลี่ยนแปลงขนาดของฟิล์มไคโตซาน ซึ่งจะทำการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในไคโตซาน 1.0 % น้ำหนัก/ปริมาตร ที่พีเอช 5 และปราศจากอนุภาคนาโนเงิน จากนั้นทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ได้ซึ่งมีความหนาเฉลี่ยของฟิล์ม 0.148 มิลลิเมตร มาตัดแบ่งเป็น 3 ขนาด คือ ขนาดตัดละเอียด 0.3 x 0.3 และ 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ (ดูหัวข้อ 4.3.3) ที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.50 โมล่าร์



รูปที่ 5.11 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปในไคโตซานที่ปราศจากอนุภาคนาโนเงินที่ขนาดของแผ่นฟิล์มไคโตซานแบบตัดละเอียด 0.3 x 0.3 และ 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร สภาวะในการทดลอง : ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6

จากรูปที่ 5.11 พบว่า ที่ขนาดของแผ่นฟิล์มไคโตซาน 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 76.00 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ในขณะที่เมื่อทำการลดขนาดของแผ่นฟิล์มไคโตซานลง 0.3 x 0.3 ตารางเซนติเมตร เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะลดลงโดยมีค่าเพียง 69.50 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ และเมื่อทำการตัด

แผ่นฟิล์มไคโตซานอย่างละเอียด พบว่า เอนไซม์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะลดต่ำลงไปอีก โดยมีค่าเท่ากับ 58.83 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่า ขั้นตอนการถ่ายเทมวลสาร ไม่ได้เป็นขั้นตอนที่กำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยาแต่อย่างใด แต่อาจจะเกิดจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีบางส่วนถูกดูดซับไว้ในแผ่นฟิล์มไคโตซาน จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่วัดได้มีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง ดังจะเห็นได้จาก การเปลี่ยนแปลงสีของแผ่นฟิล์มไคโตซานที่มีเอนไซม์ตรึงรูปนั้น พบว่า มีสีดำเข้มขึ้นมากหลังจากผ่านการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาดังรูปที่ 5.12 (ก) ในขณะที่แผ่นฟิล์ม ไคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์ตรึงรูปอยู่นั้น (ตัวควบคุม) ดังรูปที่ 5.12 (ข) จะมีสีไม่เปลี่ยนแปลงเท่าใดนัก เมื่อเปรียบเทียบกับสีของแผ่นฟิล์มไคโตซานในช่วงแรกที่ยังไม่ผ่านการทดสอบการเร่งปฏิกิริยา ดังรูปที่ 5.12 (ค) นอกจากนี้ยังอาจมีสาเหตุมาจากการเสื่อมสภาพของเอนไซม์เมื่อผ่านกระบวนการตรึง ซึ่งอาจจะทำให้เอนไซม์มีโครงสร้างสามมิติที่ไม่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงทำให้สรุปได้ว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ที่ลดลงในกรณีเอนไซม์ตรึงรูปเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีเอนไซม์อิสระน่าจะมีสาเหตุมาจากการดูดซับผลิตภัณฑ์ในแผ่นฟิล์มไคโตซาน และการเสื่อมสภาพของเอนไซม์บางส่วนเมื่อผ่านกระบวนการตรึงรูป โดยมีขนาดของแผ่นฟิล์มไคโตซาน 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร เป็นขนาดที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาในการทดลองตอนต่อไป



(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 5.12 แสดงสีของแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ (ก) มีเอนไซม์ตรึงรูป (ข) ไม่มีเอนไซม์ตรึงรูป หลังจากการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และ (ค) แผ่นฟิล์มไคโตซานที่มีเอนไซม์ตรึงรูปก่อนการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

5.3 สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสในวัสดุประกอบแต่งไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนเงินด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ box-behnken

หลังจากการทดลองการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้เราทราบว่า พีเอชของไคโตซานที่พีเอช 5 นั้นมีความเหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ และความเข้มข้นของไพโรแกลอล 0.075 โมล่าร์และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.50 โมล่าร์ จะเป็นความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป นอกจากนี้ขนาดของแผ่นฟิล์มไคโตซาน 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร จะเป็นขนาดของแผ่นฟิล์มที่มีความเหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นเราจึงนำข้อมูลที่ได้นี้ไปใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสในวัสดุประกอบแต่งไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนเงินด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ box-behnken ซึ่งมีจำนวนตัวแปร 3 ตัวแปร และกำหนดให้ระดับของตัวแปรแต่ละตัวแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง สูง (ตารางที่ 4.2) ซึ่งจะพบว่า ความเข้มข้นของไคโตซานที่เลือกใช้ในการทดลอง คือ 0.5-1.5 % น้ำหนักโดยปริมาตร (Wang และคณะ,2003 , Luo และคณะ,2005 , Yang และคณะ,2000) ทั้งนี้เมื่อไคโตซานมีความเข้มข้นสูงเกินไปอาจจะทำให้ละลายได้ยากจึงส่งผลให้สารละลายที่ได้ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ในขณะที่ถ้าความเข้มข้นของไคโตซานน้อยเกินไปจะทำให้ฟิล์มที่เกิดขึ้นมีความบางมากเกินไปยากแก่การตัดฟิล์มให้ได้ขนาดที่ต้องการ เนื่องจากฟิล์มที่บางนั้นจะมีโอกาสฉีกขาดได้ง่าย จึงไม่เหมาะสมที่จะนำทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสตรึงรูปที่เลือกใช้ในการทดลองนี้ คือ 0.05 - 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งได้จากการทดลองในหัวข้อ 5.2.3 ที่พบว่า ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.50 โมล่าร์มีความเหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระ 0.006 และ 0.012 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลที่สำคัญที่เลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ตรึงรูป 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเป็นขอบเขตบนในการทดลองนี้ ทั้งนี้เพื่อให้สอดคล้องกับความเข้มข้นของเอนไซม์ 2 ระดับแรกที่มีช่วงระยะห่างเท่าๆกัน คือ 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบ box-behnken และความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ 0.4×10^{-2} - 1.2×10^{-2} นาโนโมล่าร์ (Luo และคณะ, 2004 , Tangkuaram และคณะ,2006)

ตารางที่ 5.1 แสดงกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะที่ได้จากการทดลองตามวิธีออกแบบการทดลองแบบ box-behnken

การทดลองที่	ความเข้มข้นของตัวแปร			กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์)
	ไคโตซาน (%น้ำหนัก/ปริมาตร)	อนุภาคนาโนเงิน (นาโนโมล่าร์)	เอนไซม์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	
1	0.5	1.2×10^{-2}	0.10	147.46
2	1.0	1.2×10^{-2}	0.05	71.46
3	1.0	0.4×10^{-2}	0.05	76.66
4	0.5	0.8×10^{-2}	0.05	78.86
5	0.5	0.8×10^{-2}	0.15	231.83
6	1.0	1.2×10^{-2}	0.15	22.66
7	1.5	1.2×10^{-2}	0.10	8.65
8	1.0	0.4×10^{-2}	0.15	23.20
9	1.5	0.8×10^{-2}	0.05	18.26
10	1.5	0.4×10^{-2}	0.10	13.36
11	1.5	0.8×10^{-2}	0.15	9.66
12	1.0	0.8×10^{-2}	0.10	37.46
13	0.5	0.4×10^{-2}	0.10	226.56
14	1.0	0.8×10^{-2}	0.10	51.60
15	1.0	0.8×10^{-2}	0.10	43.06

เมื่อได้ขอบเขตการทดลองแล้วจะทำการออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรม minitab จะได้ตารางการทดลองดังตารางที่ 5.1 จากนั้นจึงเตรียมการตรึงเอนไซม์ในไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนเงินตามตารางที่ 5.1 เพื่อนำไปทดสอบหากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปในบีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร บนเครื่องปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งจะแสดงผลการทดลองที่ได้นี้ในตารางที่ 5.1 และหลังจากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้นี้ไปวิเคราะห์สถิติการทดลองด้วย

โปรแกรม minitab เพื่อหาแบบจำลองที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถแสดงความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะต่อความเข้มข้นของไคโตซาน ความเข้มข้นของเอนไซม์ และความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน โดยแบบจำลองที่ได้นั้นจะนำมาใช้วิเคราะห์พื้นผิวผลตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุดในการออกแบบการทดลองนี้

5.3.1 <u>การวิเคราะห์แบบจำลองพื้นผิวผลตอบที่เหมาะสมกับข้อมูลการทดลองด้วยโปรแกรม minitab</u>

การทดลองนี้จะเป็นการหาแบบจำลองที่เหมาะสมที่สุดเพื่ออธิบายถึงความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์กับความเข้มข้นของไคโตซาน ความเข้มข้นของเอนไซม์ และความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินที่ได้ทำการทดลองไว้ในตารางที่ 5.1 โดยแบบจำลองที่ใช้พิจารณามี 4 แบบจำลอง ดังตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 แสดงลักษณะแบบจำลองพื้นผิวผลตอบแบบต่างๆ

แบบจำลอง	รูปแบบ
Linear	$\hat{y} = \beta_0 + \beta_i \sum_{i=1}^{n} x_i$
Linear + interaction	$\hat{y} = \beta_0 + \beta_i \sum_{i=1}^{n} x_i + \beta_{ij} \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{m} x_i x_j$
Linear + square	$\hat{y} = \beta_0 + \beta_i \sum_{i=1}^{n} x_i + \beta_{ij} \sum_{i=1}^{n} x_i^2$
Full quadratic	$\hat{y} = \beta_0 + \beta_i \sum_{i=1}^{n} x_i + \beta_{ij} \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{m} x_i x_j + \beta_{ij} \sum_{i=1}^{n} x_i^2$

ในการทดสอบความเหมาะสมของแบบจำลองนั้นจะพิจารณาจากค่า R^2 , R^2 (adj) และ standard error (SE) ของแต่ละแบบจำลองแล้วนำมาเปรียบเทียบกัน โดยค่าดังกล่าวจะแสดงในตารางที่ 5.3 ซึ่งพบว่า แบบจำลอง full quadratic มีค่า R^2และ R^2(adj) มากที่สุด และ standard error น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแบบจำลองอื่นๆ โดยมีค่าเท่ากับ 88.2 % , 66.9 % และ 42.58 % ตามลำดับ ดังนั้น แบบจำลอง full quadratic จึงเป็นแบบจำลองที่มีความเหมาะสมในการอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆกับ กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ

ตารางที่ 5.3 แสดงค่าสถิติต่างๆ ในแต่ละแบบจำลอง

แบบจำลอง	R^2(%)	R^2(adj)(%)	SE
Linear	67.3	58.4	47.74
Linear+interaction	77.6	60.8	46.31
Linear+square	77.9	61.2	46.07
Full quadratic	88.2	66.9	42.58

5.3.2 <u>การวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของแบบจำลอง</u>

จากผลการทดลองที่หัวข้อ 5.3.1 ทำให้เราทราบว่าแบบจำลองที่เหมาะสมที่สุดในการอธิบายความสัมพันธ์ตัวแปรต่างๆกับกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ คือ แบบจำลอง full quadratic โดยแบบจำลองนี้จะสามารถหาค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรต่างๆได้จากโปรแกรมminitab ดังในตารางที่ 5.4

ตารางที่ 5.4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรต่างๆของแบบจำลอง full quadratic ด้วยโปรแกรม minitab

Term	Coef	SE Coef	T	P
constant	332.159	212.20	1.565	0.178
Chitosan	-436.008	216.43	-2.015	0.100
Agnano	-220.853	270.53	-0.816	0.451
HRP	207.024	216.43	0.957	0.383
Chitosan*Chitosan	182.246	88.64	2.056	0.095
Agnano* Agnano	58.781	138.50	0.424	0.689
HRP*HRP	-19.797	88.64	-0.223	0.832
Chitosan* Agnano	92.987	106.45	0.874	0.422
Chitosan*HRP	-161.573	85.16	-1.897	0.116
Agnano*HRP	5.834	106.45	0.055	0.958
S = 42.58	**R-Sq = 88.2 %**		**R-Sq(adj) = 66.9 %**	

ดังนั้น จะสามารถเขียนแบบจำลองแสดงความสัมพันธ์กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะกับตัวแปรต่างๆ ได้ดังสมการที่ 5.1

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ} = 332.159 - 436.008\text{Chitosan} - 220.853\text{Agnano} + 207.024\text{HRP} + 182.246\text{Chitosan}^2 + 58.781\text{Agnano}^2 - 19.797\text{HRP}^2 + 92.987\text{Chitosan*Agnano} - 161.573\text{Chitosan*HRP} + 5.834\text{Agnano*HRP} \quad \text{---------- (5.1)}$$

จากตารางที่ 5.4 พบว่า ค่า p-value ของ Chitosan^2 และ Chitosan มีค่าต่ำสุดโดยมีค่าเท่ากับ 0.095 และ 0.100 ซึ่งจะมีค่าน้อยกว่าและเท่ากับ $\alpha = 0.100$ (ระดับความเชื่อมั่น 90 %) ตามลำดับ จึงกล่าวได้ว่า ความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะกับ Chitosan^2 และChitosan เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % แต่ในขณะเดียวกลับ พบว่าค่า p-value ของ Chitosan*HRP มีค่ามากกว่า 0.100 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะกับChitosan*HRP เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นน้อยกว่า 90 % และพบว่าที่ค่า p-value ของ Agnano , HRP และChitosan* Agnano มีค่ามากกว่า $\alpha = 0.300$ (ระดับความเชื่อมั่น 70 %) แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะกับ Agnano ,HRP และChitosan* Agnano เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นต่ำกว่า 70 % และนอกจากนี้ยังพบว่าตัวแปร HRP^2 , Agnano*HRP และ Agnano^2 มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะน้อยมากเนื่องจากมีระดับความเชื่อมั่นต่ำกว่า 70% มาก ๆ ($p\text{-value} >> 0.3$) จึงกล่าวได้ว่าตัวแปร HRP^2 , Agnano*HRP และ Agnano^2 แทบจะไม่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะที่เกิดขึ้นเลย

5.3.3 <u>การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลอง (anova analysis)</u>

ในการทดลองตอนนี้จะวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยการทดสอบนัยสำคัญของการถดถอย เพื่อจะตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรผลตอบ y และเซตย่อยของตัวแปรถดถอย $x_1, x_2, \ldots, x_k$ ซึ่งจะแบ่งการทดสอบนี้ออกเป็น 2 ส่วน คือ การวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง และวิเคราะห์นัยสำคัญของสัมประสิทธิ์ของแบบจำลอง

5.3.3.1 <u>วิเคราะห์นัยสำคัญของสัมประสิทธิ์ของแบบจำลอง</u>

จากการทดลองนี้จะใช้ค่าสถิติ F_0 ของการถดถอยที่มีองศาความเป็นอิสระของการถดถอยและองศาความเป็นอิสระของส่วนตกค้างซึ่งมีค่าเท่ากับ 9 และ 5 ตามลำดับ ตามตารางที่ 5.5 มาทำการเปรียบเทียบกับค่าสถิติทดสอบ $F_{\alpha, 9, 5}$ ที่ระดับนัยสำคัญต่างๆ ตามตารางที่ 5.6 เพื่อทดสอบสมมติฐานที่ตั้งไว้

ตารางที่ 5.5 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองด้วยโปรแกรม minitab

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	67598.0	67598.0	7510.89	4.14	0.066
Linear	3	51594.6	11713.8	3904.58	2.15	0.212
Square	3	8088.5	8088.0	2696.01	1.49	0.325
Interaction	3	7915.4	7915.4	2638.46	1.46	0.332
Residual Error	5	9065.8	9065.8	1813.16	-	-
Lack of Fit	3	8964.5	8964.5	2988.17	58.99	0.017
Pure Error	2	101.3	101.3	50.65	-	-
Total	14	76663.8	-	-	-	-

ตารางที่ 5.6 แสดงค่าสถิติทดสอบ $F\alpha_{,9,5}$ ที่ระดับนัยสำคัญต่างๆดังนี้

ระดับนัยสำคัญ	75 %	90%	95%	97.5%	99%	F_0
$F\alpha_{,9,5}$	1.89	3.32	4.77	6.68	10.16	4.14

ทั้งนี้ถ้าค่า $F_0 > F\alpha_{,k,n-k-1}$ หมายถึงการปฏิเสธ H_0 นั่นคือ สัมประสิทธิ์ตัวแปรถดถอยอย่างน้อย 1 ตัวจะไม่เท่ากับศูนย์ที่ระดับนัยสำคัญ α ซึ่งพบว่าค่า F_0 ที่ได้จากการประมวลผลของโปรแกรม minitab มีค่าเท่ากับ 4.14 ตามตารางที่ 5.5 เมื่อนำค่า F_0 ที่ได้นี้ไปเปรียบเทียบกับค่าค่าสถิติทดสอบ $F\alpha_{,9,5}$ ที่ระดับนัยสำคัญต่างๆจะพบว่ามีค่ามากกว่าค่าสถิติทดสอบ $F_{,9,5}$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า สัมประสิทธิ์ตัวแปรถดถอยอย่างน้อย 1 ตัวจะไม่เท่ากับศูนย์ที่ระดับนัยสำคัญ 90 %

นอกจากนี้ค่า p-value ยังเป็นค่าสถิติอีกค่าหนึ่งที่สามารถใช้ในการทดสอบสมมติฐานได้ ทั้งนี้จะปฏิเสธ H_0 ได้ก็ต่อเมื่อ p-value ของการถดถอย มีค่าน้อยกว่า α โดยพบว่าค่า p-value ที่ได้จากตารางที่ 5.5 มีค่าเท่ากับ 0.066 ซึ่งจะมีค่า p-value < 0.100 ซึ่งแสดงว่าสัมประสิทธิ์ตัวแปรถดถอยอย่างน้อย 1 ตัวจะไม่เท่ากับศูนย์ที่ระดับนัยสำคัญ 90 %

5.3.3.2 การวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง

เนื่องจากทดลองนี้ได้ใช้วิธีการออกแบบการทดลองแบบ box-behnken ซึ่งจะมีการทำซ้ำที่จุดศูนย์กลางของการทดลอง จึงทำให้สามารถหาตัวประมาณของความผิดพลาดในการทดลองได้โดยตรง (pure experimental error) ซึ่งค่าความคลาดเคลื่อนนี้จะแบ่งออก 2 ส่วน คือ ค่าความคลาดเคลื่อนจากความผิดพลาดในการทดลองได้โดยตรง และค่าความคลาดเคลื่อนจากความไม่สมรูปของแบบจำลองกับข้อมูล (lack of fit) โดยการวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง full quadratic จะทำการตรวจสอบโดยใช้ค่าสถิติ F ที่มีองศาความเป็นอิสระของ lack of fit และองศาความเป็นอิสระของ pure error ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3 และ 2 ตามลำดับ ตามตารางที่ 5.5 มาทำการเปรียบเทียบกับค่าสถิติทดสอบ $F\alpha_{,3,2}$ ที่ระดับนัยสำคัญต่างๆ ตามตารางที่ 5.7 เพื่อพิจารณาถึงความสมรูปของแบบจำลองกับข้อมูลการทดลอง

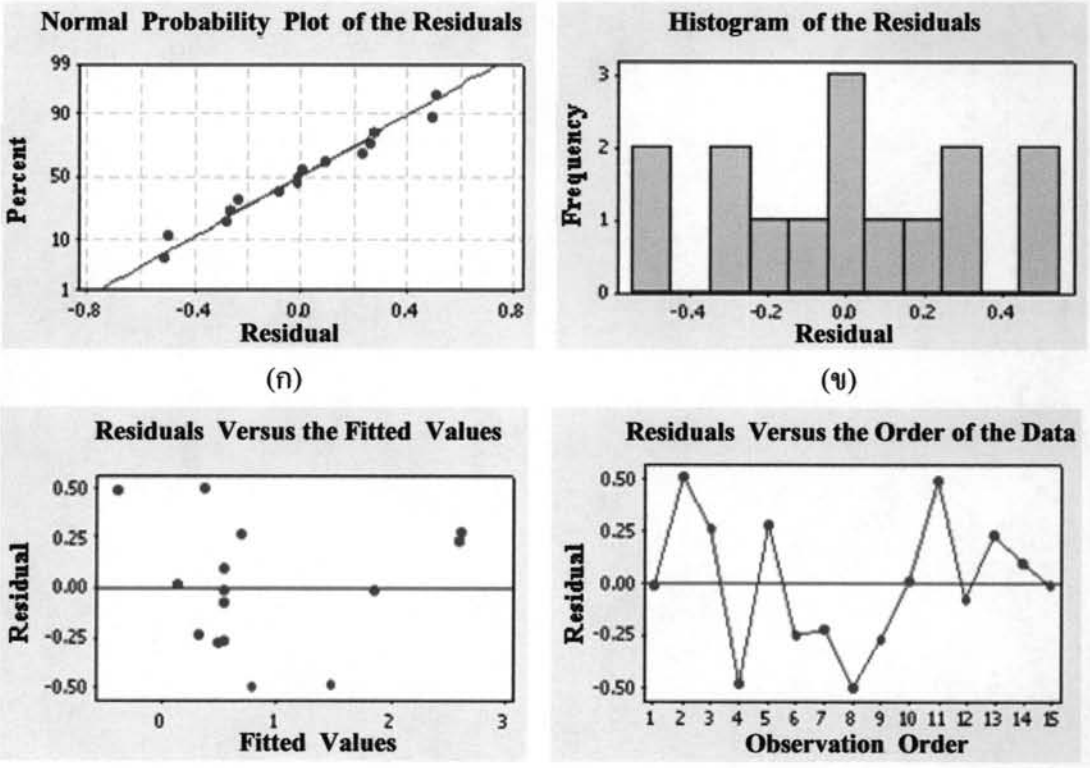
ตารางที่ 5.7 แสดงค่าสถิติทดสอบ $F\alpha_{,3,2}$ ที่ระดับนัยสำคัญต่างๆดังนี้

ระดับนัยสำคัญ	75 %	90%	95%	97.5%	99%	F_0
$F\alpha_{,3,2}$	3.15	9.16	19.16	39.17	99.17	58.99

โดยถ้าค่า $F_0 < F\alpha_{,n-k-nc,\ nc-1}$ จะกล่าวได้ว่าฟังก์ชันการถดถอยนั้นเป็นแบบพอลิโนเมียล หรือแบบจำลอง full quadratic ซึ่งพบว่าค่า F_0 ที่ได้จากการประมวลผลของโปรแกรม minitab มีค่าเท่ากับ 58.99 ตามตารางที่ 5.5 เมื่อนำค่า F_0 ที่ได้นี้ไปเปรียบเทียบกับค่าค่าสถิติทดสอบ $F\alpha_{,3,2}$ ที่ระดับนัยสำคัญต่างๆจะพบว่ามีค่าน้อยกว่าค่าสถิติทดสอบ $F_{3,2}$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % แสดงให้เห็นว่าค่าความเคลื่อนจากความไม่สมรูปของแบบจำลองกับข้อมูลมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % นั้นคือ ยอมให้แบบจำลองที่ได้นั้นมีความน่าจะเป็นที่ไม่มีความสมรูปกับข้อมูลเป็น 1 %

นอกจากนี้ค่าสถิติ p-value สามารถใช้ทดสอบความคลาดเคลื่อนจากความไม่สมรูปของแบบจำลองกับข้อมูลนั้นได้อีกค่าหนึ่ง โดยพบว่าค่า p-value ของ lack of fit ที่ได้จากตารางที่ 5.5 มีค่าเท่ากับ 0.017 ซึ่งจะมีค่า p-value > 0.010 จึงแสดงให้เห็นว่าความคลาดเคลื่อนจากความไม่สมรูปของแบบจำลองกับข้อมูลไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

5.3.3.3 การวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนระหว่างแบบจำลองกับผลการทดลอง (residual analysis)



รูปที่5.13 แสดงกราฟวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนระหว่างแบบจำลอง full quadratic กับผลการทดลอง โดยที่ (ก) แสดงความเป็นปกติของข้อมูล (ข) แสดงความเป็นปกติของข้อมูลแบบฮีสโตแกรม (ค) แสดงเสถียรภาพของความแปรปรวนของข้อมูล(ง) แสดงความเป็นอิสระของข้อมูล

จากผลการทดลองที่ได้มานั้นจะสามารถนำมาประมวลผลด้วยโปรแกรม minitab เพื่อสร้างกราฟที่ใช้อธิบายความคลาดเคลื่อนของแบบจำลอง full quadratic กับผลการทดลองได้ดังในรูปที่ 5.13 (ก) ซึ่งจะแสดงความเป็นปกติของข้อมูล โดยพบว่า ลักษณะการกระจายตัวของข้อมูลนั้นใกล้เคียงกับเส้นมาสเตอร์ ดังนั้นแสดงว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้มีการแจกแจงแบบปกติ นั่นคือ ข้อมูลที่ได้มาจากการทดลองมีค่าคงที่และมีความคลาดเคลื่อนน้อย และถ้าหากข้อมูลมีจำนวนมากกว่า 30 ตัว แนวโน้มของกราฟที่ได้จะมีลักษณะเป็นระฆังคว่ำ และจากรูปที่ 5.13 (ข) ซึ่งแสดงความเป็นปกติของข้อมูลแบบฮีสโตแกรม โดยพบว่า ข้อมูลที่ได้มีความถี่ส่วนใหญ่กระจายอยู่ในช่วง -0.4 ถึง 0.4 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยมีลักษณะการกระจายของข้อมูลแบบสมมาตร จึงกล่าวได้ว่าข้อมูลที่ได้นี้มีความเป็นแบบปกติ ถึงแม้ว่ามี 2 ข้อมูลที่มีความคลาดเคลื่อนเกินช่วงที่

ยอมรับได้ แต่ยังคงไม่ทำให้แบบจำลองมีความไม่น่าเชื่อถือเกิดขึ้นเนื่องจากค่าสถิติที่ใช้ทดสอบความเชื่อมั่นของแบบจำลองอยู่ในช่วงที่เชื่อถือได้

จากรูปที่ 5.13 (ค) แสดงเสถียรภาพของข้อมูล โดยพบว่า ข้อมูลในแต่ละการทดลองมีความผันแปรรอบค่าศูนย์ไม่สม่ำเสมอนัก จึงทำให้เสถียรภาพของค่าความแปรปรวนมีค่าค่อนข้างต่ำ ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการควบคุมปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้อาจไม่ดีเท่าที่ควร

จากรูปที่ 5.13 (ง) แสดงความเป็นอิสระของข้อมูล โดยพบว่า ตามลำดับการทดลองมีการกระจายตัวของข้อมูลไม่แน่นอน โดยมีลักษณะที่ไม่เป็นรูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าข้อมูลนั้นมีการสุ่มของข้อมูลที่ดี

5.3.4 การวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรต่อกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ

จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของแบบจำลองในหัวข้อ 5.3.2 ทำให้เราสามารถคาดหมายได้ว่า ลำดับของตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสที่ถูกห่อหุ้มในไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นองค์ประกอบ คือ ความเข้มข้นของไคโตซาน ความเข้มข้นของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส และความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากค่า p-value ของความเข้มข้นของไคโตซานมีค่าเพียง 0.1 เท่านั้น ในขณะที่ค่า p-value ของความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินมีค่าสูงถึง 0.383 และ 0.452 ตามลำดับ ซึ่งเป็นแนวทางสำคัญในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรแต่ละตัวที่จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของการทดลองนี้มีค่ามากที่สุด โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีการพื้นผิวผลตอบ (response surface methodology ,RSM) จากโปรแกรม minitab

5.3.4.1 อิทธิพลของความเข้มข้นของไคโตซานและอนุภาคนาโนเงิน

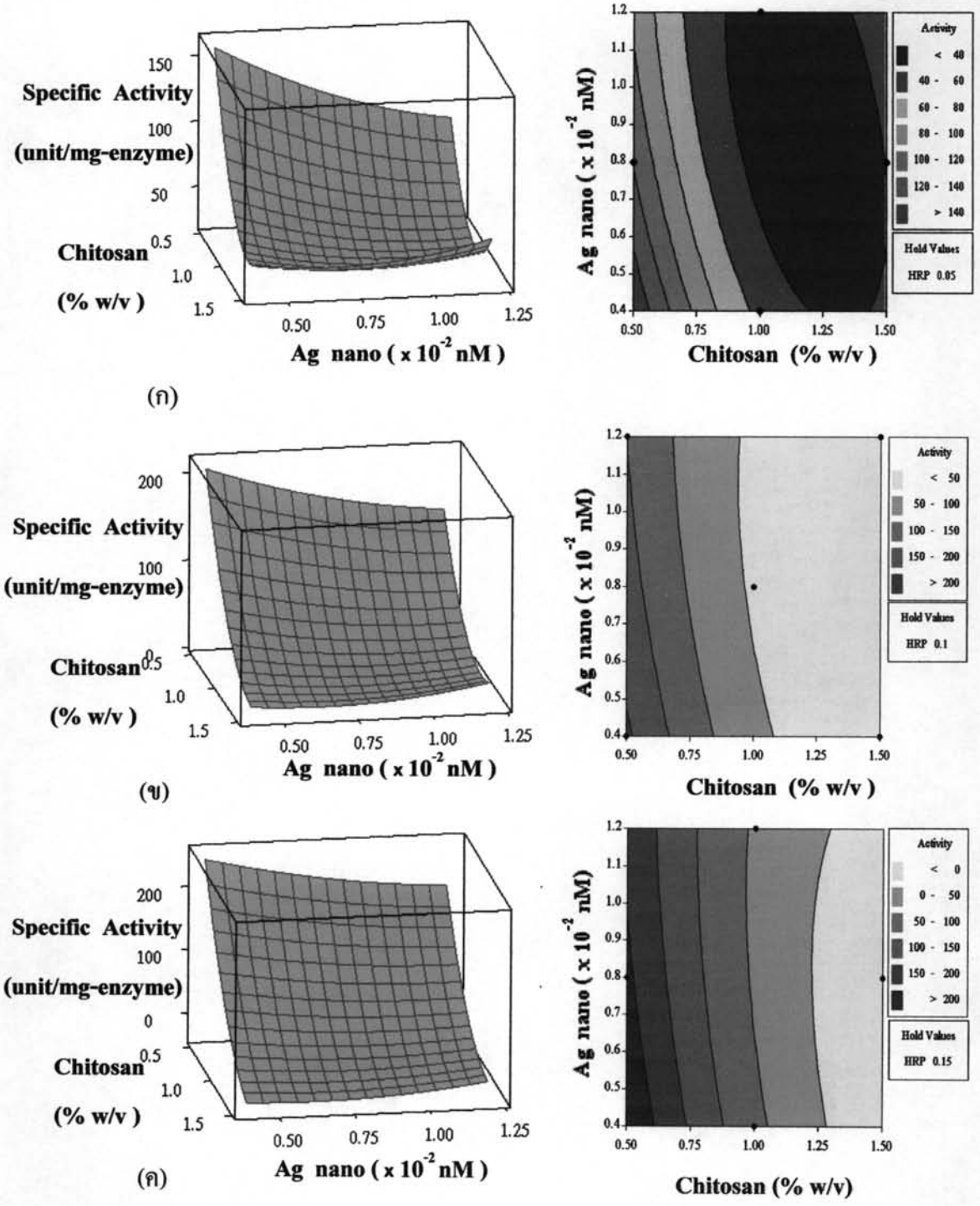
ในการทดลองตอนนี้จะศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของไคโตซานและอนุภาคนาโนเงินต่อกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะจากรูปที่ 5.14 (ก) (ข) และ(ค) ซึ่งเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ที่ 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะพบว่า ที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตรและความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน 0.4 $\times 10^{-2}$ นาโนโมล่าร์ จะให้กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมีค่าสูงในช่วงประมาณ 100 - 140 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ โดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงสุด 140 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานเป็น 1.0 % และ 1.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร จะพบว่า กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมีค่าลดลงเหลือประมาณ 60 - 40 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะลดลงประมาณ 70 -95 % ในช่วงค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ศึกษา จึงแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของไคโตซานมีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์สูง ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นสูงนั้นจะมีความหนืดมาก ซึ่งจะส่งผล

ให้อัตราการถ่ายเทมวลสารมีค่าลดลงจนอาจเป็นขั้นตอนกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยา นอกไปจากนี้ยังอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยไคโตซานความเข้มข้นสูงอาจมีโครงสร้างสามมิติที่ไม่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา จึงทำให้เราพบว่าอัตราการเร่งปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์นั้นมีค่าลดลง ซึ่งจะสังเกตได้ว่าที่ไคโตซานความเข้มข้นต่ำจะให้กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะที่มีค่าสูงอย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวกันกับในงานวิจัยของ Delanoy และคณะ(2005) ซึ่งเป็นการศึกษาการตรึงเอนไซม์แลคเคสด้วยพันธะโควาเลนต์ในไคโตซานที่มีคอปเปอร์ไอออน(Cu^{2+})เป็นองค์ประกอบ โดยพบว่า เมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้นจากเดิม 10 เท่า จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงจากเดิม 60 % และที่ความเข้มข้นของไคโตซานเดียวกัน เมื่อความเข้มข้นของคอปเปอร์ไอออนเพิ่มขึ้น จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยหรือคงที่ จึงแสดงให้ให้เห็นว่าอิทธิพลของความเข้มข้นของไคโตซานมีอิทธิพลสูงกว่าอิทธิพลของความเข้มข้นคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) ดังนั้น ในการเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้ได้กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงที่สุดนั้นควรทำการทดลองที่ความเข้มข้นของไคโตซานที่ระดับต่ำ คือ 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินจากรูปที่ 5.14 (ก) (ข) และ (ค) พบว่า ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน 0.4 $\times 10^{-2}$ นาโนโมล่าร์จะมีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตรและที่ทุกความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยมีค่าสูงประมาณ 140 , 200 และ 230 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินขึ้นเป็น 0.8 $\times 10^{-2}$ และ 1.2 $\times 10^{-2}$ นาโนโมล่าร์ พบว่า กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมีค่าลดลงอยู่ในช่วงประมาณ 120-80 , 150-100 และ 200-150 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ โดยที่ลดลงจากเดิมถึง 42 % , 25 % และ 14 % ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคนาโนเงินที่ความเข้มข้นสูงนั้นจะมีความหนาแน่นของอนุภาคมาก จึงทำให้อัตราการถ่ายเทมวลสารมีค่าลดลงส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมีค่าลดลงตามไปด้วย อีกทั้งเมื่อพิจารณาการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินที่ค่าความเข้มข้นของไคโตซานสูงแล้ว จะพบว่า กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อยหรือคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากไคโตซานที่มีความเข้มข้นสูงนั้นจะมีอัตราการถ่ายเทมวลสารที่ไม่ดีอยู่แล้ว จึงทำให้ไม่เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะที่เกิดจากความหนาแน่นของอนุภาคนาโนเงินที่เพิ่มขึ้นเท่าใดนัก ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินมีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะน้อยกว่าอิทธิพลของความเข้มข้นของไคโตซาน

จากผลการทดลองข้างต้นเป็นที่น่าสังเกตว่า กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะที่สภาวะเดียวกันนี้มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เราได้คาดหมายไว้ว่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะที่สภาวะเดียวกันควรจะมีค่าคงที่หรือลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อความเข้มข้นเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้น โดยสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะนี้ยังไม่ปรากฏเป็นที่แน่ชัด จึงจำเป็นที่ควรมี

การศึกษาค้นคว้าต่อไป ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร และที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน 0.4 $\times 10^{-2}$ นาโนโมล่าร์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์



รูปที่ 5.14 แสดง surface plot และ contour plot ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ที่ (ก) 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ข) 0.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ(ค) 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

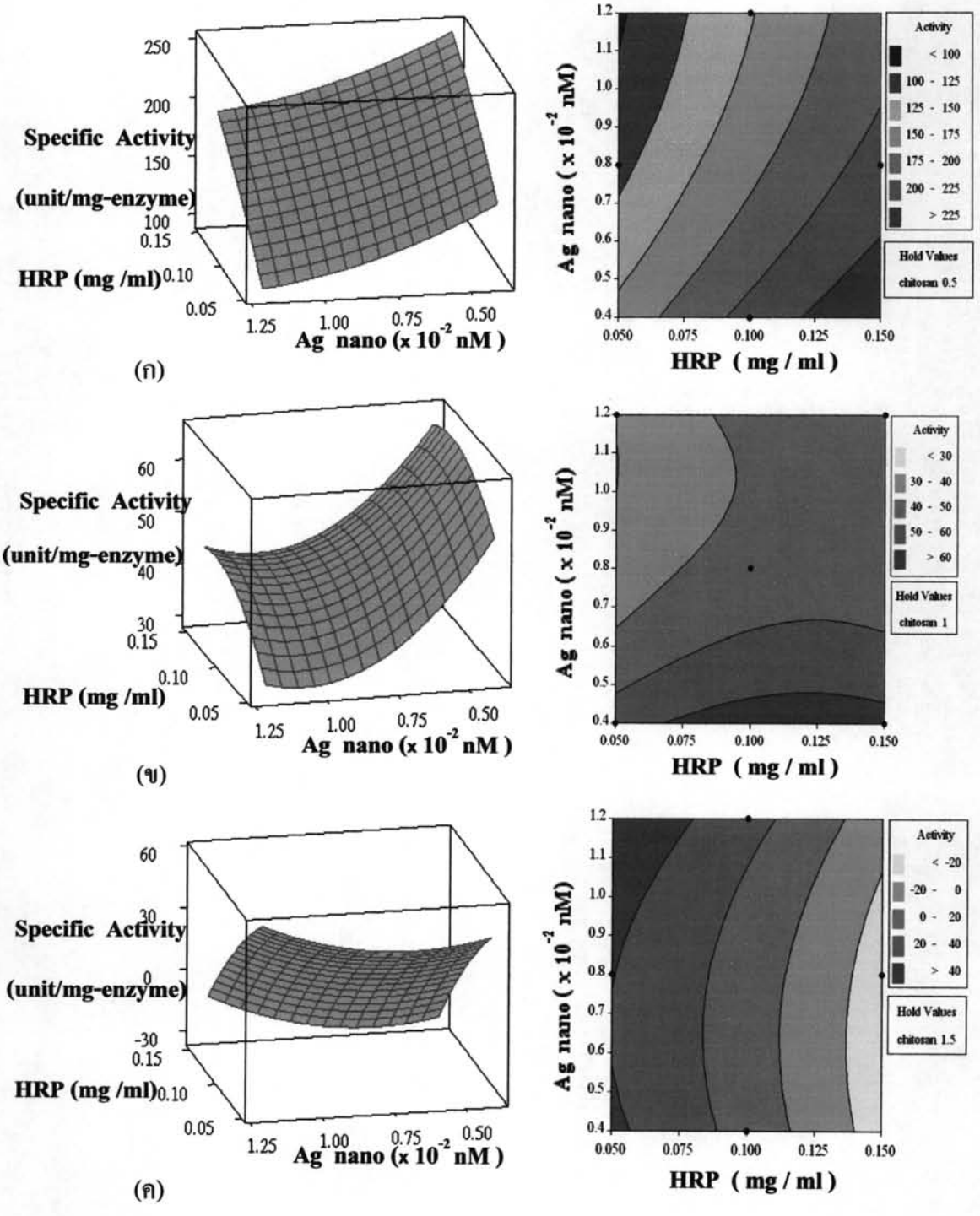
5.3.4.2 <u>อิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์และอนุภาคนาโนเงิน</u>

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์และอนุภาคนาโนเงินต่อกิจกรรมเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของไคโตซานต่างๆ ที่แสดงในรูปที่ 5.15 (ก) (ข) และ(ค) จะพบว่า ที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 225 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน 0.4×10^{-2} นาโนโมล่าร์ ทั้งนี้จะสังเกตได้ว่าเมื่อลดความเข้มข้นของเอนไซม์ลงจะพบว่า กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมีค่าลดลง 33% ที่ทุกค่าความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน พบว่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมีค่าลดลง 33 % ที่ทุกค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานขึ้นจะพบว่า กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมีค่าลดลงถึง 70- 95% ที่ทุกค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ดังแสดงใน รูปที่ 5.14 (ก)-(ค) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า อิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้น ของอนุภาคนาโนเงินนั้นมีอิทธิพลน้อยเหมือนกันทั้งสองตัวแปรเมื่อเปรียบเทียบกับตัวแปรของไคโตซาน

เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นของไคโตซานที่ 1.0 % น้ำหนัก/ปริมาตรดังรูปที่ 5.15 (ข) พบว่า กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงสุดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน 0.4×10^{-2} นาโนโมล่าร์ เช่นเดียวกันกับที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 60 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ในขณะที่เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 1.5 % น้ำหนัก/ปริมาตรจากรูปที่ 5.15 (ค) จะพบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงสุดนั้นเปลี่ยนแปลงไปเป็นที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน 1.2×10^{-2} นาโนโมล่าร์ โดยมีค่าเท่ากับ 40 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ทั้งนี้การที่สภาวะเหมาะสมมีการเปลี่ยนแปลงไปนั้นอาจมีสาเหตุมาจาก ความเข้มข้นของไคโตซานที่มีค่าสูงจะมีลักษณะของสารละลายที่หนืดมาก จึงทำให้อัตราการถ่ายเทมวลสารมีค่าลดลง ตามที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 5.4.3.1 และยังอาจทำให้เกิดการเบียดบังกันเองของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นสูงได้ส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะที่ได้มีค่าต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นจากรูปที่ 5.15 (ก) และ(ข) จึงทำให้สามารถสรุปได้ว่าที่สภาวะความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน 0.4×10^{-2} นาโนโมล่าร์เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์เพื่อให้ได้ค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุด

ทั้งนี้จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ และอนุภาคนาโนเงินจะมีอิทธิพลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมากขึ้นที่ระดับความเข้มข้นของไคโตซานน้อย โดยที่ความเข้มข้นของ

ไคโตซาน 1.5 % น้ำหนัก/ปริมาตรนั้นเราแทบจะไม่เห็นความแตกต่างของค่ากิจกรรมเอนไซม์ จำเพาะเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์และอนุภาคนาโนเงิน



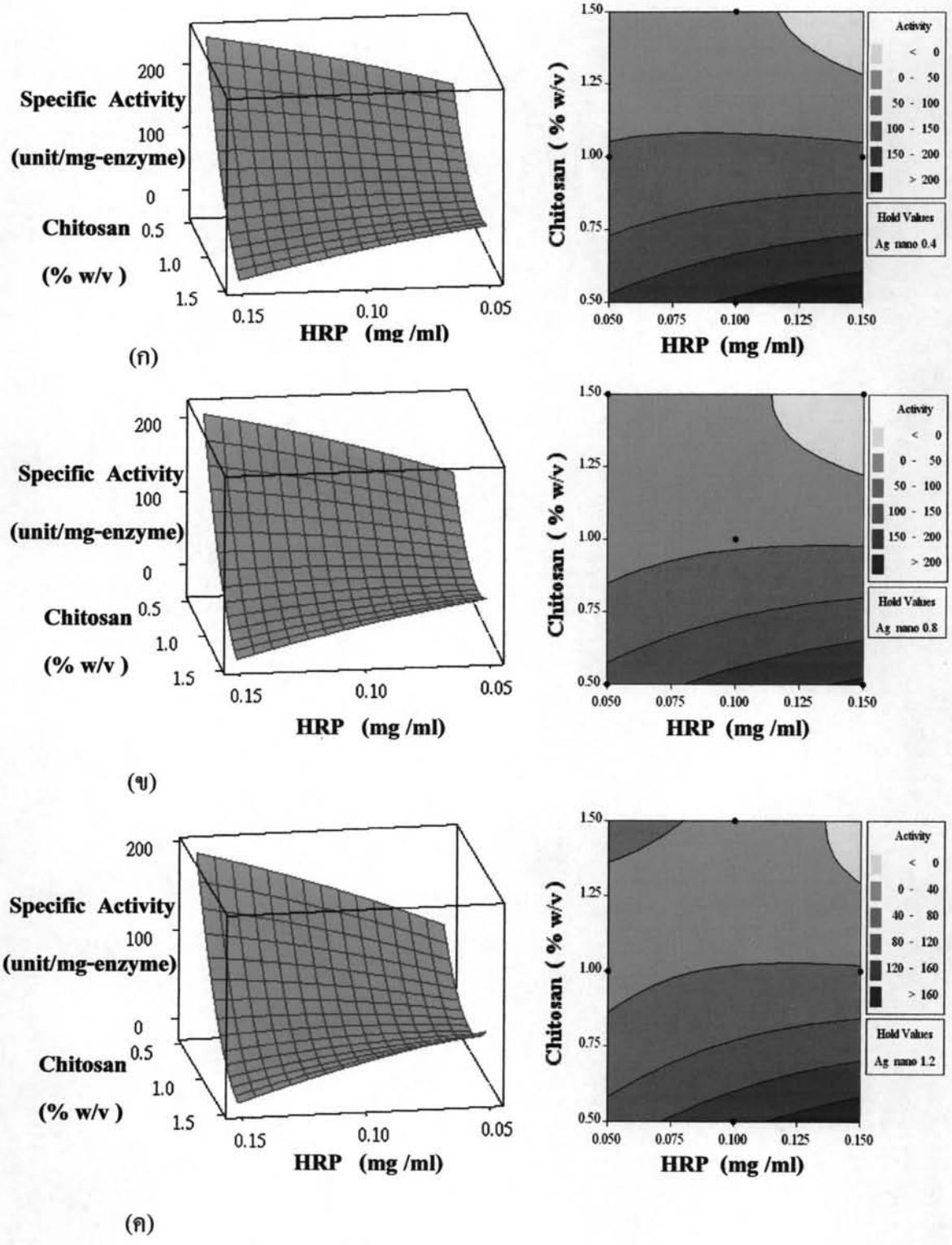
รูปที่ 5.15 แสดง surface plot และ contour plot ที่ความเข้มข้นของไคโตซานคงที่ที่ (ก) 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร (ข)1.0 % น้ำหนัก/ปริมาตร และ (ค)1.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร

5.3.4.3 <u>อิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์และไคโตซาน</u>

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของความเข้มข้นของไคโตซานและเอนไซม์ต่อกิจกรรมเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินต่างๆ ที่แสดงในรูปที่ 5.16 (ก) (ข) และ(ค) พบว่า ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน 0.4 $\times 10^{-2}$ นาโนโมล่าร์ จะให้กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงสุดประมาณ 230 ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร และความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน 0.8 $\times 10^{-2}$ และ1.2 $\times 10^{-2}$ นาโนโมล่าร์ จะพบว่ากราฟที่ได้มีลักษณะคล้ายคลึงกันโดยมีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงสุดที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตรและความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเช่นเดียวกันกับที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน 0.4 $\times 10^{-2}$ นาโนโมล่าร์

เป็นที่น่าสังเกตว่า ที่ทุกระดับความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานจาก 0.5 % ไปเป็น 1.0% น้ำหนัก/ปริมาตร พบว่า กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมีค่าลดลง 66 % และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานต่อไปจนมีค่าเท่ากับ 1.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร พบว่า กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อยหรือค่อนข้างคงที่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุสองประการ คือ ความหนืดของไคโตซานที่ทำให้อัตราการถ่ายเทมวลสารมีค่าลดลง และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ที่ถูกห่อหุ้มในไคโตซานนั้นไม่มีความเหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาตามที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 5.3.4.1 ในขณะที่เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จะพบว่า กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะมีค่าค่อนข้างคงที่หรือเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะนี้ไม่ได้เป็นไปตามความคาดหมายตามที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 5.3.4.1 ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ความเข้มข้นของไคโตซานมีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์มากกว่าความเข้มข้นของเอนไซม์

จากการหาค่าสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการพื้นผิวผลตอบนั้นทำให้เราสามารถสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน 0.4 $\times 10^{-2}$ นาโนโมล่าร์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในงานวิจัยนี้

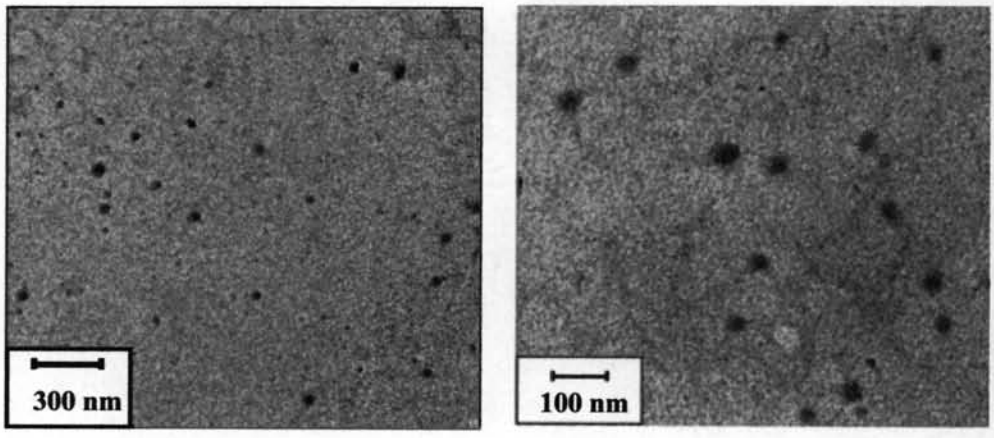


รูปที่ 5.16 surface plot และ contour plot ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินคงที่ที่

(ก) 0.4×10^{-2} นาโนโมล่าร์ (ข) 0.8×10^{-2} นาโนโมล่าร์ (ค) 1.2×10^{-2} นาโนโมล่าร์

5.4 ลักษณะของวัสดุประกอบแต่งที่สภาวะเหมาะสม

การทดลองนี้จะศึกษาลักษณะทางกายภาพของวัสดุประกอบแต่งที่สภาวะเหมาะสมที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 5.3 โดยการเตรียมวัสดุประกอบแต่งนี้ที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร และความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน 0.4 $\times 10^{-2}$ นาโนโมล่าร์ โดยที่ปราศจากเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสในแผ่นฟิล์มของไคโตซาน ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เป็นพวกสารอินทรีย์ซึ่งจะไม่คงทนต่อความร้อนที่เกิดขึ้นจากการทำงานของ TEM ซึ่งใช้ความเข้มแสงสูงในการส่องดูลักษณะภายในของวัสดุ จึงอาจจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ถูกสลายไปและไม่สามารถมองเห็นได้ จากนั้นจึงนำแผ่นฟิล์มของไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นองค์ประกอบไปส่องดูลักษณะรูปร่างและขนาดของอนุภาคนาโนเงิน และการกระจายตัวของอนุภาคนาโนเงินบนพื้นผิวภายในแผ่นฟิล์มไคโตซานด้วยการส่อง TEM



(ก) (ข)

รูปที่ 5.17 แสดงภาพ TEM ของอนุภาคนาโนเงินที่ความเข้มข้น 0.4 $\times 10^{-2}$ นาโนโมล่าร์ ในไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร ที่กำลังขยาย (ก) 8000 เท่า และ(ข) 20000 เท่า

เมื่อพิจารณารูปที่ 5.17 (ก) จะพบว่า รูปร่างของอนุภาคนาโนเงินมีลักษณะคล้ายรูปทรงกลม และมีการกระจายตัวของอนุภาคนาโนเงินเป็นอนุภาคเดี่ยวๆ ค่อนข้างสม่ำเสมอในไคโตซาน ทั้งนี้จะสังเกตเห็นได้ว่าจำนวนของอนุภาคนาโนเงินที่กระจายอยู่ภายในฟิล์มนั้นมีปริมาณที่ไม่หนาแน่นจนเกินไปจึงอาจจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ที่สภาวะนี้มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด โดยจะพบว่า ขนาดของอนุภาคนาโนเงินมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 37 นาโนเมตรจากอนุภาคนาโนเงินทั้งหมดที่ปรากฏดังในรูปที่ 5.17 (ข) ซึ่งจะเห็นได้ว่าลักษณะรูปร่างและขนาดของอนุภาคที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับในงานวิจัยของ Yakutik และShevchenlo (2004) ซึ่งมีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินด้วยวิธีการรีเวิสไมเซลล์ พบว่า เมื่อความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรตมีค่าเป็น 0.001 โมล่าร์

อนุภาคนาโนเงินที่ได้จะมีลักษณะรูปร่างคล้ายทรงกลมที่มีขนาดตั้งแต่ 30 นาโนเมตรขึ้นไปแต่ไม่เกิน 220 นาโนเมตร

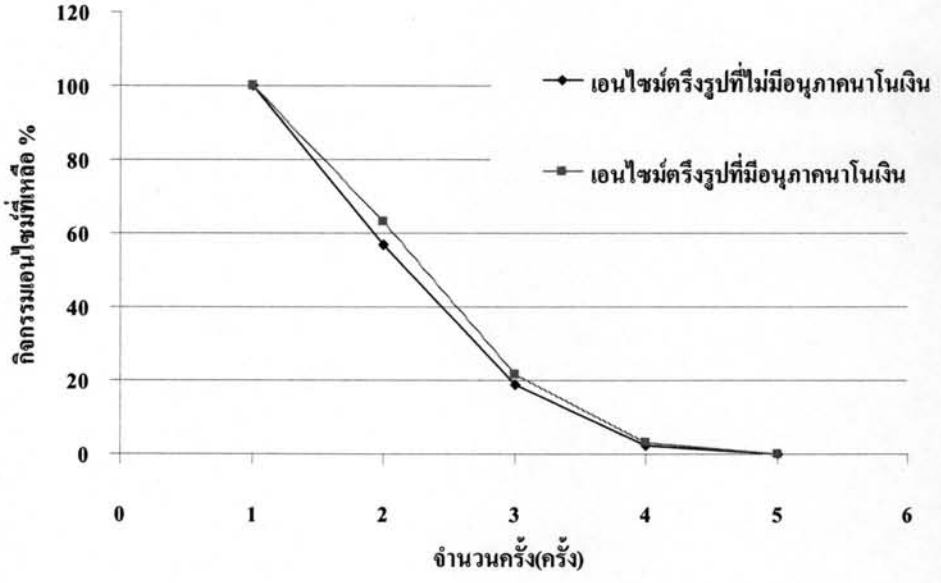
5.5 เสถียรภาพของเอนไซม์ในวัสดุประกอบแต่งที่สภาวะเหมาะสม

5.5.1 เสถียรภาพการนำกลับมาใช้ใหม่ของเอนไซม์

การทดลองนี้จะเป็นการศึกษาเสถียรภาพการนำกลับมาใช้ใหม่ของเอนไซม์ในวัสดุตรึงที่สภาวะเหมาะสมที่ได้แสดงไว้ในหัวข้อ 5.4 โดยทำการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสด้วยวิธีการห่อหุ้มที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงในสารละลายไคโตซาน 0.5 % น้ำหนัก/ปริมาตรที่มีอนุภาคนาโนเงิน 0.4×10^{-2} นาโนโมล่าร์เป็นองค์ประกอบ แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ต่อมานำเอนไซม์ตรึงรูปบนแผ่นฟิล์มไคโตซานที่ได้นี้ซึ่งมีความหนา 0.198 มิลลิเมตร มาตัดแบ่งให้มีขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร^2 แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ (ดูหัวข้อ 4.2.3) ที่ความเข้มข้นของไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.5 โมล่าร์ หลังจากนั้นนำเอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้ทดสอบการเร่งปฏิกิริยาในครั้งแรกมาทำการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาซ้ำต่อไปอีกจนกว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรที่ได้จากการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าต่ำกว่า 0.1 จึงหยุดการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่นั้นจะเปรียบเทียบจากค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปของการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาในครั้งแรก

จากรูปที่ 5.18 พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะจากทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปทั้งที่มีอนุภาคนาโนเงินและไม่มีอนุภาคนาโนเงินในครั้งที่ 2 จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดอย่างรวดเร็ว โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เหลือเพียง 63.09 % และ 57.03 % จากเริ่มต้น ตามลำดับ และเมื่อทดสอบการนำกลับมาใช้ใหม่เป็นครั้งที่ 3 จะพบว่า กิจกรรมเอนไซม์ที่เหลือของเอนไซม์ทั้งสองกรณีนี้มีค่าลดลงอีกประมาณเท่าตัว โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่เพียง 21.38 % และ 18.68 % จากเริ่มต้น ตามลำดับ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าหลังจากการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ในครั้งที่ 3 เป็นต้นไปนั้น จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเกือบหมดทั้งสองกรณี และเมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ของทั้งกรณีที่มีอนุภาคนาโนเงิน และไม่มีอนุภาคนาโนเงิน จะพบว่ามีค่าลดลงใกล้เคียงกันมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเสถียรภาพการนำกลับมาใช้ใหม่ของเอนไซม์ตรึงรูปทั้งที่มีอนุภาคนาโนเงินและไม่มีอนุภาคนาโนเงินนั้นมีค่าต่ำมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเบียดบังกันเองระหว่างเอนไซม์ที่ถูกห่อหุ้มกับผลิตภัณฑ์ที่ถูกดูดซับไว้เป็นปริมาณมากในฟิล์มไคโตซานจึงอาจทำให้เอนไซม์มีโครงสร้างสามมิติไม่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา จึงส่งผลให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์มีค่าลดลง ดังนั้นจึงทำให้สรุปได้ว่า เสถียรภาพการนำกลับมาใช้ใหม่

ของเอนไซม์ที่สภาวะเหมาะสมมีเสถียรภาพที่ต่ำมาก จึงควรต้องมีการปรับปรุงและศึกษาค้นคว้าต่อไปเพื่อให้สามารถนำกลับมาใช้งานได้อย่างมีเสถียรภาพ



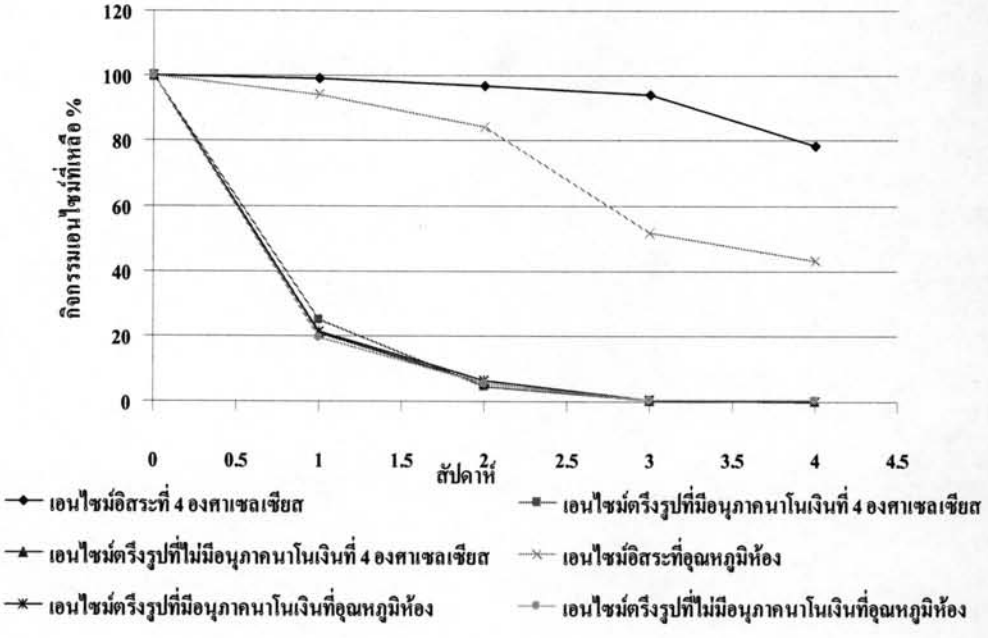
รูปที่ 5.18 แสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ของเอนไซม์ตรึงรูปที่มีอนุภาคนาโนเงินและไม่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นองค์ประกอบ หลังจากใช้ทดสอบการเร่งปฏิกิริยาในแต่ละครั้ง สภาวะในการทดลอง : ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6

5.5.2 <u>เสถียรภาพการเก็บรักษาของเอนไซม์</u>

ในการทดลองนี้เป็นการศึกษาเสถียรภาพการเก็บรักษาของวัสดุตรึงเอนไซม์ที่สภาวะเหมาะสม โดยการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปตามหัวข้อที่ 5.5.1 แล้วเก็บรักษาเอนไซม์ตรึงรูปในแผ่นฟิล์มไคโตซานทั้งที่มีอนุภาคนาโนเงินและไม่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นองค์ประกอบ และเอนไซม์อิสระไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้ในกรณีเอนไซม์อิสระจะเก็บรักษาไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6 จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระที่เก็บรักษาไว้นั้นทุกๆสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 30 วัน โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่นั้นจะเปรียบเทียบจากค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปของการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาในสัปดาห์แรก

จากรูปที่ 5.19 พบว่า การเก็บรักษาของเอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมีเสถียรภาพสูงกว่าการเก็บรักษาของเอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งจะสังเกตเห็นได้ชัดเจนที่ 3 สัปดาห์แรกจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสลดลงเพียงเล็กน้อย โดย

มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลือ 94.29 % จากเริ่มต้น ในขณะที่เอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิห้องมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลือเพียง 51.50 % จากเริ่มต้น ทั้งนี้การเสื่อมสภาพของเอนไซม์อิสระนั้นอาจมีสาเหตุมาจากพีเอชที่ใช้ในการเก็บรักษาเอนไซม์อยู่ในช่วงที่พบว่า มีการลดลงของค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่จากเริ่มต้นประมาณหนึ่ง ดังที่แสดงในรูปที่ 5.20 ซึ่งจะพบว่า การเก็บรักษาเอนไซม์อิสระฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสไว้ที่พีเอช 6 จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ 95 % จากเริ่มต้น เมื่อมีการเก็บรักษาไปได้เพียง 20 ชม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยพบว่าการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์มีความสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ลดลงอยู่ในแนวโน้มเดียวกัน

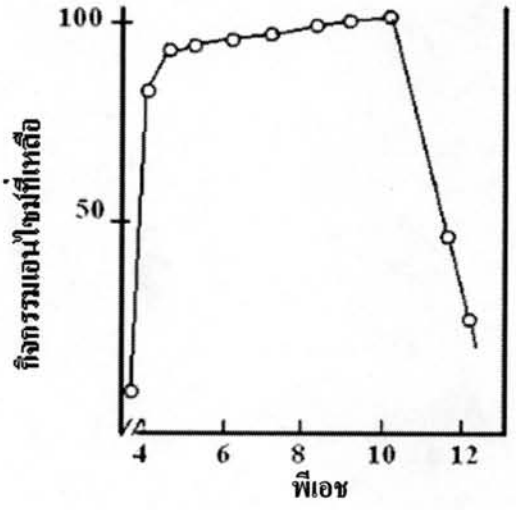


รูปที่ 5.19 แสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ของเอนไซม์ตรึงรูป และเอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้องในแต่ละสัปดาห์ สภาวะในการทดลอง : ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6

เมื่อพิจารณาที่การเก็บรักษาเอนไซม์ตรึงรูปที่ทั้ง 2 อุณหภูมิ จะพบว่า มีเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปที่ต่ำมาก โดยพบว่า ที่สัปดาห์แรกกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปทั้งที่มีอนุภาคนาโนเงินและไม่มีอนุภาคนาโนเงินจะมีค่าลดลงอย่างมาก โดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 24.73 % และ 20.66 % ตามลำดับ ที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงจากเดิมเหลือเพียง 21.25 % และ 19.62 % ตามลำดับ

ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเก็บเอนไซม์ตรึงรูปไว้ที่พีเอช 5 อาจจะทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ง่ายกว่าการเก็บเอนไซม์ที่พีเอชมีค่าสูงกว่า 10 ขึ้นไป ดังที่แสดงในรูปที่ 5.20 ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่าที่พีเอชต่ำกว่า 6 จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ต่ำกว่าที่ระดับ 90 % จากเริ่มต้น จึงเป็นเหตุผลสำคัญในการอธิบายการลดลงของค่ากิจกรรมเอนไซม์อย่างมากตั้งแต่สัปดาห์แรก ในงานวิจัยนี้ที่มีการเก็บรักษาเอนไซม์ตรึงรูปไว้ที่พีเอช 5 โดยต่อมาเมื่อพิจารณาในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 จะพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปทั้ง 2 กรณี และ 2 อุณหภูมินั้นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงจนเกือบหมด โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ประมาณ 0.20 % ถึง 0.37 % จากเริ่มต้น ซึ่งจะสังเกตได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ของเอนไซม์ตรึงรูปที่มีอนุภาคนาโนเงิน และไม่มีอนุภาคนาโนเงิน ที่ทั้งสองอุณหภูมิ จะพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันเท่าใดในแต่ละสัปดาห์

จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้สามารถสรุปได้ว่าเสถียรภาพการเก็บรักษาของเอนไซม์ตรึงรูปทั้งหมดในงานวิจัยนี้มีเสถียรภาพที่ต่ำมาก เนื่องการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ที่มีสาเหตุมาจากพีเอชที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา จึงทำให้ไม่สามารถคงค่ากิจกรรมเอนไซม์ให้มีค่าอยู่ในระดับเดิมหรือลดลงเพียงเล็กน้อยได้ ซึ่งจำเป็นต้องมีการปรับปรุงและศึกษาค้นคว้าต่อไปเพื่อให้สามารถเก็บรักษาได้อย่างมีเสถียรภาพ



รูปที่ 5.20 แสดงเสถียรภาพการเก็บรักษาเอนไซม์อิสระฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสที่พีเอชต่างๆ (50 ยูนิต/มิลลิลิตร) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ที่มา : หนังสือ ENZYMES Diagnostic Reagent Grade)