บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมแกลบสำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์

3.1.1 การเตรียมแกลบด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)

ต้มแกลบร่วมกับกรดไฮโดรคลอริกที่ สัดส่วนระหว่างกรดต่อน้ำเป็น 1:4, 1:5 และ 1:6 โดยนำแกลบมาล้างด้วยน้ำประปาจนสะอาด เพื่อขจัดสิ่งสกปรกออกจากแกลบ นำแกลบที่ล้างแล้วไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100°ซ ข้ามคืน ใส่แกลบที่อบแห้ง 500 กรัม ลงไปในขวดแก้วทรงกลมขนาด 10 ลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาณ 5 ลิตร ลงในขวดแก้วรูปทรงกลม ให้สัดส่วนระหว่างแกลบกับกรดเป็น 100 กรัมต่อลิตร ทำการต้มโดยนำขวดแก้วนี้ไปตั้งบนเตาให้ความร้อน (mantle heat) แล้วเสียบชุดควบแน่น (condensor) ที่ปากขวดดังรูปที่ 9 โดยหล่อเย็นเพื่อให้ไอของกรดที่ระเหย ขึ้นมาจับควบแน่นเป็นของเหลวลงไปในขวดแก้ว ต้มแกลบที่ 100°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วล้างด้วยน้ำประปา จนน้ำที่ล้างออกมี pH 6.5-7.0 จากนั้นนำแกลบไปอบที่อุณหภูมิ 100°ซ ข้ามคืน

3.1.2 การเตรียมแกลบด้วยวิธีอื่น ๆ

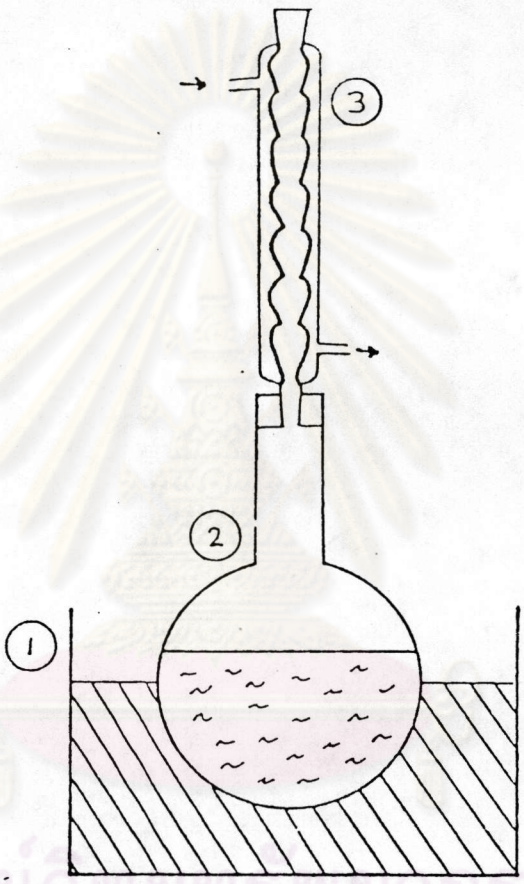
3.1.2.1 การเตรียมแกลบด้วยการต้ม

นำแกลบที่ผ่านการล้างจนสะอาดและผ่านการอบแห้งแล้ว มาต้มให้เดือดเวลา 3 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง ทิ้งไว้จนเย็นแล้วล้างด้วยน้ำประปาอีกครั้ง จากนั้นนำไปอบที่ 100°ซ ข้ามคืน

3.1.2.2 การเตรียมแกลบด้วยการนึ่งด้วยไอน้ำภายใต้ความดัน

นำแกลบที่ผ่านการล้างจนสะอาดและผ่านการอบแห้งแล้ว ไปนึ่งด้วยไอน้ำภายใต้ความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว เป็นเวลา 30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง นำไปอบแห้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 100°ซ

3.1.2.3 การเตรียมแกลบด้วยเฮกเซน (hexane) ร่วมกับการนึ่งด้วยไอน้ำภายใต้ความดัน



รูปที่ 9. การปรับสภาพแกลบด้วยกรด

1: mantle heat

2: bulk flask

3: reflux condendsor

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมวิธีนี้ทำโดยการใช้เฮกเซนสลับก่อนหลังกับการนึ่งด้วยไอน้ำคือ

- นำแกลบสะอาดที่ผ่านการเตรียมตามวิธีในข้อ 3.1.2.2 มาแช่ในเฮกเซนที่อัตราส่วนแกลบต่อเฮกเซน 20 กรัมต่อ 200 มล. พร้อมกันกวนเป็นครั้งคราว 1 ชั่วโมง แล้วนำไปอบเพื่อไล่เฮกเซนออกที่ 70°ซ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (10, 15, 20, 25 และ 30 นาที.

- ในลักษณะตรงข้ามนำแกลบสะอาดที่ผ่านการล้างและอบแห้งมาปรับสภาพโดยเฮกเซนตามวิธีข้างต้นภายหลังการระเหยเฮกเซนที่เหลือออกแล้วนำไปนึ่งไอน้ำภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 2 ชั่วโมง แล้วอบให้แห้งที่ 100°ซ. ข้ามคืน

3.2 การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

3.2.1 การหาแอคติวิตีของเซลลูเลสรวมตามวิธีของ Wood และ McCrae (1978)

เติม 0.4 มล. ของสารละลายสับสเตรท (สารละลาย 5% ของ α-cellulose ใน 0.05 M ซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.8) ลงในหลอดทดลองที่มี 1.4 มล. ของ 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.8 เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วเติม 0.2 มล. ของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้นที่กำหนดลงไป เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มต่อที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชม. หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นแล้ว ปั่นแยกตะกอน ที่3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในข้อ 3.2.6

[กำหนดให้ 1 หน่วยของเซลลูเลสรวมเป็นปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์จากเซลลูโลสเทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมงภายใต้สภาวะที่ทดลอง]

3.2.2 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (FPase) โดยวิธีของ Mandels และ Reese (1976)

นำสารละลายเซลลูเลสที่ต้องการทดสอบ 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.8 จำนวน 1 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองขนาด 18 มิลลิลิตร ใส่แผ่นกระดาษกรองขนาด 1x6 ซม. กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 1x6 ซม. เติม 0.5 มล. ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 ซึ่งหนักประมาณ 50 มิลลิกรัม

แล้วนำไปเขย่าโดยเครื่องปั่นหมุน (vortex mixer) จากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายไดไนโตรซาลิซัยลิกลงไป 3 มิลลิลิตร นำไปต้มเดือดเป็นเวลานาน 5 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร วัดค่าการดูด กลืนแสงโดยใช้เครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบการดูดกลืนแสงกับหลอดที่ใส่น้ำกลั่นแทนเอนไซม์ แล้วหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

[กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์คือจำนวนไมโครโมลกลูโคสที่ปลดปล่อยออกจากสับสเตรทภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดลองเกิดขึ้นต่อนาที]

3.2.3 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของ exoglucanase (C_1) โดยวิธีของ Wood (1979)

บ่ม 1.0 มล. ของสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 1% avicel และ 0.25% aerosil 200 ใน 0.05 M ซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.8 ที่ 40°ซ. 5 นาที แล้วเติม 0.5 มล. ของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้นที่ต้องการลงไป เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มต่อที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นทำการปั่นแยกตะกอน 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในข้อ 3.2.7

[กำหนดให้ 1 หน่วยของ C_1 คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย avicel แล้วปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง]

3.2.4 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของ endoglucanase (C_x) โดยวิธี Ryu และ Mandel (1980)

บ่ม 1.0 มล. ของสารละลายสับสเตรทสารละลาย 1% คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) ใน 0.05 M ซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.8 ที่ 40 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วเติม 0.5 มล.ของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้นที่ต้องการ เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มต่อที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็น ปั่นแยกตะกอนที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หา ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในข้อ 3.2.7

[กำหนดให้ 1 หน่วยของ C_x คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย CMC ปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง]

3.2.5 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของ B-glucosidase (cellobiase) โดยใช้วิธี Ryu และ Mandel (1980)

บ่ม 1.0 มล. ของสารละลายสับสเตรทสารละลาย 1% ซาลิซินใน 0.05 M ซิเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 ที่ 40 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเติม 0.5 มล. ของสารละลายเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสที่ความเข้มข้นที่ต้องการเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยา โดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็น วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีใน ข้อ 3.7

[กำหนดให้ 1 หน่วยของเบตา-กลูโคสิเดส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายซาลิซินแล้วปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายใต้สภาวะที่ทดลอง]

3.2.6 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi (1952) Nelson (1944)

เติมสารละลาย alkaline copper reagent (ภาคผนวก ข) 1 มล. ลงในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ 1 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที แล้วทำให้เย็นลง แล้วเติมสารละลาย Nelson reagent (ภาคผนวก ข) จำนวน 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เติมน้ำขจัดไอออน 5 มล. ลงไป ผสมให้เข้ากันนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm. หาค่าน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ที่สร้างขึ้นจากน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมล.

3.2.7 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNSA (Bernfeld, 1955)

ผสม 1.0 มล. ของสารละลายที่จะวิเคราะห์ร่วมกับ 1.0 มล. ของสารละลาย DNSA (ภาคผนวก ข) เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลานาน 10 นาทีแล้วทำให้เย็นลง เติมน้ำขจัดอิออนปลอดประจุ 10 มล. ลงไปแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm. หาค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมล.

3.2.8 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry (1951)

ใช้ 1.0 มล. ของสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ เติมด้วยสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข) จำนวน 5.0 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วเติมสารละลายผสม Lowry D (ภาคผนวก ข) 0.5 มล. ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm. เปรียบเทียบหาค่าของโปรตีนโดยกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจาก bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล.

3.3 การศึกษาการย่อยแกลบด้วยเอนไซม์

3.3.1 การทดลองย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรด ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ทางการค้าบริษัท NOVO.

ชั่งแกลบที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริกปริมาณ 4.5 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เติมน้ำขจัดอิออน (deionized water) 50 มล. ลงไปปรับ pH ในช่วง 4.5-4.8 เติมเอนไซม์เซลลูเลส 32 หน่วย เขย่าบนเครื่องเขย่าชนิดโรตารี อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างโดยดูดส่วนน้ำในระบบการย่อยแกลบ มาปั่นด้วยเครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะที่ 5,000 รอบ/นาที 5 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ และน้ำตาลรีดิวซ์

3.3.2 การหาความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะที่ไม่มีแกลบ

เติมน้ำขจัดอิออนขจัดประจุ (deionized water) 50 มล. ใส่ลงในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 4.5-4.8 เติมเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี ด้วยความเร็วรอบ 180-200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน ตรวจหาค่าเอนไซม์แอคติวิตี และน้ำตาลรีดิวซ์จากส่วนน้ำใสในแต่ละวัน

3.3.3 การศึกษาอิทธิพลของซิลิกาต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียมซิลิกาที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.001%, 0.01%, 0.1%, (w/v) ในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 เติมเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเป็นครั้งคราวเป็นเวลา 1ชม. ดูดส่วนที่เป็นน้ำไปปั่น 5,000 รอบ/นาที 5 นาที นำส่วนน้ำใสมาหาค่าแอคติวิตีเอนไซม์

3.3.4 การศึกษาผลการเติมสาร chelating agent ลงในระบบการย่อย

เตรียมระบบการย่อยแกลบ 2 ระบบ โดยใช้แกลบที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริก ปริมาณ 4.5 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วรูปทรงกรวยขนาด 250 มล. เติมน้ำบริสุทธิ์ดีออนประจุ (deionized water) 50 มล. ปรับ pH ในช่วง 4.5-4.8 เติมสาร chelating agent คือ ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA.) ปริมาณ 0.02 กรัม แล้วเติมเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย ส่วนอีกระบบควบคุมจะไม่เติม EDTA. เขย่าบนเครื่องเขย่าชนิดโรตารี ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างโดยดูดส่วนที่เป็นน้ำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะที่ 5,000 รอบ/นาที. เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์, น้ำตาลรีดิวซ์ และโปรตีน

3.3.5 การศึกษาผลของการเติมแมกนีเซียมอิออน (Mg^{++}) ในระบบการย่อยแกลบที่มีการเติม chelating agent

เตรียมระบบการย่อยแกลบ 2 ระบบที่แตกต่างกัน คือเป็นการย่อยแกลบที่เติมด้วย EDTA. อย่างเดียว และที่มีการเติมแมกนีเซียม อิออนเพิ่มหลังการเติม EDTA. โดย

เติมแกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด 4.5 กรัม ลงในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เติมน้ำบริสุทธิ์ดีออน 50 มล. ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 4.5-4.8 เติม EDTA. 0.2 กรัม ลงไปเขย่า แล้วจึงเติม 1.5 มล. สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 0.5% (w/v) ลงไป ได้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต เป็น 150 ppm. ส่วนระบบที่สองเป็นระบบควบคุมที่เตรียมเหมือนระบบที่หนึ่ง แต่ไม่เติมสารละลาย แมกนีเซียมซัลเฟตลงไป แล้วเติมเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย เขย่าบนเครื่องเขย่าชนิดโรตารี 180-200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างโดยดูดส่วนที่เป็นน้ำ นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ ด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

3.3.6 การตรวจการดูดซับ (adsorption) ของเอนไซม์กับแกลบ

ใส่แกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด 4.5 กรัม ลงในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. ตามด้วยน้ำบริสุทธิ์ดีออน 50 มล.แล้ว ปรับ pH ให้เป็น 4.5-4.8 จากนั้นเติมด้วย EDTA. 0.02 กรัม เขย่าให้ EDTA. ละลายแล้วเติมเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วยเขย่าบนเครื่องเขย่าชนิดโรตารีที่ 200 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง โดยดูดส่วนที่เป็นน้ำ นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะที่ 5,000 รอบ/นาที นำส่วนน้ำใสวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

3.3.7 การลดปฏิกริยาการดูดซับ (adsorption) ของเอนไซม์กับแกลบโดยใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactant) และการใช้การเขย่าใน sonication bath

ชั่งแกลบที่ผ่านการเตรียมด้วยกรด 4.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เติมน้ำขจัดอิออน 50 มล. ปรับ pH ในช่วง 4.5-4.8 เติม EDTA. 0.02 กรัม ลงไปแล้วเติม 0.2 มล. Tween 80 ที่ผ่านการทำให้เจือจางลง 10 เท่า ลงไป เติมเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย เขย่าสารผสมนี้บนเครื่องเขย่าแบบโรตารีที่ 180-200 รอบ/นาที ส่วนการทดลองที่ใช้การสั่นโดยใช้ sonication bath จะทำเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ไม่มีการเติม Tween 80 นำสารละลายที่ได้ไปสั่นใน sonication bath เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าชนิดโรตารี ที่ 180-200 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6 ชั่วโมง และ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน โดยดูดส่วนที่เป็นน้ำนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะที่ 5,000 รอบ/นาที 5 นาที แล้ววิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ในส่วนน้ำใส

3.3.8 ผลของ Tween 80 ต่อระบบการย่อยแกลบ

ชั่งแกลบที่ผ่านการเตรียมด้วยกรด 4.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปกรวย ขนาด 250 มล. เติมน้ำขจัดอิออน 50 มล. ปรับ pH ในช่วง 4.5-4.8 เติม EDTA. 0.02 กรัม เขย่าแล้วเติม 0.2 มล. Tween 80 ที่ทำให้เจือจางลง 10 เท่า แล้วเติมเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีที่ 180-200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยดูดส่วนที่เป็นน้ำปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะที่ 5,000 รอบ/นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ แอคติวิตีเอนไซม์, โปรตีน, น้ำตาลรีดิวซ์

3.3.9 การศึกษาผลการเพิ่มปริมาณน้ำ ต่อประสิทธิภาพในการย่อยแกลบ

เตรียมการทดลองย่อยแกลบที่มีปริมาณน้ำที่แตกต่างกัน 3 ระบบ คือ 50, 60 และ 70 มล. โดยชั่งแกลบที่ผ่านการเตรียมกรด 4.5 กรัมลงในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เติมน้ำขจัดอิออนในแต่ละขวดที่ต่างกันคือ 50, 60 และ 70 มล. ปรับ pH 4.5-4.8 เติม EDTA. 0.02 กรัม เขย่าให้ EDTA. ละลายแล้วเติม 0.2 มล. Tween 80 ที่เจือจาง 10 เท่า แล้วเติมเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย เครื่องเขย่าชนิดโรตารีที่ความเร็ว 180-200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยดูดส่วนที่เป็นน้ำนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที 5 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ น้ำตาลรีดิวซ์

3.3.10 การศึกษาปริมาณของ Tween 80 ต่อประสิทธิภาพในการย่อยแกลบของเอนไซม์

ชั่งแกลบที่ผ่านการเตรียมด้วยกรด 4.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เติมน้ำขจัดอิออน 50 มล. ลงไปปรับ pH ให้ได้ 4.5-4.8 เติม 0.02 กรัม EDTA. เขย่าแล้วเติม Tween 80 ที่เจือจางแล้ว 10 เท่า ในปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 0.8 และ 1.0 มล. โดยจะได้ปริมาณ Tween 80 เป็น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.15, 0.2และ 0.25%(v/v) ตามลำดับ เติมเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี ด้วยอัตราเร็ว 180-200 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 วัน เก็บตัวอย่างโดยดูดส่วนที่เป็นน้ำนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที 5 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ และน้ำตาลรีดิวซ์

3.3.11 การย่อยแกลบที่ผ่านการเตรียมโดยไม่ใช้กรด

ทดลองใช้แกลบที่ผ่านการเตรียมโดยไม่ใช้กรด คือ ผ่านการต้ม 3 ชม, 6 ชม. และแกลบที่ผ่านการอบไอน้ำ (autoclave) ที่เวลา 30 นาที, 1 ชม., 2 ชม. โดยชั่งแกลบแต่ละชนิด 4.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปกรวย เติมน้ำขจัดอิออน 50 มล. ลงไป ปรับ pH ให้ได้ 4.5-4.8 ใส่ EDTA. 0.02 กรัม. เขย่าให้ EDTA. ละลายดี เติม 0.2 มล. Tween 80 ที่เจือจาง 10 เท่า เติมเอนไซม์ลูเลส 42 หน่วย เขย่าบนเครื่องเขย่าชนิดโรตารีที่ 180-200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยดูดส่วนที่เป็นน้ำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที 5 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์หา แอคติวิตีของเอนไซม์, น้ำตาลรีดิวซ์.

3.3.12 การย่อยแกลบที่เตรียมโดยไม่ใช้กรดโดยใช้ซิเตรทบัฟเฟอร์แทนน้ำ

ทำการทดลองเหมือนหัวข้อ 3.3.11 แต่ในระบบการย่อยแกลบใช้ซิเตรทบัฟเฟอร์แทนน้ำขจัดอิออน โดยใช้ซิเตรทบัฟเฟอร์ 2 ชนิด เปรียบเทียบกันคือ ซิเตรทบัฟเฟอร์ปกติ และซิเตรทบัฟเฟอร์ดัดแปลงซึ่งเตรียมโดยใช้แอมโมเนียมซิเตรทแทนโซเดียมซิเตรทของซิเตรทบัฟ-เฟอร์ปกติ แล้วทำการย่อยในสภาวะเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3.11

3.3.13 การปริมาณของเอนไซม์ในการย่อยแกลบ

ชั่งแกลบที่ผ่านการเตรียมโดยใช้กรด 4.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปกรวย ขนาด 250 มล. เติมน้ำขจัดอิออน 50 มล. ลงไปปรับ pH ให้ได้ 4.5-4.8 เติม EDTA. 0.02 กรัม เขย่าให้ EDTA ละลายให้ดีแล้วเติม 0.2 มล. Tween 80 มล. ที่เจือจาง 10 เท่า เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมเอนไซม์ที่ปริมาณต่าง ๆ คือ 32, 42 , 52.5, 63, 73.5, 84,

100 และ 105 หน่วย แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าชนิดโรตารี ด้วยอัตราเร็ว 180-200 รอบ/นาที. เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน โดยดูดส่วนที่เป็นน้ำใส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ด้วยเครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะที่ 5,000 รอบ/นาที 5 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์หา แอคติวิตีของเอนไซม์, น้ำตาลรีดิวซ์.

3.3.14 การย่อยแกลบที่เตรียมโดยการใช้เฮกเซน ร่วมกับการ autoclave

ชั่งแกลบได้จากการเตรียมจากการ autoclave และการแช่ใน hexane โดยแบ่งเป็น 2 ระบบ คือ การเตรียมตามวิธีในข้อ 3.1 ใช้ autoclave ที่ 121°ซ. 2 ชม. แล้วนำมาแช่ด้วย hexane 1 ชม. กับอีกชนิด นำแกลบแช่ใน hexane 1 ชม. แล้วนำไป autoclave ที่ 121°ซ 2 ชม. ชั่งแกลบทั้ง 2 ชนิด 4.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูป กรวยขนาด 250 มล. เติมน้ำขจัดอิออน 50 มล. ลงไป ปรับ pH ให้ได้ 4.5-4.8 เติม EDTA. 0.02 กรัม เขย่าให้ EDTA. ละลายให้ดีแล้วเติม 0.2 มล. tween 80 ที่เจือจาง 10 เท่า เติมเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี ความเร็ว 180-200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันโดยดูดส่วนที่เป็นน้ำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที 5 นาที นำส่วนน้ำใสวิเคราะห์ หาแอคติวิตีของเอนไซม์, น้ำตาลรีดิวซ์ เช่นเดียวกันทำการทดลองควบคุม โดยใช้แกลบที่ผ่านการเตรียมโดยการใช้ autoclave ที่ 121°ซ 2 ชม. เพียงอย่างเดียว ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ ในสภาวะที่เหมือนกันเป็นตัวควบคุม

3.4 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก Trichoderma reesei TISTR 3081

เตรียมชิ้นราสำหรับทำเป็นกล้าเชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (พรเทพ, 2538) โดยเลี้ยงรา Trichoderma reesei TISTR 3081 บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) อายุได้ 7-9 วัน จนเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ ใช้เป็นกล้าเชื้อ (seed culture) โดยใช้ cork borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 ซม. เจาะเส้นใยของราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA. บริเวณขอบ ๆ ของโคโลนี สำหรับใช้ผลิตเอนไซม์ เตรียมอาหารสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Mendel และ Weber, 1969) ตามสูตรภาคผนวก ก โดยใช้ เอวิเซล (avicel) ปริมาณ 2% (w/v) แบ่งอาหาร 100 มล. ใส่ขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำชิ้นราจำนวน 5 ชิ้น ไปใส่ในขวดแก้วรูปกรวยที่มี 100 มล. อาหารสำหรับผลิตเอนไซม์เซลลูเลส นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าชนิดโรตารี ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน, โดยดูดส่วนที่เป็นน้ำ 5 มล. ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์หา แอคติวิตีของเอนไซม์, โปรตีน และ pH

3.5 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก Trichoderma reesei TISTR 3081

3.5.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการย่อยแกลบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T. reesei

ทำการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T. reesei ปริมาณ 42 หน่วย ในระบบการย่อยแกลบ 50 มล. ซึ่งประกอบด้วย 4.5 กรัม แกลบ 0.02 กรัม 0.2 มล. ทวีน 80 ที่เจือจาง 10 เท่า ปรับ pH ช่วง 4.5-4.8 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30°ซ. (อุณหภูมิห้อง), 40°ซ. และ 50°ซ. เป็นเวลา 24 ชม. นำส่วนน้ำใสไปหาค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากการย่อยแกลบ

3.5.2 อิทธิพลของ pH ต่อประสิทธิภาพการย่อยแกลบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นจาก T. reesei

ทำการย่อยแกลบที่เหมือนกับการทดลองหัวข้อ 3.5.1 แต่ใช้อุณหภูมิของการย่อยที่ 30°ซ. แปรผันค่า pH ของการย่อยแกลบที่ต่าง ๆ กัน คือ 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 และ 5.2 ทำการย่อยเป็นเวลา 24 ชม. แล้วนำส่วนใสไปหาน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากการย่อยแกลบ

3.6 การย่อยแกลบโดยการใช้เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นเองเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า celluclast 1.5 L

ชั่งแกลบที่ผ่านการเตรียมด้วยกรด 4.5 กรัม ใส่ขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เติมน้ำบัฟเฟอร์ซิเตรทฟอสเฟต พีเอช 4.8 ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 50 มล. เติม EDTA. 0.02 กรัม เขย่าให้ EDTA. ละลายให้ดี แล้วเติม Tween 80 ที่เจือจาง 10 เท่า เขย่าให้เข้ากันแล้วเติม 0.8 มล. เซลลูคลาสต์ 1.5 ทำให้เจือจาง 10 เท่าด้วยซิเตรทบัฟเฟอร์ ซึ่งวัดปริมาณแอคติวิตีเอนไซม์เท่ากับ 42 หน่วย เปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นเองโดยคำนวณให้ได้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากัน โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 9 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าชนิดโรตารีที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน โดยดูดส่วนที่เป็นน้ำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์หา แอคติวิตีของเอนไซม์,น้ำตาลซีดิวซ์เปรียบเทียบกัน

3.7 การย่อยแกลบปรับสภาพด้วยเซลลูเลสสำหรับผลิตซิลิกา

นำแกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วย การต้ม 3 ชม., การอบด้วยไอน้ำภายใต้ความดัน, แกลบที่ต้มด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น (กรด:น้ำ) 1:4, 1:5 และ 1:6 เปรียบเทียบกับแกลบดิบที่ไม่ผ่านกระบวนการ

ใส่แกลบที่ผ่านกระบวนการต่างๆ 72 กรัม น้ำชจัดอิออน 400 ml. EDTA. 0.02% (W/V) Tween 80 0.04% (W/V) ปรับ pHให้ได้ 4.5-4.8 เติมเอนไซม์เซลลูคลาสต์ 1.5 L ปริมาณ 672 หน่วย นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าชนิดโรตารีที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 วัน นำแกลบที่ย่อยด้วยเอนไซม์แล้วไปล้างด้วย น้ำจนสะอาด นำไปอบข้ามคืนที่ 100° ซ จนแห้งดี แล้วเก็บไว้เข้าขั้นตอนการเผาต่อไป

3.8 การเผาแกลบ (incineration)

เผาแกลบที่เตรียมด้วยวิธีต่าง ๆ ในเตาเผาไฟฟ้า โดยใส่แกลบลงในถาดแสตนเลสซึ่งรองด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ ให้มีความสูงจากจากพื้นถาด 3 ซม. เปิดเตาเผาให้ได้อุณหภูมิคงที่ 600° ซ แล้วนำตัวอย่างแกลบเข้าเตาเผาจับเวลาเป็นเวลานาน 6 ชม. หลังจากครบเวลา 6 ชม. แล้วจึงนำถาดออกจากเตาเผาและทิ้งให้เย็น

3.9 สมบัติของซิลิกาที่ผลิตได้

3.9.1 หาลักษณะปรากฏและลักษณะสัมผัสของเถ้าแกลบ โดยการวัดความขาวของเถ้าแกลบด้วยเครื่องมือ reflectophotometer ทั้งนี้จะบด เถ้าแกลบให้ละเอียดและอัดให้ผิวหน้าเรียบก่อนการวัดด้วยเครื่องมือ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับแมกนีเซียมออกไซด์ (MgO) ซึ่งใช้เป็นมาตรฐานความขาวเท่ากับ 100 %

3.9.2 น้ำหนักของเถ้าแกลบที่ได้จากการเผาแกลบชนิดต่าง ๆ

ชั่งน้ำหนักแกลบชนิดต่าง ๆ 100 กรัม แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 600°ซ. เป็นเวลา 6 ชม. แล้วนำออกมาจากเตาเผานำไปไว้ใน dessicator แล้วทิ้งไว้จนเย็น แล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักของเถ้าแกลบที่ได้

3.9.3 การวิเคราะห์ปริมาณซิลิกา (SiO_2)

ใช้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณซิลิกาด้วยวิธี gravimetric method เป็นวิธีวัดน้ำหนักของซิลิกาที่เหลือเพียงอย่างเดียวในตัวอย่างที่ทดสอบ หลังจากการทำปฏิกิริยาทางเคมีของ

เถ้าแกลบกับกรด HF ในครูซิเบิลแพลตินัม นำมาคำนวณกับน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นจะได้เป็นเปอร์เซนต์ของซิลิกา ทั้งนี้การเกิดปฏิกิริยาทางเคมีของซิลิกากับกรด HF จะเป็นดังสมการ

$$SiO_2 + 4\ HF\ (H_2SO_4) \text{------>} SiF_4 + 2H_2O\ (H_2SO_4)$$

ซึ่งกรดซัลฟูริกแม้ไม่ได้เข้าร่วมในการทำปฏิกิริยาแต่จะเป็นตัวไปรวมกับน้ำที่จะถูกปล่อยออกมาโดยจะเป็นการป้องกันโมเลกุลของ HF ที่จะรวมตัวกับน้ำทำให้เกิดเป็น H_2SiF_6

ขั้นตอนการวิเคราะห์

- เตรียมตัวอย่างโดย อบตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เย็นในเดสิกเคเตอร์
- เผาครูซิเบิลแพลตินัมที่ 1,000°ซ นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็นในเตาอบอุณหภูมิลดลงเหลือ 200°ซ นำไปไว้ในเดสิกเคเตอร์จนเย็น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
- ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่าง ประมาณ 0.2 กรัม ใส่ลงในครูซิเบิลแพลตินัมที่เตรียมไว้เติมน้ำลงไปเล็กน้อย กวนให้เข้ากัน แล้วเติมกรด H_2SO_4 (50%) เล็กน้อย
- เติมกรด HF เข้มข้น จนเกือบเต็มครูซิเบิล (ประมาณสามในสี่)
- ไล่น้ำโดยการต้มสารละลาย
- ใช้ความร้อนสูง ๆ จาก hot plate ไล่ควันออกให้หมด
- นำไปเผาด้วยตะเกียงบุนเสนอีกครั้งจนไม่มีควัน
- นำไปเผาในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 1,000°ซ 15 นาที
- ตั้งทิ้งไว้ในเตาเผาจนอุณหภูมิลดลงเหลือ 200°ซ นำไปไว้ในเดสิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เพื่อหาน้ำหนักที่หายไป
- คำนวณโดยใช้สมการ

$$\text{เปอร์เซนต์ของ } SiO_2 \text{ โดยน้ำหนัก} = \frac{\text{(น้ำหนักที่หายไป) x (100)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

3.9.4 ค่าพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area, BET.) ของเถ้าแกลบหรือซิลิกาที่เตรียมได้จากการเผาแกลบชนิดต่าง ๆ

วิเคราะห์ค่าพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area) มีหน่วยเป็น $ม^2./ก.(m^2/g)$ โดยใช้วิธี บี.อี.ที. (BET method) ซึ่งมาจากวิธีของ Brunaue, Emmet และ Teller ใช้เครื่องวิเคราะห์พื้นที่ผิว Micromeritics รุ่น Flow Controller 2300 FC ประเทศสหรัฐอเมริกา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย