บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

1. อุปกรณ์

อุปกรณ์	รูปแบบ (model)	บริษัทหรือหน่วยงานผู้ผลิต หรือประเทศผู้ผลิต
เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)	UV-240	Shimadzu, Japan
เครื่องเขย่า (rotary shaker)	Big Bell	Thermolyne, West Germany
เครื่องชั่งไฟฟ้า	1518 MP8	Sartorius, West Germany
เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด	2462	Sartorius, West Germany
เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM)	JSM 35CF	JEOL, Japan
เครื่องเคลือบทอง	Iron sputter model JEC-1100	JEOL, Japan
เครื่องย่อยโปรตีน	Kjeldatherm	Gerhardt, West Germany
เครื่องกลั่นโปรตีน	Vapodest 1	Gerhardt, West Germany
เครื่องวัดความหนืด (Brookfield viscometer)	DV-I	Sartorius, West Germany

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

อุปกรณ์	รูปแบบ	บริษัทหรือหน่วยงานผู้ผลิต หรือประเทศผู้ผลิต
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	W350	Memert, West Germany
ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)	O522-V103-G21DX	MFG,USA
เครื่องวัด pH (pH meter)	HI8417	Hanna, West Germany
อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking water bath)	CB60	DT Hetotherm, Japan
ตู้อบ (hot air oven)	E53	WTB binder
เครื่องวัดความหนืด (Ostwald viscometer)		Sartorius, West Germany
เครื่องมือวัดสี (Lovibond tintometer)	flexible optic tintometer	England
เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด	AF751 ประกอบขึ้นเอง ตามรูปที่ 3.6	ศูนย์บริการเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. วัตถุดิบ วัสดุ และสารเคมี

2.1 วัตถุดิบและสารเคมีสำหรับการสกัดน้ำแตงไทย

แตงไทยสุก

Pectinex Ultra SP-L® (Novo Industri A/S Copenhegen, Denmark)

Celluclast 1.5 L® (Novo Industri A/S Copenhegen, Denmark)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

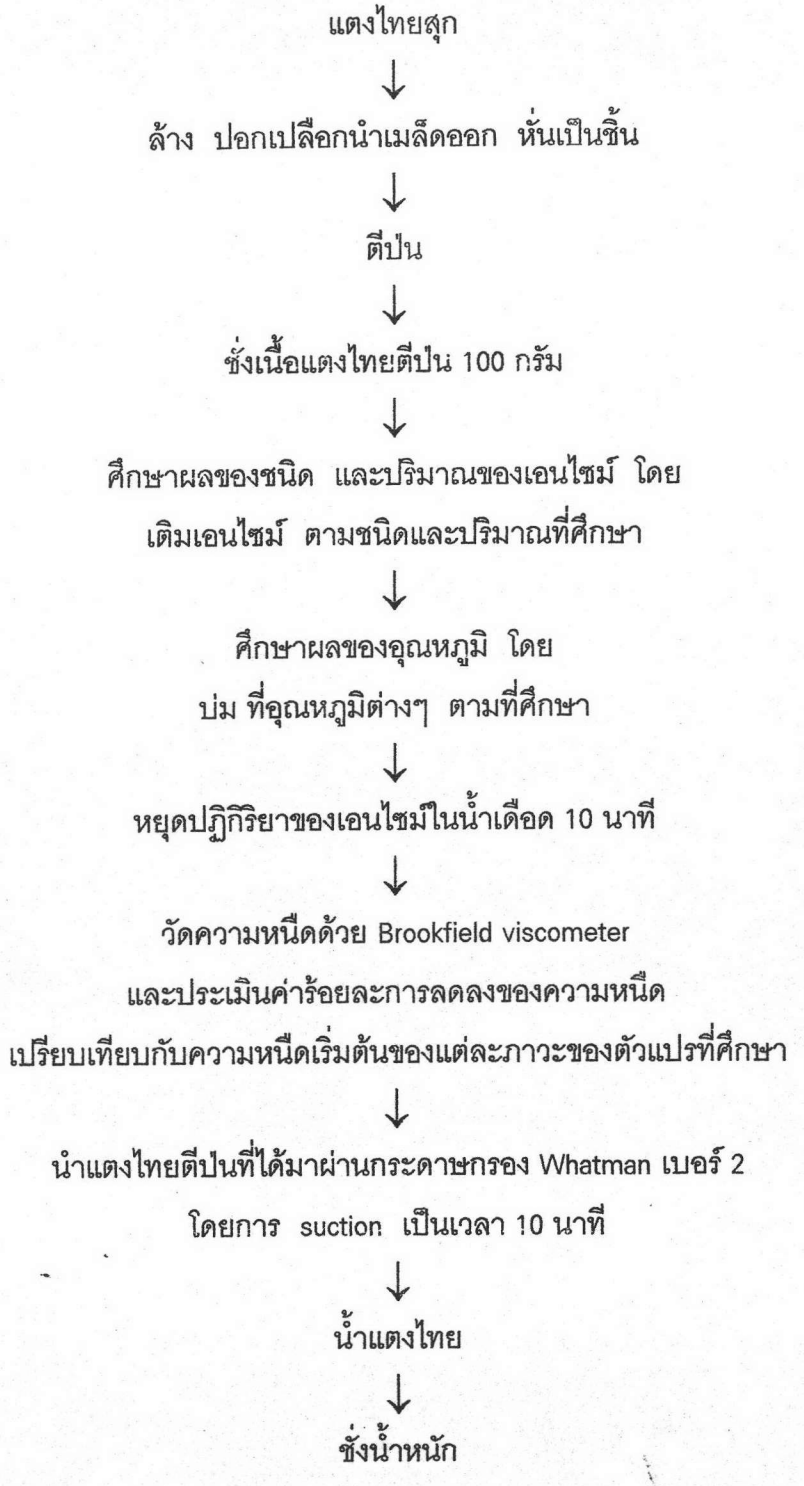
การเตรียมการสกัดน้ำแตงไทย ตามแผนภูมิรูปที่ 3.2

นำแตงไทยสุกดังรูปที่ 3.1 มาปอกเปลือกนำเมล็ดออก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วจึงนำเนื้อแตงไทยมาตีปั่นให้ละเอียด จากนั้นชั่งเนื้อแตงไทยตีปั่นประมาณ 100 กรัม นำมาเติมเอนไซม์และบ่ม โดยใช้ปริมาณเอนไซม์และสภาวะต่าง ๆ ตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง จากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในน้ำเดือด 10 นาที วัดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีปั่นโดยใช้ Brookfield viscometer ขนาดเข็มเบอร์ 3 และความเร็วรอบการหมุนของเข็ม 100 รอบต่อนาที คำนวณหาค่าร้อยละการลดลงของความหนืดตามวิธีในภาคผนวก ข-6 และ ข-7 เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ใส่เอนไซม์ และหาปริมาณผลผลิตของน้ำแตงไทย โดยนำเนื้อแตงไทยตีปั่นที่ได้ขั้นต้นมาชั่งน้ำหนักก่อนกรอง หลังจากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 โดยการ suction ด้วยปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) ที่ความดัน 27 นิ้วปรอท เป็นเวลา 10 นาที ชั่งน้ำหนักของผลผลิตน้ำแตงไทยที่ได้อีกครั้งหนึ่ง คำนวณค่าร้อยละการเพิ่มผลผลิตตามวิธีในภาคผนวก ข-8 ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดดังกล่าว แสดงดังแผนภูมิรูปที่ 3.2

(1)

(2)

รูปที่ 3.1 ลักษณะของผลแตงไทยสุก ทั้งลักษณะภายนอก (1) และลักษณะภายใน (2)



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนในการสกัดน้ำแตงไทย และขั้นตอนการศึกษาผลของปัจจัย

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับการตรึงรูปเอนไซม์และหา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

Acetic acid (Merck)

Sodium acetate trihydrate (Fluka)

Citric acid (BHD)

Sodium citrate (Fluka)

2.2.1 การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่ pH 4.0-5.0 โดยเตรียมตามวิธีในภาคผนวก ก-5.1

2.2.2 การเตรียมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่ pH 3.5-6.0 โดยเตรียมตามวิธีในภาคผนวก ก-5.2

2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

2.3.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์แอคติวิตีของเพคติเนส

Pectin (62-65% esterified) (Copenhegen)

วิธีเตรียม

เตรียมสารละลายเพคตินเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่นเจือจางด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร pH 4.0 ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จะได้สารละลายเพคตินความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้ม 0.1 โมลต่อลิตร pH 4.0

2.3.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์แอคติวิตีของเซลลูเลส

D-glucose (merck)

3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) (Fluka)

Phenol (Merck)

Sodium sulfite (Merck)

Sodium hydroxide (Merck)

Potassium sodium tartrate (Merck)

Carboxymethylcellulose sodium salt (CMC) (Fluka)

2.3.2.1 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด ละลายในน้ำกลั่นและใส่ในขวดวัดปริมาตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เป็น stock solution ที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.3.2.2 สารละลาย DNS

ชั่งกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (DNS) จำนวน 10 กรัม ฟีนอล 2 กรัม โซเดียมซัลไฟต์ 0.5 กรัม และโปแตสเซียมโซเดียมตาร์เตรต 200 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร จำนวน 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2.3.2.3 สารละลาย CMC

เตรียมสารละลาย CMC ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในน้ำกลั่น เจือจางด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร pH 4.8 ในอัตราส่วน 1:1 จะได้สารละลาย CMC ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โมลต่อลิตร pH 4.8

2.4 <u>วัสดุและสารเคมีสำหรับการตรึงรูปเพคติเนสหรือเซลลูเลสบนเม็ดแก้ว</u>

เม็ดแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร

Nitric acid (Merck)

γ-Aminopropyltriethoxysilane (APTS) (Sigma)

Giutaraldehyde (Fluka)

Pectinex Ultra SP-L®

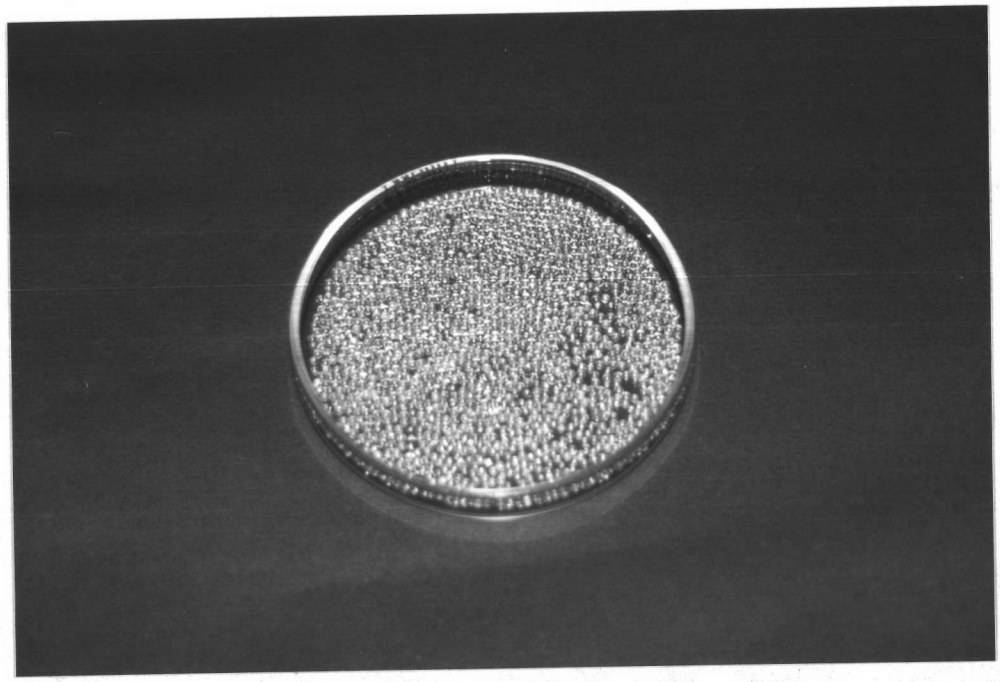
Celluclast 1.5 L®

Toluene (Merck)

Acetone (Merck)

2.4.1 <u>การเตรียมเม็ดแก้วก่อนการตรึงรูป</u>

นำเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร มาย่อยด้วยกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดกรด และอบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทเพื่อเป็นตัวพยุงสำหรับการตรึงรูปเพคติเนส และเซลลูเลสต่อไป ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 เม็ดแก้วสะอาดที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไนตริก

2.4.2 <u>เตรียมสารละลายอะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (APTS)</u>

เตรียมสารละลาย APTS ความเข้มข้นร้อยละ 1, 3, 5 และ 7 โดยปริมาตรในโทลูอีน สารละลาย APTS นี้จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นตัวพยุงเม็ดแก้วในการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูป

2.4.3 <u>เตรียมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์</u>

เตรียมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1, 3, 5 และ 7 โดยปริมาตร ในน้ำกลั่นเพื่อใช้เป็นสารสร้างพันธะเชื่อมขวางในการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูป

2.4.4 สารละลายเพคติเนส

เตรียมสารละลายเพคติเนสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 โดยปริมาตร ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 4.0 (1 มิลลิลิตรของเพคติเนสมีแอคติวิตี 5,242 ยูนิต ตามวิธีวัดแอคติวิตีในภาคผนวก ก-1.2 โดยที่ 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ลดความหนืดของสารละลายเพคตินความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร/น้ำหนัก ลงครึ่งหนึ่ง หรือลดลงร้อยละ 50 ภายในเวลา 1 นาที ที่ 30 องศาเซลเซียส)

2.4.5 สารละลายเซลลูเลส

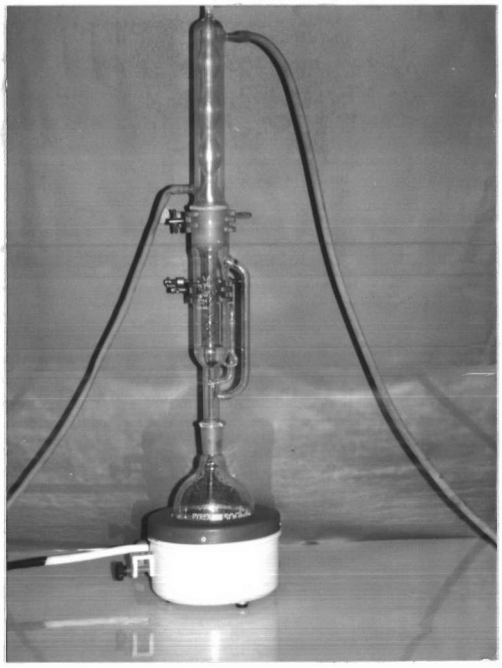
เตรียมสารละลายเซลลูเลสความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 โดยปริมาตร ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 4.8 (1 มิลลิลิตรของเซลลูเลสมีแอคติวิตี 16,860 ยูนิต ตามวิธีวัดแอคติวิตีในภาคผนวก ก-2.2 โดยที่ 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เปลี่ยนสับสเตรทคาร์บอกซี่เมทธิลเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ที่ 40 องศาเซลเซียส)

2.4.6 การเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้ว

การเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้ว โดยการตรึงรูปเอนไซม์แต่ละชนิดแยกกัน สามารถแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

2.4.6.1 การกระตุ้นเม็ดแก้วด้วยสารละลาย APTS (Silanization of glass bead)

ได้พัฒนาตามวิธีการทำ Silanization of glass bead ของ Weetall (1976) โดยนำเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไนตริกแล้วจำนวน 50 กรัม เติมสารละลาย APTS ในโทลูอีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนภายใต้การ retlux เป็นเวลา 9 ชั่วโมง (รูปที่ 3.4) ล้างด้วยโทลูอีน 100 มิลลิลิตร เพื่อล้าง APTS ที่เหลืออยู่ ตามด้วยอะซิโตน 100 มิลลิลิตร เพื่อล้างโทลูอีนและล้างด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 4 ครั้ง เพื่อล้างอะซิโตน จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จะได้เม็ดแก้วที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย APTS ที่พร้อมสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์ต่อไป ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดแสดงดังแผนภูมิรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.4 การประกอบเครื่องมือ reflux เม็ดแก้วด้วยสารละลาย APTS ในโทลูอีน

เม็ดแก้วสะอาด 50 กรัม + 1% APTS ในโทลูอีน 100 มิลลิลิตร

↓

reflux 9 ชั่วโมง

↓

ล้างด้วยโทลูอีน 100 มิลลิลิตร

ล้างด้วยอะซิโตน 100 มิลลิลิตร

ล้างด้วยน้ำกลั่น 4x100 มิลลิลิตร

↓

ให้ความร้อนที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

↓

อบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

↓

เม็ดแก้วที่ถูกกระตุ้นด้วย APTS

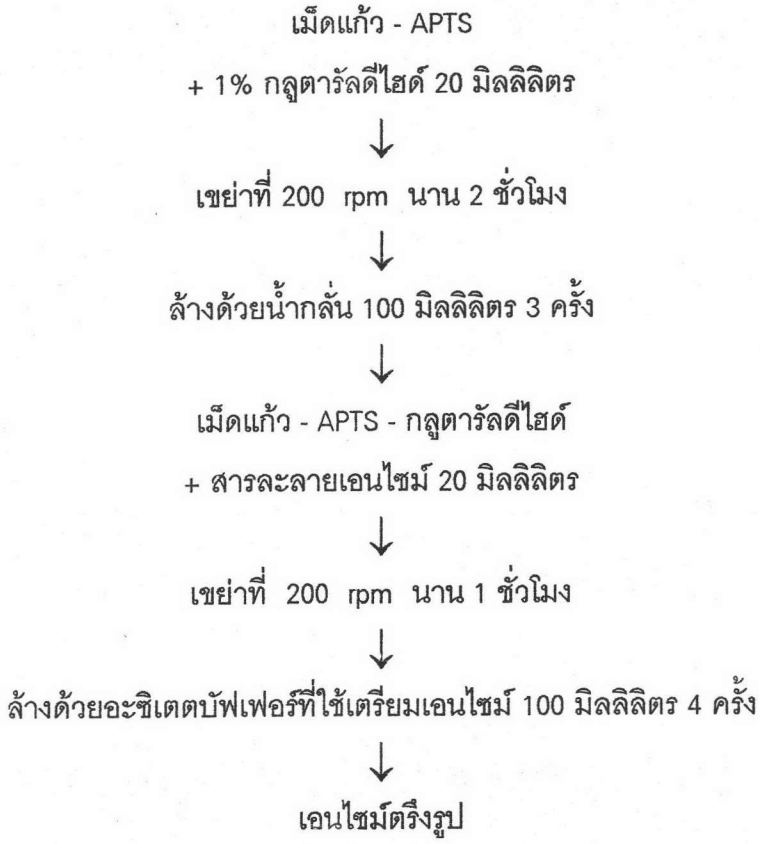
(silanized glass beads)

รูปที่ 3.5 แผนภูมิขั้นตอนการกระตุ้นเม็ดแก้วด้วยสารละลาย APTS (Silanization of glass bead)

2.4.6.2 <u>การตรึงรูปเอนไซม์บนเม็ดแก้ว</u>

โดยทำการตรึงรูปเอนไซม์แต่ละชนิดแยกกัน นำเม็ดแก้วที่ผ่านการกระตุ้นด้วยสารละลาย APTS จำนวน 5 กรัม มาเติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 3.6) ล้างด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 4 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ 20 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นต่างกันคือ เพคติเนสเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร หรือเซลลูเลสเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตร ในอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ที่ pH 4.0 หรือ 4.8 ตามลำดับ นำเข้าเครื่องเขย่านาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยอะซีเตตบัฟเฟอร์ที่ใช้เตรียมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 4 ครั้ง จะได้เอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้วเก็บไว้ในบัฟเฟอร์ ที่ใช้เตรียมสารละลายเอนไซม์ ซึ่งขั้นตอนทั้งหมด แสดงดังแผนภูมิรูปที่ 3.7

รูปที่ 3.6 การประกอบเครื่องมือการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้ว



รูปที่ 3.7 แผนภูมิขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้วแบบเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์

2.5 <u>สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีน</u>

Copper sulphate (Merck)

Pctassium sulphate (Merck)

Sulfuric acid (Merck)

Sodium hydroxide (Merck)

Boric acid (Merck)

Methyl red (Merck)

2.5.1 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในน้ำกลั่น

2.5.2 เตรียมสารละลายกรดบอริคความเข้มข้นร้อยละ 4.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยละลายกรดบอริคในน้ำกลั่น ให้ความร้อน และคนตลอดเวลาจนละลายหมด โดยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า ทำเป็นปริมาตรที่ต้องการด้วยน้ำกลั่น

2.5.3 เตรียมเมธิลเรด ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 60

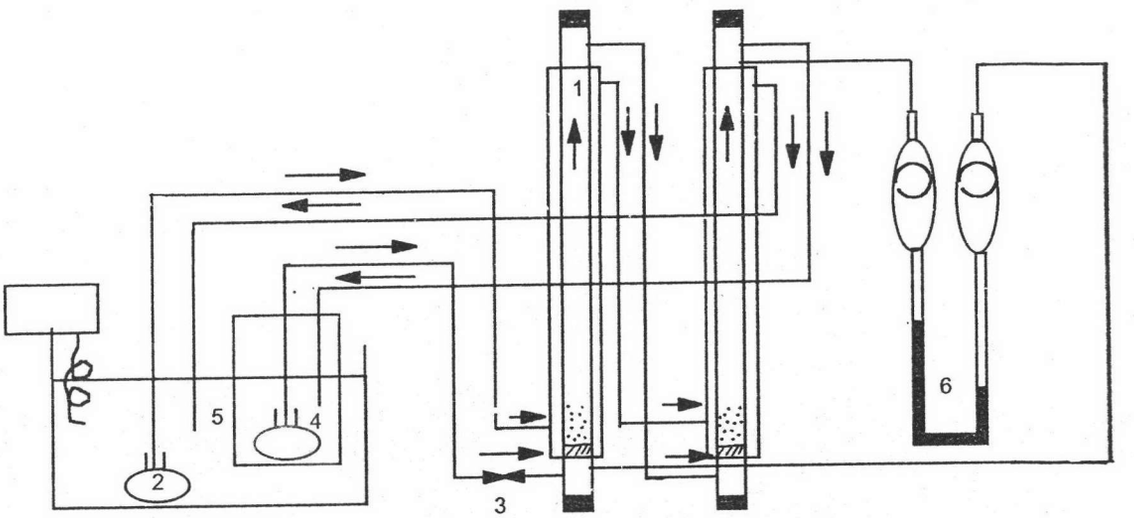
2.6 <u>วัตถุดิบ วัสดุอุปกรณ์สำหรับการศึกษาการสกัดน้ำแตงไทย โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์เพคติเนสตรึงรูปร่วมกับเซลลูเลสตรึงรูป</u>

แตงไทยสุก

เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด

2.6.1 เตรียมแตงไทยตีป่นโดยนำผลแตงไทยที่มีระดับความสุกตามต้องการมาทำการล้างปอกเปลือก เอาเมล็ดออก หั่นเป็นชิ้น ๆ และตีป่นให้ละเอียด จากนั้นควบคุมความหนืดเริ่มต้นของแตงไทยตีป่นให้เท่ากันหมดโดยใช้น้ำคั้นที่ได้จากการสกัดแบบใช้แรงกดธรรมดา แบ่งใส่ถุงพลาสติกถุงละ 1000 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.6.2 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูป เป็นแบบฟลูอิไดซ์เบด ขนาด 2x45 เซนติเมตร (เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน x ความยาว) ต่อกันจำนวน 2 คอลัมน์ ประกอบด้วยคอลัมน์แก้วใสสองชั้น ชั้นนอกสำหรับควบคุมอุณหภูมิ โดยใช้การไหลเวียนของน้ำชั้นในสำหรับบรรจุเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูป โดยใส่เอนไซม์ตรึงรูปทั้งสองชนิดลงในคลอลัมน์เดียวกันจำนวน 10 กรัม อุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ร่วมกันคือ เครื่องสูบขนาดเล็ก (pump) สายยาง วาล์วควบคุมอัตราการไหล หม้อแปลงไฟฟ้ากระแสสลับ และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิระบบของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ และการจัดชุดอุปกรณ์แสดงดังแผนภาพรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 แผนภาพเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบดพร้อมชุดอุปกรณ์

(1) เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด
(2) เครื่องสูบขนาดเล็ก
(3) วาล์วเปิดปิด
(4) เนื้อแตงไทยตีป่น
(5) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
(6) มานอมิเตอร์

3. วิธีดำเนินงานวิจัย

วิธีดำเนินงานวิจัยจะแบ่งเป็นขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำแตงไทยโดยใช้เอนไซม์อิสระ 2 ชนิดร่วมกัน คือ เพคติเนส และเซลลูเลส ในลักษณะของการทำปฏิกิริยาแบบต่อเนื่อง (simultaneous)

3.1.1 ศึกษาหาความเข้มข้นของเพคติเนส เซลลูเลสและอุณหภูมิที่เหมาะสม

เตรียมการทดลองตามวิธีในข้อ 2.1 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์จากการติดตามค่าร้อยละการลดของความหนืด (% viscosity reduction) ของเนื้อแตงไทยตีป่น ซึ่งวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Factorial completely randomized design ขนาด 3x3x3 ทดลอง 2 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทำการแปรระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ชนิดละ 3 ระดับ คือร้อยละ 0.02, 0.05 และ 0.1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักเนื้อแตงไทยตีป่น และแปรอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการบ่มนาน 1 ชั่วโมง

3.1.2 ศึกษาหาระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาย่อยสลายเนื้อแตงไทยตีป่นที่เหมาะสม

เตรียมการทดลองตามวิธีในข้อ .2.1 โดยใช้ความเข้มข้นของเพคติเนส เซลลูเลส และอุณหภูมิที่เหมาะสม ที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.1.1 วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Completely randomized design 7 ระดับ ทดลอง 2 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ที่ระยะเวลาในการบ่ม 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์จากการติดตามค่าร้อยละการลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่น และปริมาณผลผลิตที่เพิ่มขึ้นของน้ำแตงไทยที่ได้

3.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์แต่ละชนิด คือ เพคติเนสหรือเซลลูเลสบนเม็ดแก้ว

3.2.1 ศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้กระตุ้นเม็ดแก้วที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด

เตรียมเอนไซม์ตรึงรูปตามวิธีการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้วในข้อ 2.4.6 โดยการตรึงรูปแยกกันในเอนไซม์แต่ละชนิด วางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ

แบบ Factorial completely randomized design ขนาด 4x4 ทดลอง 2 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แปรความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ 4 ระดับ คือ ร้อยละ 1, 3, 5 และ 7 โดยปริมาตร ซึ่งจะติดตามผลโดยดูความแตกต่างของค่าแอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูปหรือเซลลูเลสตรึงรูปที่ได้ ตามวิธีในภาคผนวก ก-1.3 หรือ ก-2.3 ตามลำดับ

3.2.2 ศึกษาหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

เตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้วซึ่งตรึงรูปแยกกัน ตามวิธีการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้วในข้อ 2.4.6 และใช้ความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.2.1 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized design 8 ระดับ ทดลอง 2 ซ้ำ โดยสารละลายเพคติเนสมีความเข้มข้นร้อยละ 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 โดยปริมาตร ในอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ที่ pH 4.0 และในกรณีของการทำเซลลูเลสตรึงรูปจะใช้ สารละลายเซลลูเลสมีความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 โดยปริมาตร ในอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ที่ pH 4.8 ติดตามผลโดยการเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีเฉลี่ยของเอนไซม์ตรึงรูป กับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้

3.3 ศึกษาโครงสร้างของเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูป เปรียบเทียบกับโครงสร้างของเม็ดแก้วสะอาด ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน

3.3.1 ศึกษาโครงสร้างของเม็ดแก้วสะอาดที่พร้อมสำหรับการตรึงรูป

เคลือบทองเม็ดแก้วที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไนตริกแล้ว ด้วยเครื่องเคลือบทองแบบ Iron sputter model JEC-1100 ของ JEOL ประเทศญี่ปุ่น นาน 5 นาที และตรวจดูโครงสร้างด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

3.3.2 ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์แต่ละชนิดตรึงรูปบนเม็ดแก้ว

แช่เอนไซม์ตรึงรูปจำนวน 10 กรัม ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร นาน 3 ชั่วโมง แล้วจึงเทสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ออก นำไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 50, 70 และ 95 โดยปริมาตร ที่ความเข้มข้นละ 15 นาที ตามลำดับ อบเอนไซม์ตรึงรูปให้แห้งสนิท นำไปเคลือบทอง ด้วยเครื่องเคลือบทองแบบ

Iron sputter model JEC-1100 ของบริษัท JEOL นาน 5 นาที ตรวจดูโครงสร้างด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

3.4 ศึกษาสมบัติบางประการทางจลนพลศาสตร์ของเพคติเนสตรึงรูปหรือเซลลูเลสตรึงรูปเปรียบเทียบกับเพคติเนสอิสระหรือเซลลูเลสอิสระ

3.4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

เตรียมเพคติเนสตรึงรูป หรือเซลลูเลสตรึงรูป ซึ่งตรึงรูปแยกกัน ตามวิธีการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้วในข้อ 2.4.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 และเตรียมสารละลายเพคติเนสอิสระหรือเซลลูเลสอิสระ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ในอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ที่ pH 4.0 หรือ 4.8 ตามลำดับ โดยบ่มเอนไซม์ทั้ง 2 กรณีกับสับสเตรทของเอนไซม์นั้นๆ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 25-80 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หาแอคติวิตีของเพคติเนสอิสระ และเพคติเนสตรึงรูป ตามวิธีในภาคผนวก ก-1.2 และ ก-1.3 ตามลำดับ วิเคราะห์หาแอคติวิตีของเซลลูเลสอิสระ และเซลลูเลสตรึงรูป ตามวิธีในภาคผนวก ก-2.2 และ ก-2.3 ตามลำดับ เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

3.4.2 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

เตรียมเพคติเนสตรึงรูป หรือเซลลูเลสตรึงรูป ซึ่งตรึงรูปแยกกัน ตามวิธีการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้วในข้อ 2.4.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 เตรียมสารละลายเพคติเนสอิสระ หรือเซลลูเลสอิสระ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น บ่มเอนไซม์ทั้ง 2 กรณีกับสับสเตรทของเอนไซม์นั้นๆ ในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ จาก 3.0-6.0 ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.4.1 วิเคราะห์หาแอคติวิตีของเพคติเนสอิสระ และเพคติเนสตรึงรูป ตามวิธีในภาคผนวก ก-1.2 และ ก-1.3 ตามลำดับ วิเคราะห์หาแอคติวิตีของเซลลูเลสอิสระ และเซลลูเลสตรึงรูป ตามวิธีในภาคผนวก ก-2.2 และ ก-2.3 ตามลำดับ เปรียบเทียบช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยการเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ร้อยละของแอคติวิตีสัมพัทธ์ กับ pH ของสารละลายปฏิกิริยา

3.4.3 ศึกษาค่าคงที่ไมคีลีส (Michaelis Menten Constant, Km)

เตรียมเอนไซม์แต่ละชนิดตรึงรูป ตามวิธีการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้วในข้อ 2.4.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 เตรียมสารละลายเพคติเนสอิสระ หรือเซลลูเลสอิสระความเข้มข้น 0.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น บ่มเอนไซม์ทั้ง 2 กรณีกับสับสเตรทของเอนไซม์นั้นๆ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 0.8, 1, 1.25, และ 1.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปที่หาได้จากการทดลองข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเพคติเนสอิสระและเพคติเนสตรึงรูป ตามวิธีในภาคผนวก ก-1.2 และ ก-1.3 ตามลำดับ และวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเซลลูเลสอิสระและเซลลูเลสตรึงรูป ตามวิธีในภาคผนวก ก-2.2 และ ก-2.3 ตามลำดับ อ่านค่า Km ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด โดยการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk plot ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของสับสเตรทกับส่วนกลับของความเร็วปฏิกิริยา ตามวิธีของ Whitaker (1972)

3.4.4 แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (Specific activity)

เตรียมเพคติเนสตรึงรูป หรือเซลลูเลสตรึงรูปบนเม็ดแก้ว ซึ่งตรึงรูปแยกกันตามวิธีการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้วในข้อ 2.4.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 เตรียมสารละลายเพคติเนส หรือเซลลูเลสอิสระ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ที่ได้จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ตามลำดับ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ตรึงรูปและอิสระ ด้วยวิธี Semi Kjeldhal Distillation (AOAC, 1980) ดังวิธีในภาคผนวก ข-5 คำนวณแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ดังนี้

$$\text{แอคติวิตีจำเพาะ} = \frac{\text{แอคติวิตีของเอนไซม์ (ยูนิต)}}{\text{ปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ (มิลลิกรัม)}}$$

3.5 ศึกษาประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาซ้ำของเอนไซม์แต่ละชนิดตรึงรูป

เตรียมเพคติเนสตรึงรูปหรือเซลลูเลสตรึงรูปบนเม็ดแก้ว ซึ่งตรึงรูปแยกกัน ตามวิธีการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้วในข้อ 2.4.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 หาแอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูป หรือเซลลูเลสตรึงรูป โดยใช้

ภาวะการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ทำการใช้ซ้ำหลายๆ ครั้ง สำหรับเพคติเนสตรึงรูป หรือเซลลูเลสตรึงรูปที่ผ่านการใช้งานแล้ว ให้นำมาล้างด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร ที่ pH 4.0 หรือ 4.8 ตามลำดับ ทุกครั้งก่อนนำไปหาแอคติวิตีซ้ำกับสับสเตรทใหม่ในครั้งต่อๆ ไป นำข้อมูลมาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์ กับจำนวนครั้งในการใช้งานของเอนไซม์ตรึงรูป

3.6 ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปในระหว่างการเก็บ

เตรียมเพคติเนสตรึงรูปหรือเซลลูเลสตรึงรูปบนเม็ดแก้ว ซึ่งตรึงรูปแยกกัน ตามวิธีการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดแก้วในข้อ 2.4.6 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 นำเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้ไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิตู้เย็น (8-10 องศาเซลเซียส) วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ระยะเวลาการเก็บ 0, 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน

3.7 ศึกษาการสกัดน้ำแตงไทยโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ของเอนไซม์ผสมระหว่างเพคติเนสตรึงรูปและเซลลูเลสตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

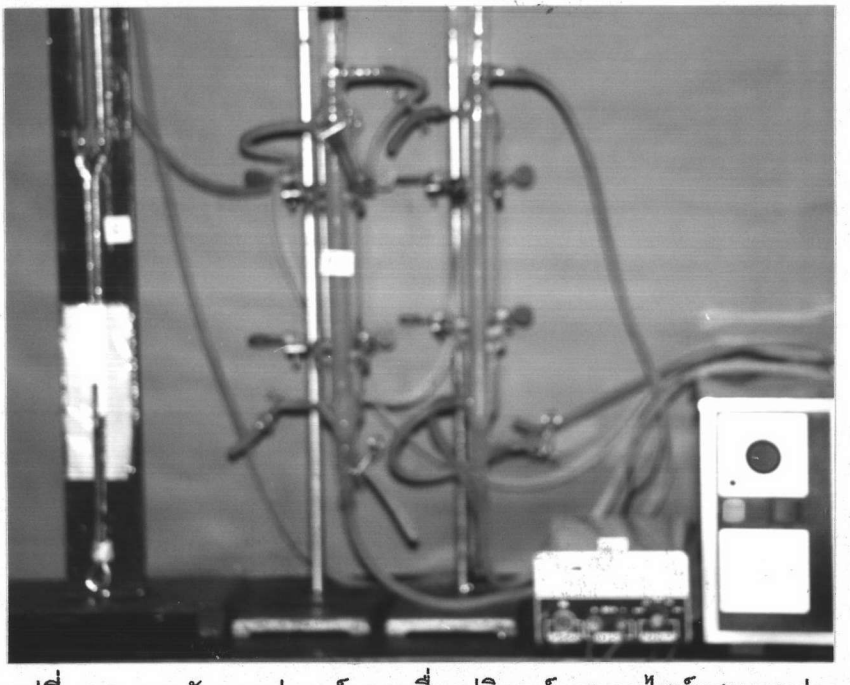
3.7.1 ศึกษาหาอัตราส่วนผสมของเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูปที่เหมาะสมสำหรับการสกัดน้ำแตงไทย

3.7.1.1 หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น

นำเม็ดแก้วจำนวน 20 กรัม บรรจุลงในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูป ขนาด 2x45 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ ๆ ละ 10 กรัม เปิดวาล์วควบคุมอัตราการไหลของแตงไทยตีป่น โดยให้เม็ดแก้วเกิดฟลูอิไดเซชั่นอย่างแรง จากนั้นลดอัตราการไหลลงจนเม็ดแก้วอยู่ในลักษณะเบดนิ่ง เริ่มแปรอัตราการไหลขาออกของแตงไทยตีป่น บันทึกค่าความดันตกทุกๆอัตราการไหล สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ความดันตกกับอัตราการไหลของแตงไทยตีป่น ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อหาอัตราการไหลต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.7.1.2 <u>หาอัตราส่วนผสมของเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูปที่เหมาะสม สำหรับการสกัดน้ำแตงไทย</u>

นำเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูปบนเม็ดแก้ว ซึ่งตรึงรูปแยกกัน จำนวน 20 กรัม บรรจุลงในเครื่องปฏิกรณ์จำนวน 2 คอลัมน์ๆ ละ 10 กรัม โดยใส่เอนไซม์ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิด ลงในคอลัมน์เดียวกัน ซึ่งในแต่ละคอลัมน์จะแปรอัตราส่วนผสมของเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูปเป็น 2.5/7.5, 5.0/5.0 และ 7.5/2.5 กรัม ในแต่ละคอลัมน์ เปิดวาล์วควบคุมอัตราการไหลของเนื้อแตงไทยตีป่น โดยให้เม็ดแก้วเกิดฟลูอิไดเซชั่นอย่างแรง จากนั้นทำการลดอัตราการไหลของแตงไทยตีป่นลงจนเป็น 165 มิลลิลิตร/นาที (1.5 เท่าของอัตราเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่นที่ได้จากการทดลองข้อ 3.7.1.1) คิดเป็นค่า SV (Space Velocity) ซึ่งหมายถึงสัดส่วนระหว่างอัตราเร็วการไหลต่อปริมาตรของเอนไซม์ตรึงรูปในคอลัมน์เป็น 18.75 $(นาที)^{-1}$ กำหนดปริมาณแตงไทยตีป่นที่ใช้เป็น 700 มิลลิลิตร ไหลวนเวียนภายในเครื่องปฏิกรณ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส วัดความหนืดของแตงไทยตีป่นทุกๆ 30 นาที โดยเครื่อง Brookfield viscometer การจัดชุดอุปกรณ์สำหรับการทดลองดังรูปที่ 3.9 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ร้อยละการลดความหนืดของแตงไทยตีป่น กับเวลาที่ใช้ ในทุกๆ อัตราส่วน เพื่อหาอัตราส่วนผสมของเพคติเนส และเซลลูเลสตรึงรูปที่เหมาะสมในการสกัดน้ำแตงไทย



รูปที่ 3.9 การจัดชุดอุปกรณ์ของเครื่องปฏิกรณ์ของเอนไซม์ผสมระหว่างเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูป แบบฟลูอิไดซ์เบด

3.7.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสกัดน้ำแตงไทย

3.7.2.1 หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น

นำเม็ดแก้วจำนวน 20 กรัม บรรจุลงในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูป ขนาด 2x45 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ๆ ละ 10 กรัม จากนั้นทำการทดลองเหมือนข้อ 3.7.1.1 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิเป็นที่ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส

3.7.2.2 หาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสกัดน้ำแตงไทย

นำเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูปบนเม็ดแก้ว ซึ่งตรึงรูปแยกกัน จำนวน 20 กรัม บรรจุลงในเครื่องปฏิกรณ์จำนวน 2 คอลัมน์ๆ ละ 10 กรัม โดยใส่เอนไซม์ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิด ลงในคอลัมน์เดียวกัน ที่อัตราส่วนผสมของเพคติเนสตรึงรูปและเซลลูเลสตรึงรูป ที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากการทดลองข้อ 3.3.7.1 เปิดวาล์วควบคุมอัตราการไหลของแตงไทยตีป่นจนเกิดฟลูอิไดเซชั่นอย่างแรง จากนั้นทำการลดอัตราการไหลลงจนเป็น 165 มิลลิลิตร/นาที (1.5 เท่าของความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.3.7.2.1) คิดเป็นค่า SV (Space Velocity) ซึ่งหมายถึงสัดส่วนระหว่างอัตราการไหลต่อปริมาตรของเอนไซม์ตรึงรูปในคอลัมน์เป็น 18.75 $(นาที)^{-1}$ กำหนดปริมาณแตงไทยตีป่นที่ใช้ในการทดลองเป็น 700 มิลลิลิตร ไหลวนเวียนภายในเครื่องปฏิกรณ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วัดความหนืดของแตงไทยตีป่นทุก ๆ 30 นาที โดยเครื่อง Brookfield viscometer สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ร้อยละการลดความหนืดของแตงไทยตีป่นกับเวลาที่ใช้ ในทุกๆ อุณหภูมิ

3.8 เปรียบเทียบสมบัติของน้ำแตงไทยที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

3.8.1 เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพของน้ำแตงไทย

เตรียมน้ำแตงไทยที่สกัดได้ โดยวิธีการกดแบบธรรมดา การใช้เอนไซม์อิสระและการใช้เอนไซม์ตรึงรูป ตามภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษามาแล้วข้างต้น มาศึกษาสมบัติทางกายภาพซึ่งประกอบด้วย Total soluble solid, pH โดยใช้ Hand Refractometer และ สีโดยใช้ Lovibond Tintometer

3.8.2 เปรียบเทียบสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำแตงไทย

เตรียมน้ำแตงไทยที่สกัดได้โดยวิธีการกดแบบธรรมดา การใช้เอนไซม์อิสระและการใช้เอนไซม์ตรึงรูป ตามภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษามาแล้วข้างต้น มาทดสอบการยอมรับ

ทางประสาทสัมผัสโดยพิจารณาสมบัติดังนี้คือ สี กลิ่น รส และการยอมรับรวม วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Randomized completely block design โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 10 คน ตารางการทดสอบทางประสาทสัมผัสแสดงดังภาคผนวก ก-6