บทที่ 4
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

4.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

4.1.1 อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P100 ,1000 และP5000 บริษัท Gilson , ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องปั่นกวนด้วยแรงแม่เหล็กและให้ความร้อน(magnetic stirrers and heater) บริษัท Barnstead Thermolyne , ประเทศแคนาดา
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Instruments , ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น MP220 บริษัท Mettler Toledo , ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
5. ไมโครมิเตอร์ แบบดิจิตอล รุ่น 5001 บริษัท Anhui Measuring tools company, ประเทศจีน
6. เครื่องอัลตร้าโซนิค คลีนเนอร์(ultrasonic cleaner) รุ่น CREST-MODEL HT บริษัท ไซแอนดิฟิตโปรโมชั่น จำกัด
7. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน(transmission electron microscopy หรือ TEM) รุ่น Jem 2010 บริษัท Jeol
8. ตู้ดูดควันพิษ รุ่น1200STD บริษัท Clean Air จำกัด

4.1.2 เคมีภัณฑ์

1. เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส EC. 1.11.1.7 (horseradish peroxidase เกรด 1 PEO -131 , 272U/mg , RZ $\geq$ 3.0 salt free) บริษัท Toyobo , ประเทศญี่ปุ่น
2. ไคโตซาน(deacetylation degree 95 % , MW 1,450 kDa) บริษัท Seafresh chitosan , ประเทศไทย
3. กรดอะซิตริก บริษัท BDH laboratory supplies, ประเทศอังกฤษ[1]
4. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 30 % บริษัท E.Merck, Darmstadt,ประเทศเยอรมนี [1]
5. ไพโรแกลอล บริษัท Poch S.A.[1]
6. ซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$) บริษัท Poch S.A.[1]

7. โซเดียมโบโรไฮไดร์ ($NaBH_4$) บริษัท Ajax Chemical [1]
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Ajax Chemical [1]
9. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนออโทรฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัทAjax Chemical [1]
10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออโทรฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัทAjax Chemical [1]

หมายเหตุ [1] สารเคมีมีความบริสุทธิ์ในระดับ ห้องปฏิบัติการ

4.2 วิธีการทดลอง

4.2.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน

การเตรียมอนุภาคนาโนเงินด้วยวิธีการใช้ตัวรีดิวซ์ ทำได้โดยการเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 0.001 โมล่าร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทให้ได้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลอง จากนั้นจึงเทสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดร์ 0.01 โมล่าร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่แล้วปั่นกวนสารละลายทั้งหมดบนเครื่องปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 90 นาที จะได้สารแขวนลอยสีเขียวเข้มของอนุภาคนาโนเงิน โดยคาดหมายว่าความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้นั้นจะมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตในตอนเริ่มต้น หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดขนาดของอนุภาคนาโนเงินด้วยเครื่อง particle size analyser (ดัดแปลงวิธีมาจาก Luo และคณะ,2004 และ Huang และคณะ,2004)

4.2.2 การตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสด้วยวิธีการห่อหุ้มในไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนเงิน

ในขั้นแรกทำการเตรียมไคโตซาน (0.5-1.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร) ในกรดอะซิตริกที่มีความเข้มข้น 1 % โดยปริมาตร แล้วปรับค่าพีเอชของไคโตซานให้มีค่าเท่ากับ 5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ [Yangและคณะ,2005] จากนั้นนำไคโตซานที่เตรียมได้ผสมกับสารละลายอนุภาคนาโนเงิน (0.4×10^{-2} - 1.2×10^{-2}นาโนโมล่าร์) ซึ่งเตรียมได้ในข้อ 4.2.1 และผสมกับสารละลายเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (0.05- 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในถ้วยพิมพ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร โดยมีปริมาตรของสารละลายทั้งหมด 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำแท่งแม่เหล็กใส่ลงในถ้วยพิมพ์แล้วปั่นกวนสารละลายทั้งหมดบนเครื่องปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 88 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำแท่งแม่เหล็กออกจากถ้วยฟิล์มและทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำเอนไซม์ตรึงรูปบนแผ่นฟิล์มไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนเงินเป็นองค์ประกอบมาตัดแบ่งด้วยกรรไกรเป็นชิ้น ขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร และในการเตรียมแผ่นฟิล์มที่เป็นตัวควบคุมของเอนไซม์ตรึงรูปจะทำการเตรียมวิธีเดียวกันกับกรณีเอนไซม์ตรึงรูป

ทุกประการ แต่แตกต่างกันเพียงในกรณีของแผ่นฟิล์มที่เป็นตัวควบคุมจะไม่มีเอนไซม์ (ดัดแปลงวิธีมาจาก Rauf และคณะ ,2006)

4.2.3 การวิเคราะห์ กิจกรรมเอนไซม์

การวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์นั้นดัดแปลงมาจากวิธีการของFernandes และคณะ(2004) โดยการเตรียมสารละลายไพโรแกลลอล 0.075 โมล่าร์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6 แล้วเติมเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสอิสระ (ความเข้มข้น 0.001 , 0.006 , 0.012 และ 0.018 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปในสารละลายไพโรแกลลอลที่เตรียมไว้ ปริมาตร 66 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร โดยที่ทำการควบคุมอุณหภูมิของสารละลายให้ได้ 30 องศาเซลเซียสด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ และปั่นกวนสารละลายบนเครื่องปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/นาที ไปพร้อมกันตลอดการทดลอง จากนั้นจึงเริ่มการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.50 โมล่าร์ ปริมาตร 14 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายไพโรแกลลอลที่มีเอนไซม์อิสระ โดยเมื่อเวลาผ่านไป 1 นาที จึงทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยการเก็บสารตัวอย่างจากการวิเคราะห์มาแช่ไว้ในถังน้ำแข็ง เพื่อนำสารละลายที่ได้ไปวัดผลค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปและแผ่นฟิล์มที่เป็นตัวควบคุมของเอนไซม์ตรึงรูป จะทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบเอนไซม์อิสระ โดยมีสูตรการคำนวณกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะตามสมการที่ 4.1

กำหนดให้ : กิจกรรมเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรมีค่าเปลี่ยนแปลงไป 0.1 หน่วย ในเวลา 1 นาที

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมเอนไซม์)} = \frac{(A-C)*D}{0.1*E} \qquad \text{---------- (4.1)}$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารลายตัวอย่าง (มีเอนไซม์)

C = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม (ไม่มีเอนไซม์)

D = จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

E = ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบการเร่งปฏิกิริยา (มิลลิกรัมเอนไซม์)

โดยกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะซึ่งได้จากการวัดซ้ำ 3 ครั้งของตัวอย่างเดียวกัน จะมีค่าสัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อน(coefficient of variation) ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ 4.2 มีค่าเท่ากับ 15.39 % และกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะซึ่งได้จากการทำการทดลองเหมือนกันซ้ำ 3 ครั้ง จะมีค่าสัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อนเท่ากับ 15.90 %

$$\text{สัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อน} = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \qquad \text{---------- (4.2)}$$

<u>หน่วยของความเข้มข้นของตัวแปรต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีดังนี้</u>

1. ความเข้มข้นของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส
   - กรณีเอนไซม์อิสระ มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยา
   - กรณีเอนไซม์ตรึงรูป มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของสารละลายไคโตซาน
2. ความเข้มข้นของไคโตซาน มีหน่วยเป็น % น้ำหนัก/ปริมาตรของสารละลายไคโตซาน
3. ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน มีหน่วยเป็น นาโนโมล/ลิตรของสารละลายไคโตซาน

4.2.4 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยา

ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

4.2.4.1 <u>พีเอชของไคโตซาน</u> โดยจะศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงพีเอชของไคโตซานที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ที่พีเอช 4 5 และ6 ซึ่งจะปรับพีเอชด้วยความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมล่าร์ และ 1โมล่าร์

4.2.4.2 <u>ความเข้มข้นของสารตั้งต้น</u> โดยจะศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารตั้งต้นไพโรแกลลอล และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ใช้ทดสอบการเร่งปฏิกิริยาทั้งเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปดังตารางที่ 4.1

4.2.4.3 <u>ขนาดแผ่นฟิล์มของไคโตซาน</u> โดยจะศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงขนาดแผ่นฟิล์มของไคโตซานที่จะนำมาใช้ทดสอบการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ตรึงรูป 3 แบบ คือ ขนาดตัดละเอียด 0.3 x 0.3 และ 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารตั้งต้นทั้งกรณีเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

กรณี	ความเข้มข้นของสารตั้งต้น(โมล่าร์)	
	ไพโรแกลลอล	ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
เอนไซม์อิสระ	0.03 , 0.04 , 0.05 , 0.06 , 0.075 , 0.085 และ 0.100	คงที่ 0.5
	คงที่ *	0.10 , 0.25 , 0.50 และ 0.60
เอนไซม์ตรึงรูป	0.060 , 0.065 , 0.070 , 0.075 และ 0.100 โมล่าร์	คงที่ 0.5
	คงที่ *	0.1 , 0.25 , 0.4 , 0.5 และ 0.60

หมายเหตุ* ค่าคงที่ตามค่าที่ดีที่สุดจากการทดลองการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไพโรแกลอลของแต่ละกรณี

4.2.5 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสในวัสดุประกอบแต่งไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนเงิน

การออกแบบการทดลองนี้จะออกแบบการทดลองแบบ box-behnken จากโปรแกรม minitab โดยมีความเข้มข้นของตัวแปรที่จะศึกษาทั้งหมด 3 ตัวแปร และแต่ละตัวแปรแบ่งออกเป็น 3 ระดับดังตารางที่ 4.2 จากนั้นนำสภาวะที่ออกแบบได้ทุกสภาวะไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีหัวข้อ 4.2.3 แล้วนำผลการทดลองที่ได้นี้ไปวิเคราะห์สถิติการทดลองด้วยโปรแกรม minitab เพื่อหาแบบจำลองที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถแสดงความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะต่อความเข้มข้นของไคโตซาน ความเข้มข้นของเอนไซม์ และความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงิน โดยแบบจำลองที่ได้นั้นจะนำมาใช้วิเคราะห์พื้นผิวผลตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการออกแบบการทดลองนี้

ตารางที่ 4.2 แสดงตัวแปรและระดับของตัวแปร

ความเข้มข้นของตัวแปร	ระดับของตัวแปร		
	ต่ำ	กลาง	สูง
เอนไซม์ (มิลลิกรัม./มิลลิลิตร)	0.05	0.1	0.15
ไคโตซาน (%น้ำหนัก/ปริมาตร)	0.5	1.0	1.5
อนุภาคนาโนเงิน (นาโนโมล่าร์)	0.4×10^{-2}	0.8×10^{-2}	1.2×10^{-2}

4.2.6 ศึกษาลักษณะทางกายภาพของวัสดุประกอบแต่งที่สภาวะเหมาะสม

เตรียมวัสดุประกอบแต่งที่สภาวะเหมาะสมที่ได้จากหัวข้อ 4.2.5 แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เพื่อดูลักษณะรูปร่างและขนาดของอนุภาคนาโนเงินและการกระจายตัวของอนุภาคนาโนเงินภายในวัสดุประกอบแต่ง

4.2.7 ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปในวัสดุประกอบแต่งที่สภาวะเหมาะสม

4.2.7.1 <u>เสถียรภาพการนำกลับมาใช้ใหม่ของเอนไซม์</u>

เตรียมเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสตรึงรูปที่สภาวะเหมาะสมที่ได้จากหัวข้อ 4.2.5 แล้วทำการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ (ตามหัวข้อ 4.2.3) จากนั้นจึงทำการกรองเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จากการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาในครั้งแรกด้วยตะแกรงลวดเหล็กขนาดละเอียด แล้วทำการล้างผลิตภัณฑ์บางส่วนที่เหลือติดค้างอยู่ที่แผ่นฟิล์มด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6 เป็นจำนวน 1 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปใช้ทดสอบการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ซ้ำต่อไปอีกทันทีจนกว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าต่ำกว่า 0.1 จึงหยุดการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์

4.2.7.2 <u>เสถียรภาพการเก็บรักษาของเอนไซม์</u>

เตรียมเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสตรึงรูปที่สภาวะเหมาะสมที่ได้จากหัวข้อ 4.2.5 จากนั้นทำการเก็บเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน ในระหว่างการเก็บรักษาจะทำการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ (ตามหัวข้อ 4.2.3) ทุกๆ สัปดาห์