บทที่ 4

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

4.1 เคมีภัณฑ์

(±) เมนทอล (C_2H_5OH) และ เฮกซิลอะซิเตต ($CH_3CO_2(CH_2)_5CH_3$) มีความบริสุทธิ์ 99 % (-)เมนทิลอะซิเตต ($C_{12}H_{22}O_2$) มีความบริสุทธิ์ 98 % จากบริษัท Aldrich chemicals company

ไอโซออกเทน (C_8H_{18}) มีความบริสุทธิ์ระดับห้องปฏิบัติการ จากบริษัท Ajax chemicals

โปตัชเชียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) มีความบริสุทธิ์ 99.5 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) มีความบริสุทธิ์ระดับห้องปฏิบัติการ จากบริษัท Merck

ไดโปตัชเชียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) มีความบริสุทธิ์ 99 % จากบริษัท Fluka

ไลเปสจาก Candida cylindracea (triacylglycerol acylhydrolase , EC 3.1.1.3) จากบริษัท Aldrich chemicals company

เรซินที่ใช้เป็นตัวพยุง เป็นเรซินแลกเปลี่ยนประจุลบ (weakly basic anion exchange resin) จากบริษัท Dow chemicals

4.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

-แกส-โครมาโตกราฟี รุ่น 7AG จากบริษัท Shimadzu , Japan

-สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น 220A จากบริษัท Hithachi , Japan

-เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง จากบริษัท Denver Instrument Company , USA

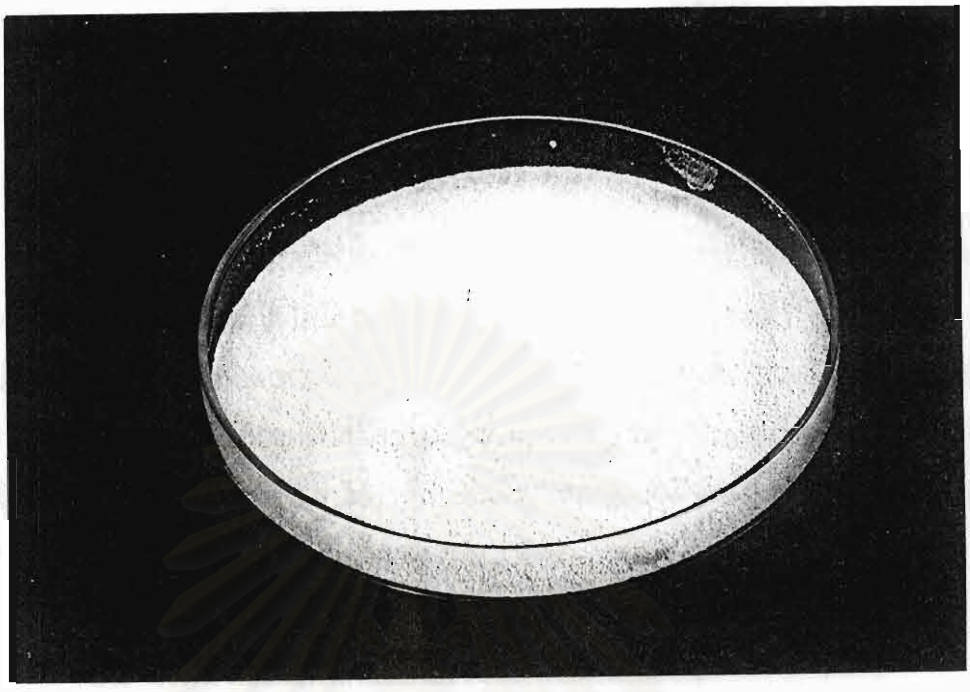
–เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก จากบริษัท Gesells chaft Fur Laborechnik , Germany

-ตู้อบสูญญากาศ จากบริษัท Samplatec , Japan

-เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

-หอปฏิกรณ์แบบแพคเบด (packed bed column)

-ปั๊มแบบเพอร์ริสตอลติก (peristaltic pump) รุ่น 505 U จากบริษัท Watson Marlow



รูปที่ 4.1 แสดงภาพถ่ายลักษณะรูปร่างของ เรซินแลกเปลี่ยนประจุลบ Dowex MWA-1

รูปที่ 4.2 แสดงภาพถ่ายการตรึงเอนไซม์โดยทำการกวนในเครื่องกวนแบบแม่เหล็ก
(magnetic stirrer)

4.3 วิธีการทดลองเบื้องต้น

4.3.1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 7.0 โดยชั่งโปตัชเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) น้ำหนัก 9.96 กรัม และชั่งไดโปตัชเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) น้ำหนัก 12.63 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรน้อยกว่า 1 ลิตรเล็กน้อย ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายด้วย 6.0 โมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือ 6.0 โมลาร์ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จนได้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 จึงเติมน้ำกลั่นต่อจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร

4.3.2 การตรึงเอนไซม์ไลเปสบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปสเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม นำเรซิน Dowex MWA-1จำนวน 5 กรัม ผสมลงไปนำไปทำการกวนในเครื่องกวนแบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารผสมที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองให้เหลือแต่เม็ดเรซิน จากนั้นจึงนำไปใส่ในตู้อบสูญญากาศเพื่อระเหยเอาความชื้นออกจนน้ำหนักเรซินคงที่จึงนำออกมาใช้งานในการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นต่อไป

4.3.3 การศึกษาปฏิกิริยา ทรานเอสเทอริฟิเคชั่น

ในการแยก(-)เมนทอลออกจากเรซิมิกเมนทอลทำได้โดยการใช้ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น ระหว่างเรซิมิกเมนทอลกับเฮกซิลอะซิเตต และใช้เอนไซม์ไลเปสที่ทำการตรึงรูปที่สภาวะที่เหมาะสมแล้วมาเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยา โดยผสม เรซิมิกเมนทอลที่มีความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์กับเฮกซิลอะซิเตตที่มีความเข้มข้น 380 มิลลิโมลาร์ลงในไอโซออกเทนซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปเขย่าในเครื่องเขย่า (Incubator shaker) ที่ความเร็วรอบ 270 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 ชั่วโมงโดยทำการเก็บสารตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง แกส-โครมาโตกราฟี

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (the coefficient of the variation) ของผลการทดลองที่ได้จากการทำการทดลองที่สภาวะเดียวกันซ้ำกันสามชุดการทดลองมีค่าเท่ากับ ± 13%

4.4 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

4.4.1 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์

ทำการตรึงรูปเอนไซม์ตามวิธีในข้อ4.3.2แต่แปรเปลี่ยนเวลาในการตรึงเอนไซม์โดยใช้เวลาในการตรึง 1, 3, 5, 9, 15 และ 24 ชั่วโมงตามชั่วโมง หาความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่เหลืออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์หลังจากนั้นนำเอนไซม์ที่ตรึงรูปแล้วที่เวลาต่างๆไปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น ตามวิธีในข้อ 4.3.3 นำข้อมูลจากผลการทดลองมาพิจารณาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะโดยเลือกเวลาที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์จากค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะสูงสุด

4.4.2 การศึกษาหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์

ทำการตรึงรูปเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.3.2 แต่แปรเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมตั้งแต่ 5, 6, 7, 8 , 9 และ 10 หน่วย หาความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่เหลืออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ หลังจากนั้นนำเอนไซม์ที่ตรึงรูปแล้วไปเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นตามวิธีในข้อ 4.3.3 นำข้อมูลจากผลการทดลองมาพิจารณาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ โดยเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์จากค่าที่ให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะสูงสุด

4.4.3 การศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมในการตรึงรูป

ทำการตรึงรูปเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.3.2 แต่แปรเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสในสารละลายบัฟเฟอร์ ตั้งแต่ 1, 3, 5, 9, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร หาค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่เหลืออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ หลังจากนั้นจึงนำเอนไซม์ที่ตรึงรูปแล้ว ไปเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นตามวิธี4.3.3 นำข้อมูลจากผลการทดลองมาพิจารณาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะโดยเลือกค่าความเข้มข้นไลเปสที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์จากค่าที่ให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะสูงสุด

4.5 การศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

4.5.1 การศึกษาผลกระทบของความเร็วรอบต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ

นำเอนไซม์ที่ตรึงรูปแล้วที่สภาวะที่เหมาะสมตามวิธีในข้อ 4.4 ไปเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นตามวิธีในข้อ 4.3.3 แต่แปรเปลี่ยนอัตราในการเขย่าตั้งแต่ 240, 260, 270, 280 และ 290 รอบต่อนาที แล้วทำการวัดผลอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะที่ด้วยวิธีวัดความเร็วเริ่มต้น (initial rate method)

4.5.2 การศึกษาหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

นำเอนไซม์ที่ตรึงรูปแล้วที่สภาวะที่เหมาะสมตามวิธีในข้อ 4.4 ไปเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นตามวิธีในข้อ 4.3.3 แต่จะแปรเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของเรชิมิกเมนทอล และ ค่าความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตต โดยใช้ความเข้มข้นของเรชิมิกเมนทอล ตั้งแต่ 20, 40 , 60 , 80 และ100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และใช้ความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตต ตั้งแต่ 20,140 , 260 , 380 และ500 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลเพื่อหารูปแบบกลไกการทำงานของเอนไซม์ที่เหมาะสม และหาค่าคงที่ต่างๆ ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูปต่อไป

4.6 การศึกษาการเรโซลูชั่นเมนทอลเรซิมิกในหอปฏิกรณ์แบบแพคเบด

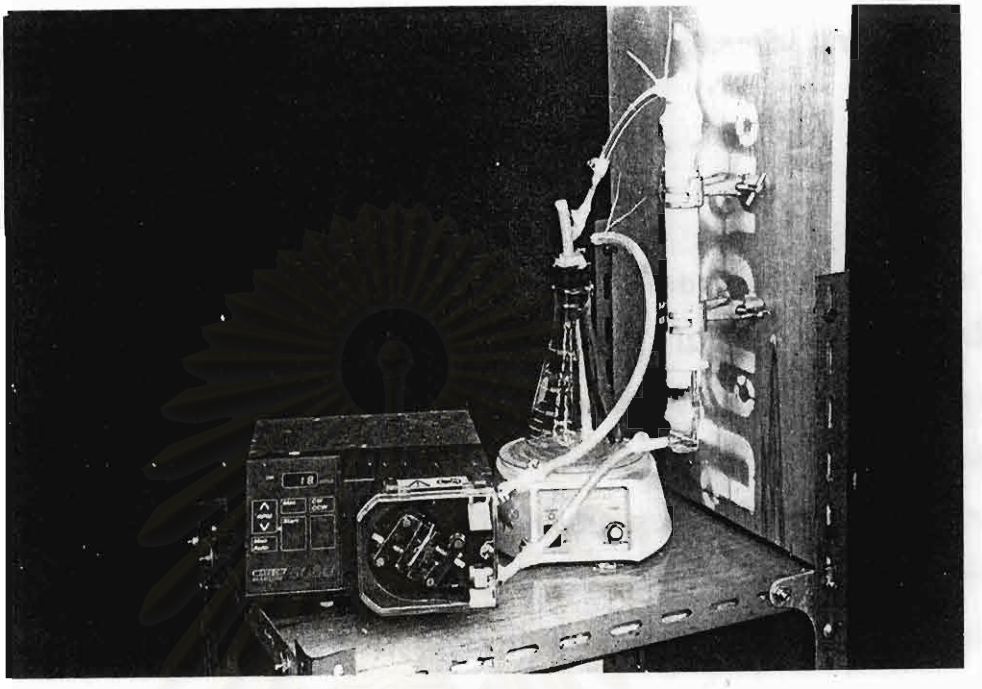
นำเอนไซม์ตรึงรูปที่สภาวะเหมาะสมจำนวน 60 กรัมมาบรรจุลงในหอปฏิกรณ์แบบแพคเบด ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2.7 เซนติเมตร และมีความสูงเท่ากับ 22.0 เซนติเมตร จากนั้นป้อนสารละลายสับเสตรท (เรซิมิกเมนทอล กับ เฮกซิลอะซิเตต) เข้าทางด้านล่างของหอปฏิกรณ์ ควบคุมอัตราการไหลด้วยเพอริสตอลติกปั๊ม แล้วทำการเก็บสารตัวอย่างเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยทำการวิเคราะห์โดยเครื่องแกส-โครมาโตกราฟี

4.6.1 การศึกษาผลกระทบของอัตราการไหลของสับเสตรทในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด

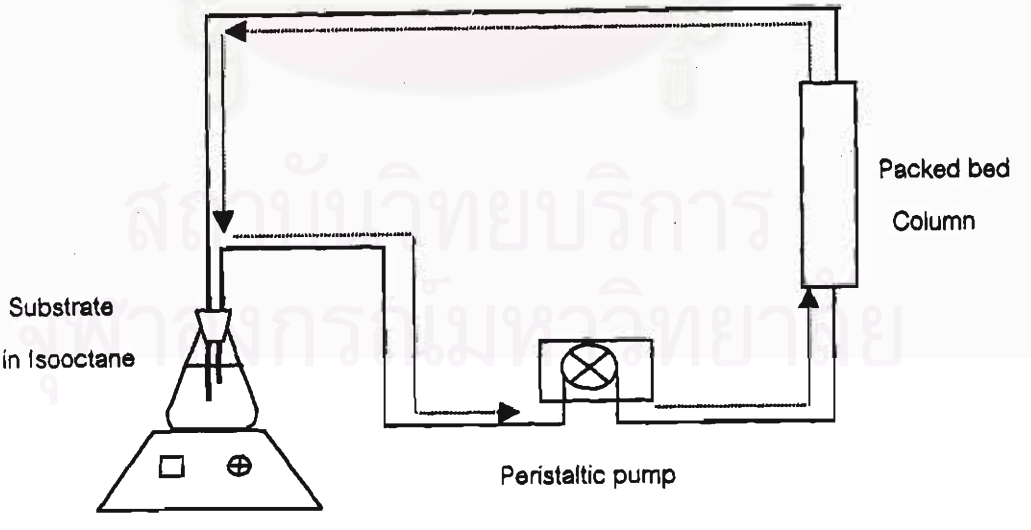
ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 4.6 แต่แปรเปลี่ยนค่าอัตราการไหลของสารละลายสับเสตรทที่เข้าสู่หอปฏิกรณ์แบบแพคเบดเท่ากับ 40 , 70 , 100 และ130 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ เก็บสารตัวอย่างตามช่วงเวลาที่เหมาะสม เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่อง แกส-โครมาโตกราฟี

4.6.2 การศึกษาเสถียรภาพในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปในหอปฏิกรณ์แพคเบด

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 4.6 โดยใช้อัตราการไหลที่เหมาะสมจากข้อ 4.6.1 แล้วทำการเก็บสารตัวอย่างตามช่วงเวลาที่เหมาะสม หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนสับเสตรทใหม่ทุกๆ 2 วัน ทำการเก็บสารตัวอย่างตามช่วงเวลาที่เหมาะสม เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่องแกส-โครมาโตกราฟี ทำการทดลองเช่นนี้ไปจนถึงวันที่ 10 จึงหยุดการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 4.3 แสดงภาพถ่ายของหอปฏิกรณ์แบบแพคเบด ที่บรรจุเรซินที่ตรึงรูปด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea ในระหว่างกระบวนการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 4.4 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของหอปฏิกรณ์แบบแพคเบด และทิศทางการไหลของสารละลายสับเสตรท

4.7 การวิเคราะห์

ในการดำเนินงานวิจัยนี้มีวิธีวิเคราะห์ผลการทดลองโดยเครื่องมือวิเคราะห์ 2 ชนิด คือ

4.7.1 การวิเคราะห์โดยใช้แกส-โครมาโตกราฟี

การวิเคราะห์โดยใช้แกส-โครมาโตกราฟีทำได้โดยเก็บสารตัวอย่างประมาณ 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงฉีดสารตัวอย่างจำนวน 1 ไมโครลิตร เข้าไปในเครื่องแกส-โครมาโตรกราฟี (Shimudzu รุ่น7AG) ต่อเข้ากับเครื่องบันทึกข้อมูล (integrator Shimudzu รุ่น14R) โดยมีดีเทคเตอร์ (detector) แบบเฟรมไอโอไนส์ดีเทคเตอร์ (FID = flame ionization detector) คอลัมน์ที่ใช้เป็นแบบสเตนเลส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.3 มิลลิเมตร ยาว 2 เมตร บรรจุด้วย FFAD 10% Chromosorb ใช้ไนโตรเจนเป็นเฟสตัวพา (carrier phase) เข้าไปในคอลัมน์ โดยใช้อัตราการไหลของไนโตรเจนเป็น 45 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิภายในตู้อบ (oven) , ดีเทคเตอร์ (detector) และอินเจคเตอร์ (injector) ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 150, 220 และ220 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (the coefficient of the variation) ของผลการทดลองวิเคราะห์ซ้ำห้าครั้งเป็น ± 9.71%

4.7.2 การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

ในงานวิจัยนี้ใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Hitachi รุ่น 220A) ในการหาความเข้มข้นของไลเปสในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยใช้หลักการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 210 นาโนเมตร ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (the coefficient of the variation) ของผลการทดลองวิเคราะห์ซ้ำสี่ครั้งเป็น ± 2.06%