บทที่ 2
วิธีวิจัย

สารเคมี

น้ำทิ้งการลอกกาวรังไหม (Cocoon cooking wastewater)

รังไหม (*Bombyx mori*) ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรสาสตร์ ทำการแยกรังไหมและตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ทำการลอกกาวเซอริซินออกจากรังไหม โดยผสมรังไหมที่ตัดแล้ว 25 กรัมกับเอนไซม์โบรมีเลน (Bromelain) 2 g ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำน้ำลอกกาวรังไหมที่ได้ไปเหวี่ยงที่ 10,733xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกของแข็งแขวนลอยออกไป นำสารละลายใสที่ได้ (200 cm^3) ไปศึกษาหาสมรรถนะของเมมเบรนที่เตรียมได้เพื่อนำเซอริซินกลับคืนมา

สารเคมีสำหรับใช้เตรียมเมมเบรน

- Polysulfone: พอลิเมอร์ที่ใช้เตรียมเมมเบรน (PSF, $\overline{M}_n$ = 22,000 Da) (Analytical reagent grade, Aldrich)
- Polyethylene glycol: สารเติมแต่ง (PEG) ($\overline{M}_n$ = 300, 2000, 4600 and 10,000 Da, Analytical reagent grade, Aldrich)
- Polyoxymethylene-*co*-polyoxyethylene: สารเติมแต่ง (PDXL) ($\overline{M}_n$= 10,000 and 200,000 Da, Nippon Shokubai, Japan)
- N-methyl-pyrrolidone: ตัวทำละลาย (NMP, 99.5% purity) (Analytical reagent grade, Aldrich)
- Deionized water: ตัวทำละลายที่ไม่ละลายพอลิเมอร์ (purified with Millipore system, Millipore, France)

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

- 30% Acrylamide/N,N'-methylenebis acrylamide solution, 19: 1 (AR grade, Bio-Rad Laboratory Inc., German)
- Ammonium persulfate (Reagent grade, Amersham Life Science, UK)
- Bromophenolblue (AR grade, Merck, Germany)
- Sodium dodecyl sulfate, SDS (AR grade, Bio Basic Inc., Canada)

- N,N,N',N'-tetramethylene diamine, TEMED (AR grade, Pharmacia Biotech, Sweden)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris (Molecular Biology Grade, Pacific Science, USA.)

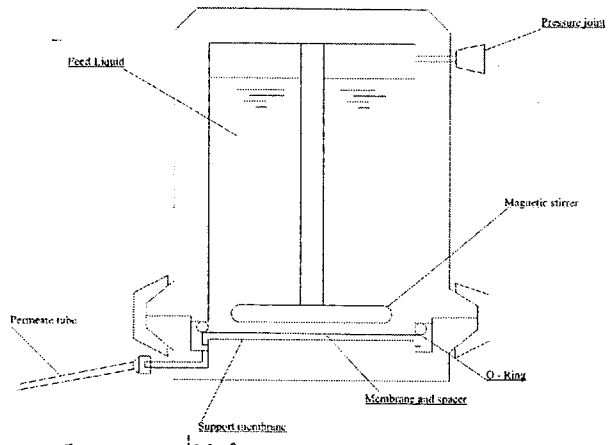
สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry

- Bovine serum albumin, BSA (AR Grade, Fluka, Switzerland)
- Sodium carbonate (AR Grade, Vol Chem, Italy)
- Sodium hydroxide (AR Grade, Merck, Germany)
- Copper sulfate, $CuSO_4.5H_2O$ (ACS-For Analysis, Carlo Erba, Italy)
- Potassium sodium tartrate (AR Grade, Ajax Finechem, Australia)
- Folin-Ciocalteau's phenol reagent (AR Grade, Carlo Erba, Italy)

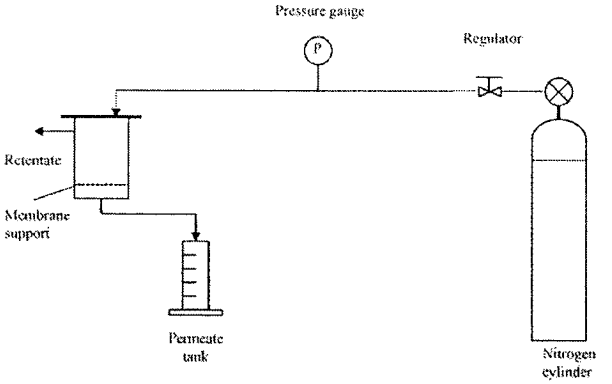
เครื่องมือ

- Membrane test cell (Nitto Denko Corporation, Japan)

เซลล์ที่ใช้ตรวจสอบสมรรถนะฟลักซ์ของเมมเบรนที่เตรียมได้คือ RO/UF flat sheet stainless steel membrane test cell (รูปที่ 1) มีปริมาตรสูงสุด = 380 ml วางแผ่นเมมเบรนที่ตัดเป็นทรงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง = 0.09 m (effective area of 0.0064 m^2) ระหว่างแผ่น base support ที่อยู่ภายในเซลล์ทำการเก็บสารละลายที่ซึมผ่าน (Permeate) ที่ด้านล่างของเซลล์ โดยใช้ความดันจากถังไนโตรเจนเป็นตัวควบคุมความดันส่งผ่านเมมเบรน (200, 300 และ 400 kPa) (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 เซลล์เมมเบรนที่ใช้ศึกษาสมรรถนะของเมมเบรนในโครงการนี้



รูปที่ 2 แผนภาพการศึกษาสมรรถนะของเมมเบรน

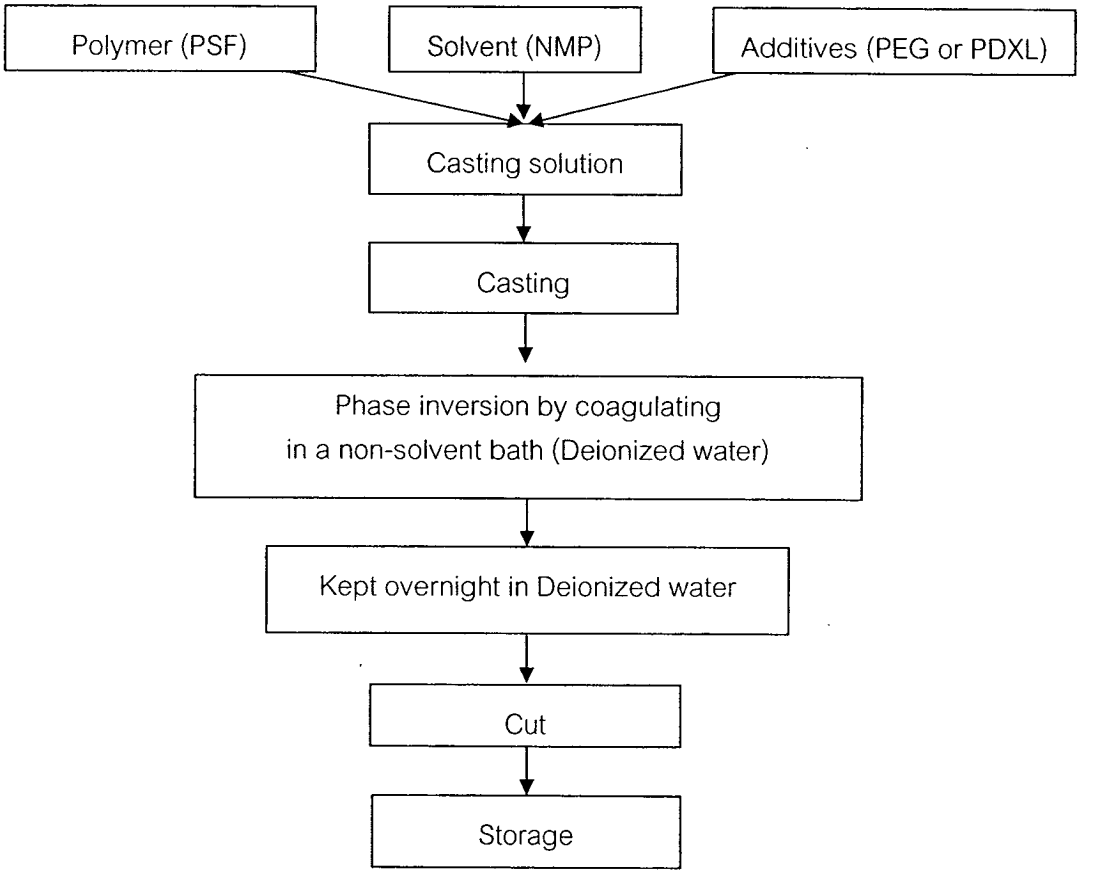
- Hotplate/stirrer (IKAMAG, IKA-Labortechnik, Malaysia)
- UV/Visible spectrophotometer (Perkin Elmer, USA)
- Scanning electron microscopy (SEM) (Electron Microscopy Ltd, Cambridge, England)
- Infinite focus microscopy (IFM) (Hi-Tech Instruments Sdn. Bhd., Alicona, Australia).
- Electrophoresis equipment
- Power supply (E-C Apparatus Corp., USA)
- Centrifuge (Hermle Z323 Labortechnik, Germany)
- Autopipette (Pipetteman, Gilson, France)

วิธีวิจัย

การเตรียมเมมเบรน (Membrane preparation)

ทำการเตรียมแผ่นเมมเบรนด้วยการละลายพอลิซัลโฟน (PSF) 12 wt% กับตัวทำละลาย NMP 83 wt% หรือ 86 wt% ที่อุณหภูมิห้อง (~25°C) ความชื้นสัมพัทธ์ 72% นำสารละลายที่ได้มาผสมสารเติมแต่ง PEG มีน้ำหนักโมเลกุล 300, 2000, 4600 และ 10,000 Da หรือ PDXL 10,000 Da และ 200,000 Da 2 wt% หรือ 5 wt% (รูปที่ 3 และตารางที่ 2) กวนสารละลายโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสารละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ให้ตั้งทิ้งไว้โดยไม่ให้ถูกกระทบกระเทือนเป็นเวลาอีก 24 ชั่วโมง นำสารละลายมาขึ้นรูปเป็นแผ่นบาง ๆ บนแผ่นกระจก (0.10m × 0.10m) โดยใช้แท่งแก้วคนให้แผ่นเมมเบรนมีความหนาประมาณ 0.26 mm ค่อย ๆ จุ่มแผ่นกระจกที่มีแผ่นฟิลม์บาง ๆ ของ

สารละลายเคลือบอยู่ลงในถังที่มีน้ำที่ปราศจากไอออนบรรจุอยู่ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายที่ไปละลาย NMP ออกจาก PSF ทำให้ PSF ผกผันจากสารละลายเป็นแผ่นเมมเบรน โดยให้อุณหภูมิของถังน้ำอยู่ที่อุณหภูมิห้อง และ 70°C สำหรับสารละลายที่มี PEG และ PDXL เป็นสารเติมแต่ง ตามลำดับ ทำการล้างแผ่นเมมเบรนที่เตรียมได้ด้วยน้ำปราศจากไอออนเพื่อชะล้างสารเติมแต่งที่อาจจะยังหลงเหลืออยู่ และแช่แผ่นเมมเบรนไว้ในน้ำปราศจากไอออนหนึ่งคืน นำแผ่นเมมเบรนมาตัดให้มีขนาด 0.09 m เพื่อนำไปศึกษาสัณฐานวิทยาและทดสอบสมรรถนะของเมมเบรนต่อไป



รูปที่ 3 ขั้นตอนการเตรียมเมมเบรน

สัณฐานวิทยาและสมรรถนะของเมมเบรน

นำเมมเบรนที่เตรียมได้ไปทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy (SEM) ศึกษาฟลักซ์ซึมผ่านของเมมเบรน และนำ permeate ที่ได้จากการกรองน้ำทิ้งการลอกกาวไหมไปทดสอบหาปริมาณโปรตีนเซอริซินด้วยวิธี Lowry และทดสอบความสามารถในการกักโปรตีนและความสามารถในการกักของแข็งของเมมเบรนเปรียบเทียบจากตัวอย่างน้ำลอกกาวก่อนและหลังผ่านเมมเบรน อีกทั้งยังทดสอบสมบัติความเป็นเยื่อเลือกผ่านของเมมเบรนโดยนำตัวอย่างน้ำลอกกาวไปหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE อีกด้วย

ตารางที่ 2 สัดส่วนของสารละลายผสมที่ใช้เตรียมเมมเบรน

No.	Membrane	(wt%)							
		PSF	NMP	PEG 300	PEG 2000	PEG 4600	PEG 10,000	PDXL 10,000	PDXL 200,000
PSF	PSF	12	88	-	-	-	-	-	-
PSF1	PEG300-2	12	86	2	-	-	-	-	-
PSF2	PEG2000-2	12	86	-	2	-	-	-	-
PSF3	PEG4600-2	12	86	-	-	2	-	-	-
PSF4	PEG10,000-2	12	86	-	-	-	2	-	-
PSF5	PDXL10,000-2	12	86	-	-	-	-	2	-
PSF6	PDXL200,000-2	12	86	-	-	-	-	-	2
PSF7	PEG300-5	12	83	5	-	-	-	-	-
PSF8	PEG2000-5	12	83	-	5	-	-	-	-
PSF9	PEG4600-5	12	83	-	-	5	-	-	-
PSF10	PEG10,000-5	12	83	-	-	-	5	-	-
PSF11	PDXL10,000-5	12	83	-	-	-	-	5	-
PSF12	PDXL200,000-5	12	83	-	-	-	-	-	5

ฟลักซ์ซึมผ่าน (Permeate flux, PF)

ทำการตรวจสอบสมรรถนะของเมมเบรนโดยการนำเซอริซินกลับคืนมาจากน้ำลอกกาวรังไหมในรูปของฟลักซ์ซึมผ่านที่ความดันส่งผ่านเมมเบรน (transmembrane pressure) 200, 300 and 400 kPa คำนวณฟลักซ์ซึมจากสมการดังนี้: $J_w = Q/A\Delta T$ โดย J_W คือฟลักซ์ซึมผ่าน (permeate flux, l m^{-2} h^{-1}), Q คือปริมาตรของสารซึมผ่าน (volume of permeate, l), A คือ พื้นที่ของเมมเบรน (effective membrane area, m^2) และ ΔT คือเวลาที่ใช้เก็บสารซึมผ่าน (sampling time, h)

วิธีวิเคราะห์ (Analytical methods)

วิเคราะห์หาโปรตีนในน้ำทิ้งกาวลอกรังไหมในสารละลายก่อนผ่านเมมเบรน (Feed) และหลังการซึมผ่านเมมเบรน (Permeate) ด้วยเครื่อง UV–Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 nm (Lowry *et al.*, 1951) คำนวณหาเปอร์เซนต์โปรตีนที่กักได้ (Percentage of protein retention) ดังนี้: $protein\ retention(\%) = \left(C_f - C_p / C_f\right)x100$; โดย C_f and C_p คือความเข้มข้นของน้ำทิ้งกาวลอกรังไหมก่อนผ่านเมมเบรน และหลังการผ่านเมมเบรน ตามลำดับ มีหน่วยเป็น mg l^{-1}

วิเคราะห์การคัดแยกขนาดตามน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight cut-off, MWCO) ของเซอริซินด้วยเทคนิค SDS-PAGE