

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัย เรื่อง การตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดยางพาราสำหรับการย่อยสลายไขมันในน้ำทิ้ง ใช้กระบวนการวิจัยเชิงทดลอง (Quantitative) ดำเนินการศึกษาวิธีการการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก เมล็ดยางพารา จากนั้นนำมาทดลองหาการทำงานของเอนไซม์ ผู้วิจัยได้กำหนดรายละเอียดเกี่ยวกับ วิธีการดำเนินการวิจัยตามลำดับขั้นตอน ดังนี้

- 3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
- 3.2 วิธีการวิจัย
- 3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 1) ถ้วย Crucible ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร
- 2) โกร่งบดยา(Motar)
- 3) เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) Mettler Toledo , AG204 , Switzerland
- 4) ตู้อบลมความร้อน
- 5) เตาเผา (muffle furnace)
- 6) ตะแกรงร่อนขนาด 63-106 ไมครอน
- 7) เครื่องวัด pH
- 8) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
- 9) ตู้ดูดควัน
- 10) ผ้าขาวบาง
- 11) หลอดฉีดยา
- 12) กระดาษกรอง
- 13) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (High speed micro refrigerated centrifuge)
- 14) เครื่องแก้ว (Glassware)

3.1.2 สารเคมี

- 1) น้ำมันปาล์ม
- 2) เฮกเซน AR grade, Merck , Germany

3) กรดซัลฟูริก(Sulfuric acid; H_2SO_4 97 เปอร์เซ็นต์) ; AR grad , Mercke , Germany

4) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide ; NaOH) AR grade

5) โมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

6) ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

7) เอทานอล

8) อะซิโตน

9) ฟีนอล์ฟทาลีน

3.2 วิธีการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

3.2.1 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอิสระจากเมล็ดยางพารา

3.2.2 การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจินต ซี้ไธ์แคลบ และ เซลลูโลสที่มีรูพรุน และ ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

3.2.3 ศึกษาการใช้เอนไซม์ตรึงรูปเพื่อทดสอบการสลายไขมันในน้ำทิ้งตัวอย่าง

3.2.4 พัฒนาบรรจุภัณฑ์เอนไซม์ที่ตรึงรูป

โดยแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

3.2.1 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอิสระจากการสกัดเอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดยางพารา

3.2.1.1 การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

1) การสกัดเอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดยางพารา

นำเฉพาะเนื้อในของเมล็ดมาสับเป็นชิ้นเล็กๆ บดให้ละเอียดซึ่งเมล็ดยางพาราที่บดแล้วมา 100 กรัมใส่ในภาชนะแก้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4, 5 ,6 ,7 ,8 ,9 ปริมาตร 200 mL กวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แช่ทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน นำมากรองแยกด้วยผ้าขาวบางจะได้ส่วนสกัดจากเมล็ดยางพาราและกาก นำส่วนสกัดที่ได้นำไปกวนต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนกากนำมาสกัดซ้ำด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4,5,6,7,8,9 ปริมาตร 200 mL เก็บไว้ในตู้เย็นทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้ทั้ง 2 ส่วนมารวมกันแล้วนำส่วนไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบเป็นเวลา 30 นาที จะได้ส่วนสกัดที่แยกชั้นเป็น 3 ชั้นได้แก่ ชั้นไขมัน

ชั้นน้ำ และตะกอน นำส่วนสกัดในชั้นน้ำที่ได้เก็บในขวดเก็บตัวอย่างแล้วนำไปแช่ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2) การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่ pH 4-9

นำสารสกัดหยาบของเอนไซม์ที่ได้จากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4 มา 1 g เติมน้ำมันปาล์ม 5 g เฮกเซน 2.5 mL นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเติม เอทานอล : อะซิโตน อัตราส่วน 1:1 v/v ปริมาตร 10 mL หยดฟีนอล์ฟทาไลน์ 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.01 M จนกว่าสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูแล้วจึงนำปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่ใช้คำนวณหาปริมาณกรดไขมันอิสระ ทำซ้ำทั้งหมดแต่เปลี่ยนเป็นสารสกัดหยาบของเอนไซม์ที่ได้จากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5 ,6 ,7 , 8 และ 9

3.2.1.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

นำส่วนสกัดหยาบของเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH ที่เหมาะสมที่ได้ผลมาจากข้อ 3.2.1.1 มา 1 g เติมน้ำมันปาล์ม 5 g เฮกเซน 2.5 mL นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเติม 1:1 ของเอทานอล:อะซิโตน ปริมาตร 10 ml หยดฟีนอล์ฟทาไลน์ 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.01 M จนกว่าสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูแล้วจึงนำปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่ใช้ไปคำนวณหาปริมาณกรดไขมันอิสระ ทำซ้ำทั้งหมดแต่เปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้เป็น 40°C, 50°C, 60°C, 70°C และ 80°C

3.2.2 การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจินต ซี้เถ้าแคลบ และ เซลลูโลสที่มีรูพรุนซึ่งผลิตขึ้นเอง และ ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูป

3.2.2.1 การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจินต

ผสมเอนไซม์ไลเปสที่สกัดได้ลงในสารละลายโซเดียมอัลจินตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอัตราส่วนเอนไซม์ไลเปสต่ออัลจินต เป็น 1:1 กวนให้เข้ากัน จากนั้นเติม CaCl_2 ปริมาตร 0.15 mL นำไปกวน เป็นเวลา 1 ชั่วโมงทิ้งไว้ไม่น้อยกว่า 8 ชั่วโมงจะได้เอนไซม์ที่ถูกตรึง แล้วทำการแยกเอนไซม์ที่ตรึงโดยการทิ้งไว้ให้แยกชั้นจะได้เป็น 2 ส่วนคือส่วนที่เป็นน้ำอยู่ด้านบน และส่วนที่เป็นเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ด้านล่างเมื่อทำการแยกเรียบร้อยแล้วจึงนำไปศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ

3.2.2.2 การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยเซลลูโลสที่มีรูพรุน

ผสมเอนไซม์ไลเปสที่สกัดได้ลงในสารละลายเซลลูโลสที่มีรูพรุน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอัตราส่วนเอนไซม์ไลเปสต่อเซลลูโลสที่มีรูพรุน เป็น 1:1 กวนให้เข้ากัน จากนั้นเติม CaCl_2 ปริมาตร 0.15 mL นำไปกวน เป็นเวลา 1 ชั่วโมงทิ้งไว้ไม่น้อยกว่า 8 ชั่วโมงจะได้เอนไซม์ที่ถูกตรึง แล้วทำการแยกเอนไซม์ที่ตรึงโดยการทิ้งไว้ให้แยกชั้นจะได้เป็น 2 ส่วนคือส่วนที่เป็นน้ำอยู่ด้านบน และส่วนที่เป็นเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ด้านล่างเมื่อทำการแยกเรียบร้อยแล้วจึงนำไปศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ

3.2.2.3 การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยซี้เถ้าแกลบ

1) การเตรียมซี้เถ้าแกลบ

นำแกลบที่ผ่านการเผาให้เป็นถ่านแล้ว ใส่ด้วยกระเบื้อง (evaporating dish) ประมาณ 7 กรัม นำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บดให้เป็นผงโดยใช้โกร้งบดยา นำไปร่อนผ่านตะแกรงร่อน เก็บซี้เถ้าแกลบที่มีอนุภาคระหว่าง 63-106 ไมครอน (230-140 mesh) ซังซี้เถ้าแกลบที่เตรียมได้ 4 กรัม เติม 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดซัลฟูริกจำนวน 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง กรองด้วยตะแกรงสแตนเลสละเอียด ล้างซี้เถ้าแกลบด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน จนน้ำล้างมีพีเอชเป็นกลางและนำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ซังซี้เถ้าแกลบมา 1 g เติมเฮกเซน 2.5 mL เขย่าให้เข้ากันใช้หลอดฉีดยาดูดส่วนสกัดหยาบของเอนไซม์ที่สกัดจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มา 1 g ค่อยๆ หยดเอนไซม์ลงในซี้เถ้าที่แขวนลอยอยู่ในเฮกเซน เขย่าให้เข้ากันประมาณ 2 นาที แล้วจึงนำไปศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ

3.2.2.4 ศึกษาผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูป

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจินต ซี้เถ้าแกลบ และ เซลลูโลสที่มีรูพรุนแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ระดับพีเอชต่างๆ คือ 4 5 6 7 8 และ 9 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์เช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปสอิสระที่สกัดจากเมล็ดยางพารา

3.2.2.5 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูป

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปด้วยอัลจินต ซี้เถ้าแกลบ และ เซลลูโลสที่มีรูพรุนแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 และนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

วิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์เช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปสอิสระที่สกัดจากเมล็ดยางพารา ทำซ้ำทั้งหมด แต่เปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้เป็น 30°C ,40°C, 50°C , 60°C, 70°C และ 80°C

3.2.3 ศึกษาการใช้เอนไซม์ตรึงรูปเพื่อทดสอบการสลายไขมันในน้ำทิ้งตัวอย่าง

เป็นศึกษาการใช้เอนไซม์ตรึงรูปด้วยซี้ถั่วแกลบเพื่อทดสอบการสลายไขมันในน้ำทิ้งตัวอย่าง โดยกำหนดให้น้ำทิ้งเป็นน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปนเปื้อน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กากถั่ว 95 มิลลิลิตร น้ำมันปาล์ม 5 มิลลิลิตร การทดลองเป็นการศึกษาปริมาณการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยซี้ถั่วแกลบที่เตรียมได้ในขั้นตอนที่ 3.2.2.3 ในการย่อยน้ำมัน ประกอบด้วย 14 สิ่งทดลอง 3 ซ้ำ ได้แก่ น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปนเปื้อน 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมเอนไซม์ให้มีความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่เติมเอนไซม์และน้ำมันปาล์ม 100 เปอร์เซ็นต์ไม่เติมเอนไซม์นำไปเขย่าด้วยเครื่อง incubator shaker ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วไทเทรตหาความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ

3.2.4 พัฒนาบรรจุภัณฑ์เอนไซม์ที่ตรึงรูป

เป็นการพัฒนาบรรจุภัณฑ์เอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยซี้ถั่วแกลบซึ่งเอนไซม์จะอยู่สภาพที่อยู่ในสารละลายเฮกเซน บรรจุภัณฑ์ที่ใช้จึงเป็นขวด 3 แบบ คือ ขวดพลาสติก ขวดแก้วใส และขวดแก้วสีชา เพื่อให้ได้บรรจุภัณฑ์ที่สามารถรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ให้สามารถคงตัวได้มากที่สุด ทำการทดลองโดยนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยซี้ถั่วแกลบที่เตรียมได้ในขั้นตอนที่ 3.2.2.3 บรรจุในขวดทั้ง 3 แบบ ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน นำมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์ทุกวัน โดยนำเอนไซม์ตรึงรูปมา 1 g เติมน้ำมันปาล์ม 5 g เฮกเซน นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเติม เอทานอล : อะซิโตน อัตราส่วน 1:1 v/v ปริมาตร 10 mL หยดฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.01 M จนกว่าสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู นำปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่ใช้คำนวณหาปริมาณกรดไขมันอิสระ นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ที่บรรจุในขวดทั้ง 3 แบบเพื่อให้ได้บรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมที่สุด

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงทดลอง ดังรายละเอียดต่อไปนี้

- 1) การวิเคราะห์ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอิสระจากเมล็ด

ยางพารา

- 2) การวิเคราะห์ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอิสระจากเมล็ด

ยางพารา

- 3) การวิเคราะห์ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจินตซีไ้ถ้าเกลบ และ เซลลูโลสที่มีรูพรุน
- 4) การวิเคราะห์ผลอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจินตซีไ้ถ้าเกลบ และ เซลลูโลสที่มีรูพรุนซึ่งผลิตขึ้นเอง
- 5) การวิเคราะห์การใช้เอนไซม์ตรึงรูปเพื่อทดสอบการสลายไขมันในน้ำทิ้งตัวอย่าง
- 6) การวิเคราะห์การพัฒนาบรรจุภัณฑ์เอนไซม์ที่ตรึงรูป