

บทที่ 4

ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาเรื่องการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดยางพาราสำหรับการย่อยสลายไขมันในน้ำทิ้งใช้การวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) ผลการวิจัยแสดงดังหัวข้อต่อไปนี้

4.1 ผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอิสระจากเมล็ดยางพารา

4.2 ผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจินต ซี้เก้แอลบ และ เซลลูโลสที่มีรูพรุน และ ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

4.3 ผลการศึกษาการใช้เอนไซม์ตรึงรูปเพื่อทดสอบการสลายไขมันในน้ำทิ้งตัวอย่าง

4.4 ผลการพัฒนาระบบจุลินทรีย์เอนไซม์ที่ตรึงรูป

ผลการวิจัยมีรายละเอียดดังนี้

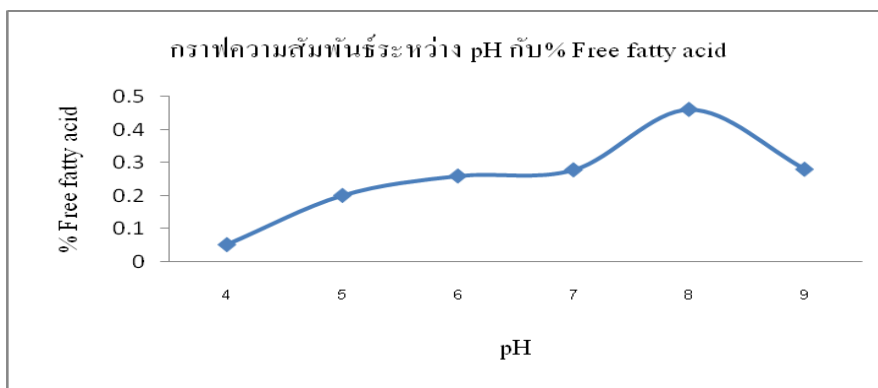
4.1 ผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอิสระจากเมล็ดยางพารา

4.1.1 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอิสระที่ได้จากการสกัดเอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดยางพารา

ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอิสระ เมื่อสกัดเอนไซม์เอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดยางพาราด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 4-9 แล้วนำมาหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการสลายน้ำมันปาล์ม แสดงดังตารางที่ 4.1 และ ภาพประกอบที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอิสระที่ได้จากการสกัดจากเมล็ดยางพารา

pH	Free Fatty Acid (%FFA)
4	0.0525
5	0.2008
6	0.2594
7	0.2781
8	0.4602
9	0.2797



ภาพประกอบที่ 4.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับ % Free fatty acid

จากตารางที่ 4.1 และภาพประกอบที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากเมล็ดยางพารา สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 8 และแนวโน้มการทำงานของเอนไซม์ที่ pH ต่ำที่การทำงานของเอนไซม์จะต่ำ สาเหตุอาจเกิดจากในสภาวะที่เป็นกรด จะมีผลต่อโครงรูปของเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนเปลี่ยนไป มีผลทำให้บริเวณเร่งของเอนไซม์เปลี่ยนแปลง ไม่สามารถจับกับสารตั้งต้นได้ ดังนั้นจึงไม่เกิดกระบวนการสลายน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นสารตั้งต้นให้ได้กรดไขมันอิสระ ทำให้ปริมาณกรดไขมันอิสระลดลงเมื่อ pH ลดลง และเมื่อ pH เพิ่มขึ้น สามารถอธิบายได้ เช่นเดียวกับในสภาวะที่เป็นกรด เพราะความเป็น กรด-เบส จะมีผลต่อปริมาณของไอออนซึ่งจะมีผลต่อโครงสร้างธรรมชาติของเอนไซม์ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์

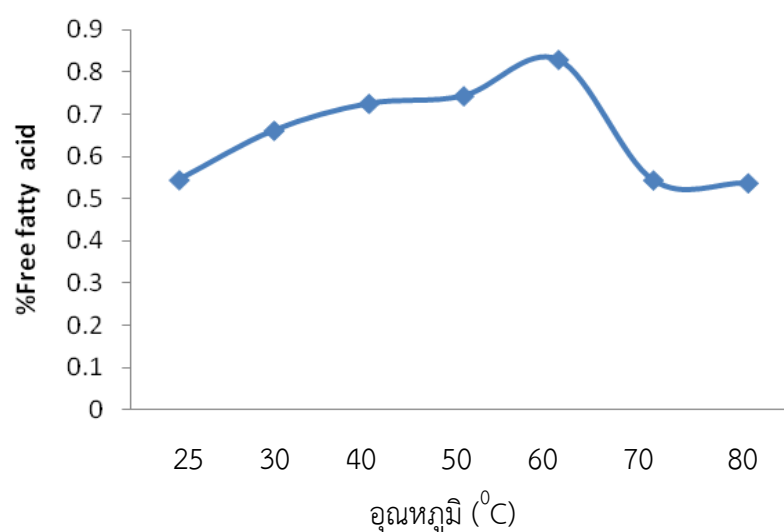
4.1.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอิสระที่ได้จากการสกัดจากเมล็ด

ยางพารา

เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดยางพาราที่สกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ซึ่งเป็น pH ที่ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด มาศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 °C ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการสลายน้ำมันปาล์มด้วยเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.2 และภาพประกอบที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอิสระที่ได้จากการสกัดเอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดยางพารา

อุณหภูมิ	% Free fatty acid
อุณหภูมิห้อง	0.5448
30 ° C	0.6616
40 ° C	0.7253
50° C	0.7434
60 ° C	0.8291
70 ° C	0.5443
80 ° C	0.5375



ภาพประกอบที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิต่อ % Free fatty acid ของเอนไซม์อิสระ

จากตารางที่ 4.2 และภาพประกอบที่ 4.2 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสที่สกัดได้จากเมล็ดยางพาราด้วยฟอสเฟตบัฟเฟต pH 8 มาศึกษาการทำงานที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า ปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการสลายตัวของน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิ 60 °C เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดและในช่วงที่เพิ่มอุณหภูมิการทำงานของเอนไซม์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิจะเป็นการเพิ่มพลังงานให้กับเอนไซม์และสารตั้งต้นให้อยู่ในสภาวะกระตุ้นเร็วขึ้น ทำให้โมเลกุลของเอนไซม์กับสารตั้งต้นเข้ามาอยู่ใกล้กันและเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ผลิตภัณฑ์เร็วขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิสูงมากกว่า 60 องศา

เซลล์เยื่อ การทำงานของเอนไซม์จะลดลงทั้งนี้เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิมากเกินไป จะมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ (denature) จะทำให้บริเวณเร่งของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับสารตั้งต้นได้ ดังนั้นจึงไม่เกิดกระบวนการสลายน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นสารตั้งต้นให้ได้ กรดไขมันอิสระทำให้ผลของ ปริมาณกรดไขมันอิสระลดลงที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส

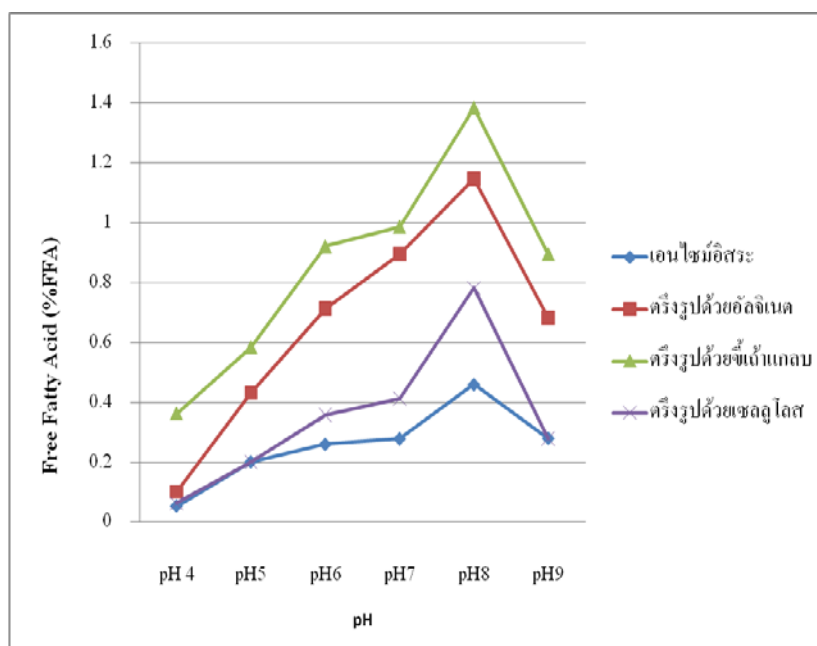
4.2 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจินต ซี๊ถั่วแกลบ และ เซลลูโลสที่มีรูปพรุน

4.2.1 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจินต ซี๊ถั่วแกลบ และ เซลลูโลสที่มีรูปพรุน

เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปด้วยอัลจินต ซี๊ถั่วแกลบ และ เซลลูโลสที่มีรูปพรุนแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ระดับพีเอชต่างๆ คือ 4 5 6 7 8 และ 9 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์เช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปสอิสระที่สกัดจากเมล็ดงาขาวโดยแสดงผลในรูปของปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการสลายน้ำมันปาล์มจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปแสดงดังตารางที่ 4.3 และภาพประกอบที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจินต ซี๊ถั่วแกลบ และ เซลลูโลสที่มีรูปพรุนซึ่งผลิตขึ้นเอง

pH	Free Fatty Acid (%FFA)			
	เอนไซม์อิสระ	เอนไซม์ตรึงรูปด้วยอัลจินต	เอนไซม์ตรึงรูปด้วยซี๊ถั่วแกลบ	เอนไซม์ตรึงรูปด้วยเซลลูโลส
4	0.0525	0.1012	0.3621	0.0623
5	0.2008	0.4321	0.5834	0.2008
6	0.2594	0.7124	0.9213	0.3574
7	0.2781	0.8960	0.9865	0.4131
8	0.4602	1.1476	1.3852	0.7816
9	0.2797	0.6821	0.8954	0.2797



ภาพประกอบที่ 4.3 กราฟแสดงผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเครื่องรูปด้วยอัลจินเต ไข่ไก่ และ เซลลูโลสที่มีรูปพรุน

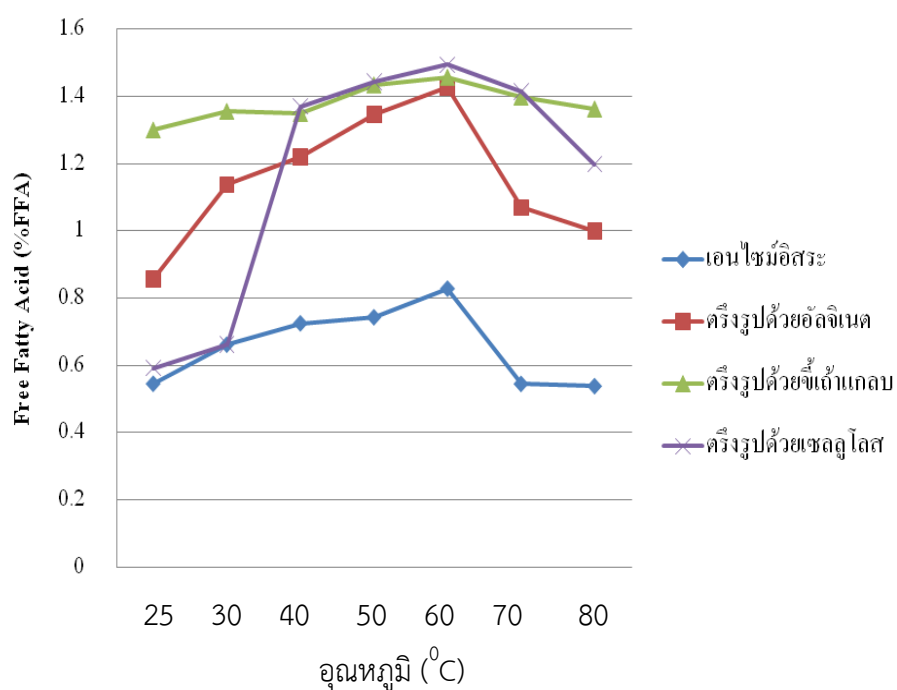
จากตารางที่ 4.3 และภาพประกอบที่ 4.3 พบว่า pH ที่เอนไซม์อิสระและเอนไซม์เครื่องรูป ทำงานได้ดีที่สุด เป็น pH เดียวกัน คือที่ pH 8 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากเมล็ด ยางพาราไม่ว่าจะใช้ในรูปของเอนไซม์อิสระหรือเครื่องรูปจะทำงานได้ดีที่ pH 8 แต่เมื่อพิจารณา เอนไซม์ที่เครื่องรูปด้วยวัสดุแตกต่างกันพบว่าเอนไซม์ทำงานได้แตกต่างกันทั้งนี้เนื่องจาก วัสดุที่มี โครงสร้างที่ต่างกันทำให้สามารถจับกับเอนไซม์ได้แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อปริมาณของเอนไซม์ที่ถูก ตรีงมีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งทั้งหมดก็จะส่งผลโดยตรงต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ด้วย ซึ่งในการ ทดลองในครั้งนี้เอนไซม์ที่เครื่องรูปด้วยอัลจินเตส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุด

4.2.2 ผลอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเครื่องรูปด้วยอัลจินเต ไข่ไก่ และ เซลลูโลสที่มีรูปพรุน

เมื่อนำเอนไซม์ที่ถูกเครื่องรูปด้วยอัลจินเต ไข่ไก่ และ เซลลูโลสที่มีรูปพรุนแช่ใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 และนำไปแช่ที่อุณหภูมิห้อง 30°C 40°C, 50°C , 60°C, 70°C และ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์เช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปส อิสระที่สกัดจากเมล็ดยางพารา โดยแสดงผลในรูปของปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการสลายน้ำมัน ปาล์มจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเครื่องรูปแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงผลอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่สร้างด้วยอัลจินเต ซี้้เถ้าแกลบ และ เซลลูโลสที่มีรูปพรุนซึ่งผลิตขึ้นเอง

อุณหภูมิ	Free Fatty Acid (%FFA)			
	เอนไซม์อิสระ	เอนไซม์ที่สร้างด้วยอัลจินเต	เอนไซม์ที่สร้างด้วยซี้้เถ้าแกลบ	เอนไซม์ที่สร้างด้วยเซลลูโลส
อุณหภูมิห้อง	0.5448	0.8573	1.3001	0.5922
30°C	0.6616	1.1376	1.3556	0.6627
40°C	0.7253	1.2199	1.3942	1.3704
50°C	0.7434	1.3463	1.4345	1.4438
60°C	0.8291	1.4269	1.4574	1.4945
70°C	0.5443	1.0699	1.3978	1.4156
80°C	0.5375	0.9988	1.3626	1.1986

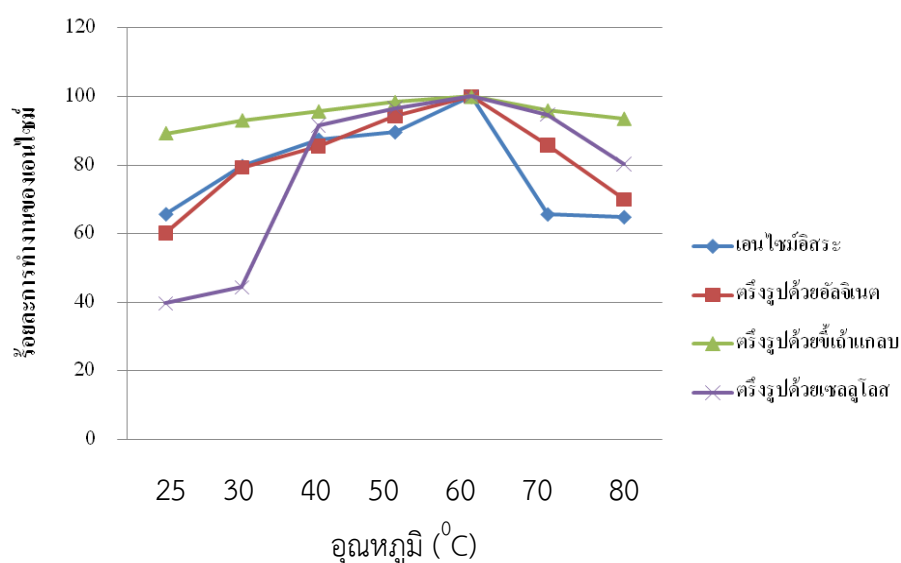


ภาพประกอบที่ 4.4 กราฟแสดงผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่สร้างด้วยอัลจินเต ซี้้เถ้าแกลบ และ เซลลูโลสที่มีรูปพรุน

ผลจากการวิเคราะห์จากตารางที่ 4.4 และภาพประกอบที่ 4.4 พบว่า อุณหภูมิที่เอนไซม์ อีสระและเอนไซม์ตรึงรูปทำงานได้ดีที่สุด คือที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แต่เพื่อหาว่าเมื่อตรึง เอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ มีผลต่อความคงทนต่ออุณหภูมิอย่างไร จึงนำผลการทดลองที่ได้มา คำนวณหาร้อยละการลดลงจากจุดที่มีแอกติวิตีสูงสุด แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ร้อยละการลดลงจากจุดที่มีแอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจินต ขี้เถ้า แกลบ และ เซลลูโลสที่มีรูปพรุน

อุณหภูมิ	ร้อยละการทำงานของเอนไซม์			
	เอนไซม์อีสระ	เอนไซม์ตรึงรูป ด้วยอัลจินต	เอนไซม์ตรึงรูป ด้วยขี้เถ้าแกลบ	เอนไซม์ตรึงรูป ด้วยเซลลูโลส
อุณหภูมิห้อง	65.71	60.08	89.20	39.63
30°C	79.79	79.72	93.01	44.34
40°C	87.48	85.49	95.66	91.61
50°C	89.66	94.35	98.42	96.61
60°C	100	100	100	100
70°C	65.65	85.80	95.91	94.72
80°C	64.83	69.99	93.50	80.20



ภาพประกอบที่ 4.5 กราฟแสดงร้อยละการลดลงจากจุดที่มีแอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจินต ขี้เถ้าแกลบ และ เซลลูโลสที่มีรูปพรุน

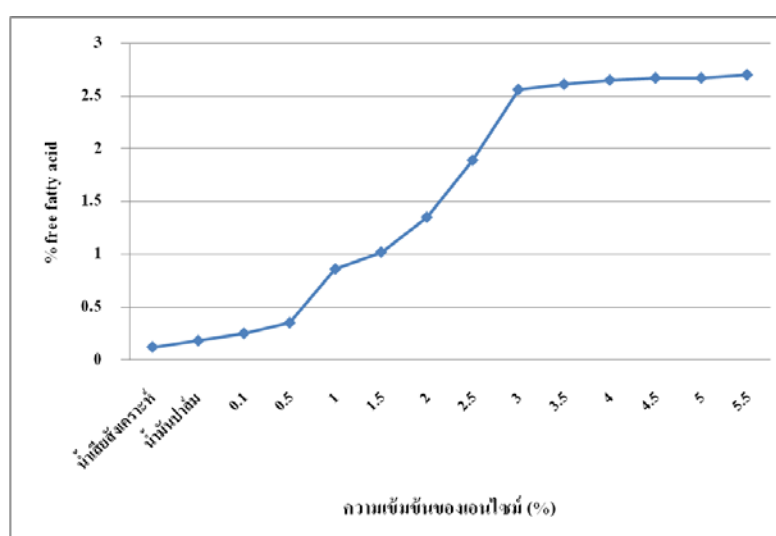
จากตารางที่ 4.5 และภาพประกอบที่ 4.5 พบว่า เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยวัสดุตรึงทุกชนิดที่ทำการศึกษามีการทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระก็พบว่าสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เช่นกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการลดลงของแอกติวิตีของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปมีการลดลงของแอกติวิตีน้อยกว่าเอนไซม์อิสระแสดงว่าเอนไซม์ตรึงรูปสามารถทนอุณหภูมิได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระสอดคล้องกับทฤษฎีที่กล่าวว่า เอนไซม์อิสระเมื่อนำมาตรึงรูปด้วยวัสดุต่างๆ มีโอกาสเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่าเมื่อตรึงเอนไซม์ด้วยวัสดุตรึงที่แตกต่างกันก็มีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ด้วย ซึ่งจากการทดลอง พบว่า เอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปด้วยซีเถ้าแอลบมีผลทำให้ร้อยละแอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงแอกติวิตีน้อยกว่าวัสดุตรึงชนิดอื่น อาจเนื่องมาจากคุณลักษณะเฉพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยา (lipase activity) ได้ดีที่บริเวณผิวสัมผัสของน้ำมันกับน้ำ (interface) แม้ว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะเกิดขึ้นกับสับสเตรทที่ละลายในน้ำในการเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีปริมาณน้ำจำกัด ทำให้เอนไซม์ ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ (Thermal stability) เช่น Zaks และ Klivanov (1988) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก Porcine pancreas สามารถทำงานได้นานหลายชั่วโมงที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในเฮกเซนที่มีน้ำอยู่น้อยมาก เนื่องจากหมู่ที่มีประจุของเอนไซม์เกิดพันธะไฮโดรเจนกันเอง ทำให้เอนไซม์ยังคงรูปร่างที่มีความแข็งแรง (structure rigidity) สามารถใช้เร่งปฏิกิริยาได้ต่อไป ดังนั้นในการทดลองเพื่อใช้เอนไซม์ในการบำบัดน้ำเสียจะเลือกใช้เอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยซีเถ้าแอลบ ซึ่งจะมีข้อดีคือ วัสดุตรึงหาง่าย มีราคาถูกและเตรียมได้ง่าย

4.3 ผลการศึกษาการใช้เอนไซม์ตรึงรูปเพื่อทดสอบการสลายไขมันในน้ำทิ้งตัวอย่าง

เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยซีเถ้าแอลบที่เตรียมได้ในขั้นตอนที่ 3.2.2.3 เพื่อย่อยสลายน้ำมัน ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปนเปื้อน 5 เปอร์เซ็นต์ ในสถานะที่มีเอนไซม์เข้มข้น 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 เปรียบเทียบกับน้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่เติมเอนไซม์และน้ำมันปาล์ม 100 เปอร์เซ็นต์ไม่เติมเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6 และภาพประกอบที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยน้ำมัน ในน้ำเสียสังเคราะห์ของเอนไซม์
 โครงรูปที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%)	%FFA
น้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่เติมเอนไซม์	0.12
น้ำมันปาล์ม 100 เปอร์เซ็นต์ไม่เติมเอนไซม์	0.18
0.1	0.25
0.5	0.35
1.0	0.86
1.5	1.02
2.0	1.35
2.5	1.89
3.0	2.56
3.5	2.61
4.0	2.65
4.5	2.67
5.0	2.67
5.5	2.70



ภาพประกอบที่ 4.6 แสดงแนวโน้มการทำงานของเอนไซม์โครงสร้าง ที่ความเข้มข้นต่างๆ

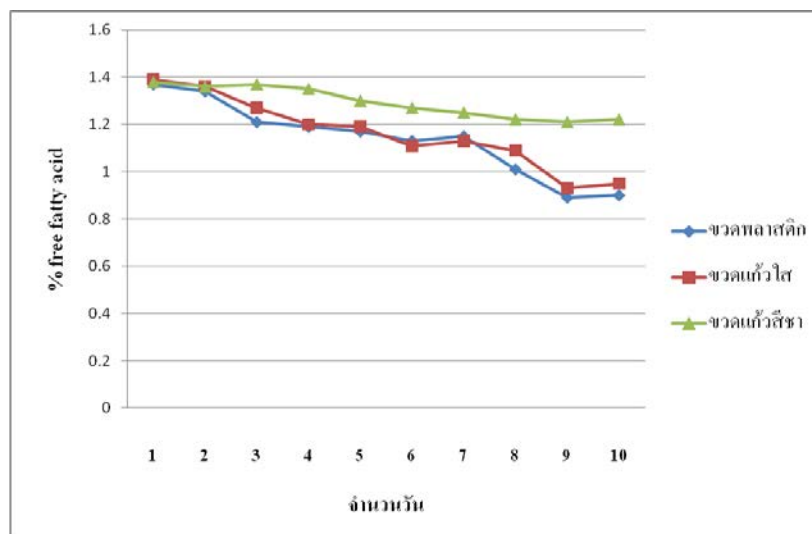
จากตารางที่ 4.6 และภาพประกอบที่ 4.6 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ตรึงรูปในช่วงเริ่มต้นการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นในช่วง 3.0-5.5 การทำงานของเอนไซม์เริ่มคงที่ แสดงว่าวิธีการเติมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เตรียมได้เพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันในน้ำเสียที่มีน้ำมันปนเปื้อน 5 เปอร์เซ็นต์ ควรเติมปริมาณเอนไซม์ให้ได้ 3.0 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำเสีย

4.4 ผลการพัฒนาบรรจุภัณฑ์เอนไซม์ที่ตรึงรูป

เมื่อบรรจุภัณฑ์เอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยซีเมนต์เคลือบซึ่งเอนไซม์จะอยู่สภาพที่อยู่ในสารละลายเฮกเซนด้วยขวด 3 แบบ คือ ขวดพลาสติก ขวดแก้วใส และขวดแก้วสีชา นำไปทดลองเพื่อหาความสามารถในการรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยซีเมนต์เคลือบที่เตรียมได้ในขั้นตอนที่ 3.2.2.3 บรรจุในขวดทั้ง 3 แบบ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน แต่ละวันนำมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 การทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยซีเมนต์เคลือบบรรจุภัณฑ์ด้วยขวด 3 แบบ

วันที่	Free Fatty Acid (%FFA)		
	ขวดพลาสติก	ขวดแก้วใส	ขวดแก้วสีชา
1	1.37	1.39	1.38
2	1.34	1.36	1.36
3	1.21	1.27	1.37
4	1.19	1.20	1.35
5	1.17	1.19	1.30
6	1.13	1.11	1.27
7	1.15	1.13	1.25
8	1.01	1.09	1.22
9	0.89	0.93	1.21
10	0.90	0.95	1.22



ภาพประกอบที่ 4.7 กราฟแสดงการทำงานของเอนไซม์ตรีงรูปด้วยซีเถ้ากลบบรรจุภัณฑ์
ด้วยขวด 3 แบบ

จากตารางที่ 4.7 และภาพประกอบที่ 4.7 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ตรีงรูปโดยใช้บรรจุภัณฑ์ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด พบว่า การทำงานของเอนไซม์ตรีงรูปที่บรรจุในขวดพลาสติกและขวดแก้วใสมีค่าใกล้เคียงกันแต่น้อยกว่าการทำงานของเอนไซม์ที่บรรจุในขวดแก้วสีชา ทั้งนี้เนื่องจากพลาสติกสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนได้ทำให้เอนไซม์ส่วนหนึ่งไม่สามารถเกิดการทำงานได้ส่วนบรรจุภัณฑ์ที่เป็นขวดแก้วใสสามารถรับแสงได้มากกว่าทำให้เกิดอุณหภูมิสูงมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ซึ่งมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่บรรจุในขวดแก้วสีชา