อิทธิพลของจุลผลึกเซลลูโลสและการเตรียมไคโตซานที่มีต่อตัวรองรับและกิจกรรมของเอนไซม์

Influences of Microcrystalline Cellulose and Preparations of Supports Made of Chitosan on the Support Property and Enzymatic Activity

นางสาวชนานันท์ วิมลกิตติรักษ์ 50550599

นายพงศกร เตชะศรีสุขโข 50551977

ผศ.ดร.นันทิยา หาญศุภลักษณ์

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี. คณะวิศวกรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โทร. 02-9428555 ต่อ 1203 และ1204 โทรสาร 02-5614621 E-mail: fengnyh@ku.ac.th

บทคัดย่อ

โครงงานนี้ศึกษาอิทธิพลของปริมาณจุลผลึกเซลลูโลส (A) เวลาที่ใช้ในการกระตุ้นตัวรองรับด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (B) และเทคนิคการเชื่อมขวางตัวรองรับ(แบบพันธะโคเวเลนต์และพันธะไอออนิก) ที่มีต่อความแข็งแรงของตัวรองรับและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรึงรูปบนตัวรองรับนั้น โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Central Composite Inscribed Design ในการหาสภาวะที่ดีที่สุดและใช้ two-level factorial หาผลกระทบของปัจจัยเหล่านั้นที่มีต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูป การทดลองได้แสดงให้เห็นว่าการเตรียมตัวรองรับด้วยพันธะโคเวเลนต์จะทำให้ได้ปริมาณตัวรองรับที่ผ่านเกณฑ์ (ไม่ร้าว ไม่แตก ไม่บิ่น ไม่บุบ) สูงกว่าการเตรียมด้วยพันธะไอออนิก โดยพบว่า B เท่านั้นที่ส่งผลต่อปริมาณตัวรองรับที่ผ่านเกณฑ์เมื่อเตรียมด้วยพันธะไอออนิก และเฉพาะอิทธิพลร่วม A*B ที่ส่งผลกระทบสำหรับการเตรียมด้วยพันธะโคเวเลนต์ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเตรียมด้วยพันธะไอออนิก พบว่าสภาวะที่ให้เปอร์เซ็นต์ตัวรองรับผ่านเกณฑ์มากที่สุด คือ A =0.03 กรัม และB=180 นาที (ได้มาก90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณตัวรองรับที่ใช้ทดสอบ) แต่ไม่พบสภาวะที่ให้เปอร์เซ็นต์ตัวรองรับสูงที่สุดเมื่อเตรียมด้วยพันธะโคเวเลนต์ โดยพบว่าช่วง A และB ที่ศึกษานี้ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ตัวรองรับที่ผ่านเกณฑ์ใกล้เคียงกันมาก (97.5-100 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ยังพบด้วยว่าการเตรียมด้วยพันธะโคเวเลนต์นี้จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปที่สูงกว่าการเตรียมด้วยพันธะไอออนิกถึง 10 เท่า ที่สภาวะการทดสอบเดียวกัน โดย A และอิทธิพลร่วม A*B เท่านั้นที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวรองรับที่เชื่อมขวางด้วยพันธะโคเวเลนต์ และเฉพาะ B ส่งผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปเมื่อใช้พันธะไอออนิกเตรียมตัวรองรับ

คำสำคัญ ไคโตซาน จุลผลึกเซลลูโลส Central Composite Inscribed Designค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูป two-level factorial

Abstract

Influences of the amount of microcrystalline cellulose (A), the activated time of the support by glutaraldehyde (B), and the type of chitosan crosslinking (covalent VS ionic crosslink) on the support and enzymatic activityd were investigated by using the Central Composite Inscribed Designand two-level factorial. The latter was used to determined the effects of those factors on immobilized enzyme activity. The results show that using covalent method to prepare support yields higher percent of residual supports (not broken, not cracked, and not dented) than using the ionic method. It is also found that only B mainly affects the percent of residual supports prepared by using the ionic method, while the A*B interaction does for the supports prepared by using covalent method at 95% confidential level. The optimum conditions for preparing supports using the ionic are A = 0.03 g and B = 180 minutes, yielding the percentage of supporter qualified as high as 90%. In contrast, no such optimum conditions were found because in the studied A and B ranges, the percentages of residual supports prepared by using the covalent are between 97.5-100%. In addition, the enzyme immobilized on the supports prepared by covalent method shows activity 10 times greater than that on the supports prepared by the ionic. At 95% confidential level, the activity of enzyme immobilized on the covalent-prepared support is influenced by A and the A*B interaction, while that for the ionic-prepared support is by B.

Keywords: chitosanmicrocrystalline cellulose Central Composite InscribedDesignenzymatic activity were investigated two-level factorial

1. บทนำ

ไคโตซาน (β-(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในด้านอุตสาหกรรมการบรรจุอาหาร ด้านการเกษตร ด้านเส้นใยและสิ่งทอ ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม เป็นต้น นอกจากนี้ไคโตซานยังมีคุณสมบัติที่ดี เช่น มีความเหนียว มีความยืดหยุ่น มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Goncalves et al., 2005; Azeredo et al., 2009) ไคโตซานจะละลายในกรดอินทรีย์ สามารถนำมาทำเป็นตัวรองรับเอนไซม์ได้ โดยอาจทำให้อยู่ในรูปของเม็ดกลมขนาดเล็ก (ระดับมิลลิเมตร) ซึ่งเอนไซม์คือตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ เช่น โปรติเอสใช้เร่งปฏิกิริยาการตัดสายโซ่โปรตีน หรือไลเปสใช้เร่งปฏิกิริยาการตัดสายโซ่ไขมัน (Altun and Cetinus, 2005) เป็นต้น โดยเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา เอนไซม์ยังสามารถใช้เร่งปฏิกิริยาได้อีก แต่เนื่องจากมีขนาดเล็กจึงสูญเสียไปกับผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการตรึงเอนไซม์บนตัวรองรับขนาดใหญ่จะทำให้สามารถนำเอนไซม์นั้นกลับมาใช้งานใหม่ได้อีก จนกระทั่งค่ากิจกรรม (activity) หรือความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดต่ำลงมาก ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้มาก (Biro et al., 2007)

อย่างไรก็ตามการใช้ตัวรองรับเอนไซม์ที่ทำจากไคโตซานเป็นเพียงอย่างเดียวจะมีข้อจำกัดในการใช้งาน เพราะมีคุณสมบัติเชิงกลต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับตัวรองรับที่ทำจากพอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ (Azeredo et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นๆที่พบว่าตัวรองรับที่ทำจากไคโตซานเพียงอย่างเดียว มีคุณสมบัติเชิงกลต่ำและไม่แข็งแรง (Xi and Wu, 2004; Almeida et al., 2010) และจากงานวิจัยของกลุ่ม ผศ.ดร. นันทิยา หาญศุภลักษณ์ พบว่าตัวรองรับที่เตรียมจากไคโตซานอย่างเดียวที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมนั้นไม่แข็งแรงนัก โดยเม็ดจะแตกได้ง่ายขณะทำการทดลองที่ต้องมีการเขย่าซึ่งส่งผลทำให้สูญเสียตัวรองรับโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าตัวรองรับนั้นมีการตรึงเอนไซม์แล้ว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องปรับปรุงสมบัติเชิงกลของตัวรองรับนี้ โดยพบว่าได้มีบทความที่กล่าวถึงการผสมไคโตซานกับจุลผลึกเซลลูโลส (Microcrystalline Cellulose) ที่สามารถช่วยเพิ่มคุณสมบัติเชิงกล (แรงดึง เปอร์เซ็นต์การดึงยืด โมดูลัสของยังค์) ของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้เพราะจุลผลึกเซลลูโลสสามารถผสมเข้ากันได้ดีกับไคโตซาน (Li et al., 2009)

เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่มาจากเส้นใยธรรมชาติ เป็นวัสดุที่สามารถนำมาใช้ใหม่ได้ สลายได้ทางชีวภาพ และมีการเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์อื่นเพื่อไปใช้กับงานอื่นๆได้ โดยเซลลูโลสที่ใช้ในการเสริมความแข็งแรงมีหลายชนิด เช่น จุลผลึกเซลลูโลส (ยี่ห้อทางการค้าคือ Avicel) เนื่องจากมีลักษณะเป็นเส้นใย และเป็นส่วนที่มีลักษณะเป็นผลึก ซึ่งสามารถทนกรดได้ (Gaden, 1976) นอกจากนี้ยังมีราคาถูกและน้ำหนักเบา (Azeredo et al., 2009)

ดังนั้นในโครงงานนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมตัวรองรับจากไคโตซานและจุลผลึกเซลลูโลส โดยได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่คาดว่ามีผลต่อความแข็งแรงของตัวรองรับ คือ ปริมาณจุลผลึกเซลลูโลสและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์แตกต่างกัน(การกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์เป็นการเติมหมู่ฟังก์ชันให้แก่ผิวของตัวรองรับ ทำให้สามารถเกิดพันธะโคเวเลนต์กับเอนไซม์ได้ ซึ่งเกิดจากหมู่อะมิโน (NH_2) ของไคโตซานเกาะกับหมู่แอลดีไฮด์ของกลูตารัลดีไฮด์) นอกจากนี้ยังศึกษาอิทธิพลของการเชื่อมขวางตัวรองรับแบบไอออนิกและโคเวเลนต์ด้วย ทั้งนี้จะออกแบบการทดลองด้วยวิธี Central Composite Inscribed Design (CCI) นอกจากนั้น ยังศึกษาอิทธิพลของปริมาณเซลลูโลสและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยเพราะส่งผลต่อการนำไปใช้งานอย่างมาก

2. วิธีการทดลอง

2.1 สารเคมีและวัสดุ

ไคโตซาน (Deacetylation degree = 90 ± 5%, MW~500 K) มีสมบัติคือ fine grade และมีขนาดไมครอน (ได้จากElan Corp. ประเทศไทย)Avicel pH 101 ได้จากFluka(ประเทศสหรัฐอเมริกา)สารเคมีอื่นๆ เช่น กรดอะซิติก โซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต โซเดียมไฮดรอกไซด์ กลูตารอลดีไฮด์อิพิคลอโรไฮดริน เป็นเกรดที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์

2.2 การเตรียมตัวรองรับที่เชื่อมขวางแบบพันธะโคเวเลนต์

ผสมไคโตซานลงในสารละลายกรดอะซิติกให้เข้ากันจากนั้นใช้หลอดเข็มฉีดยาดูดสารละลายไคโตซานแล้วหยดลงในภาชนะที่บรรจุสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ล้างเม็ดไคโตซานที่ได้ด้วยน้ำปราศจากประจุ (Deionized water) จากนั้นนำสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ อิพิคลอโรไฮดริน และเอทานอล ผสมในขวดรูปชมพู่ โดยคนด้วยแท่งแม่เหล็กให้เข้ากัน

นำเม็ดไคโตซานที่ได้จากการเตรียมในสารละลายข้างต้น และนำขวดรูปชมพู่ที่มีเม็ดไคโตซานใส่ลงในอ่างควบคุมอุณหหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และบันทึกจำนวนเม็ดไคโตซานหลังการคนที่ไม่แตก ไม่บิ่น ไม่ร้าว และไม่บุบ จากนั้นล้างเม็ดไคโตซานด้วยน้ำปราศจากประจุ กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และล้างด้วยน้ำปราศจากประจุ เก็บเม็ดไคโตซานไว้ในน้ำปราศจากประจุเพื่อรอการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์

<u>หมายเหตุ</u> เม็ดไคโตซานที่ผสมกับจุลผลึกเซลลูโลส (Avicel) จะเตรียมได้จากวิธีเดียวกันนี้ แต่เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของไคโตซานและเซลลูโลส

2.3 การเตรียมตัวรองรับที่เชื่อมขวางแบบพันธะไอออนิก

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับ 2.2 แต่จะหยดลงในภาชนะที่บรรจุสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟตตั้งทิ้งไว้ ล้างเม็ดไคโตซานด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 7และเก็บไว้ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างเพื่อรอการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์

<u>หมายเหตุ</u> เม็ดไคโตซานที่ผสมกับจุลผลึกเซลลูโลส (Avicel) จะเตรียมได้จากวิธีเดียวกันนี้ แต่เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของไคโตซานและเซลลูโลส

2.4 การกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์

แบ่งเม็ดไคโตซานจำนวน 3 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงในขวดรูปชมพู่ จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าจำนวนรอบ 220 รอบต่อนาทีโดยเขย่าครั้งละ 15 นาที พัก 5 นาที จนครบเวลาที่ต้องการให้เม็ดไคโตซานสัมผัสกับกลูตารัลดีไฮด์ และบันทึกจำนวนเม็ดที่ไม่แตก ไม่ร้าว ไม่บิ่น

2.5 การตรึงเอนไซม์

ผสมโปรติเอสจำนวน0.1 มิลลิลิตร กับฟอสเฟสบัฟเฟอร์ พีเอช7 ให้เข้ากัน ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเทสารละลายนี้ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีเม็ดบีดที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์แล้ว จากข้อ 2.4 แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ในตู้เย็น) จากนั้นกรองเม็ดไคโตซานที่ตรึงเอนไซม์แล้วด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 เก็บสารละลายที่ใช้ตรึงนี้ในขวดรูปชมพู่ เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ไม่ถูกตรึง ล้างเม็ดไคโตซานด้วยโซเดียมคลอไรด์ และล้างด้วยน้ำกลั่น ตามลำดับ จากนั้นเทฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ที่พีเอช7ลงไปพอให้ท่วมเม็ดไคโตซาน แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการใช้งานต่อไป (ก่อนการนำไปใช้ ให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องสักครู่ก่อน)

2.6 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรม

นำเม็ดไคโตซานที่ได้ตรึงเอนไซม์ เข้าทำปฏิกิริยากับเคซีนเอนไซม์อิสระที่ใช้วัดค่ากิจกรรมจะอยู่ในรูปของเหลว โดยการวัดค่ากิจกรรมแต่ละครั้ง จะทำซ้ำ 3ครั้ง

3. เครื่องมือที่ใช้ในการทำโครงงาน

MINITABversion 16, 30-day trialใช้ในการออกแบบการทดลองและประมวลผล

4. ผลการทดลองโครงงานและการวิจารณ์ผล

4.1 อิทธิพลของปริมาณเซลลูโลสและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ต่อความแข็งแรงของตัวรองรับด้วยวิธีพันธะไอออนิก

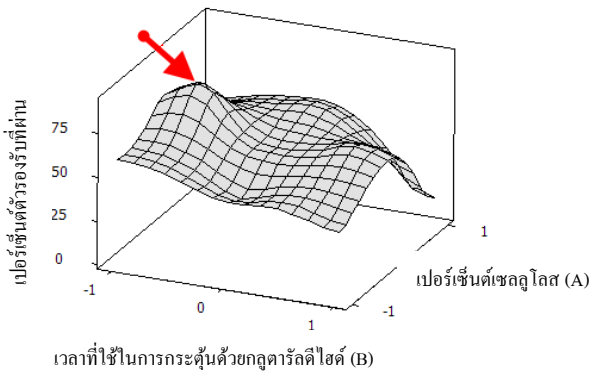
จากการออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี CCI จะต้องทำการทดลองทั้งหมด 39 การทดลอง (มีการทำซ้ำ 3 ครั้ง)เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีRespond surface จะได้ค่าต่างๆดังแสดงในตารางที่ 1 และได้กราฟความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์ตัวรองรับที่ผ่านกับปริมาณเซลลูโลสและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ แสดงในรูปที่1

จะเห็นว่าปัจจัย Bและ A*A มีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อความแข็งแรงของตัวรองรับที่เตรียมด้วยพันธะไอออนิก และจากค่าสัมปะสิทธิ์สามารถเขียนสมการได้ดังนี้

$$y = 22.9311 - 1.6215A - 5.8923B - 11.7440A^2 + 5.2564B^2 - 1.6667AB \quad (1)$$

ตารางที่ 1 ค่าสัมประสิทธิ์ P-value และt-value จากมินิแท็ปสำหรับพันธะไอออนิก

เทอม	Coef.	t-value	P-value
Constant	22.9311	14.263	0.000
A	-1.6215	-0.845	0.404
B	-5.8923	-3.072	0.004
A*A	-11.7440	-2.602	0.014
B*B	5.2564	1.164	0.253
A*B	-1.6667	-0.777	0.443



รูปที่ 1ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์ตัวรองรับที่ผ่านกับเปอร์เซ็นต์เซลลูโลสและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์(พันธะไอออนิก)

จากรูป จะเห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (เปอร์เซ็นต์ตัวรองรับที่ผ่านมากที่สุด) พบที่ระดับ A=0 หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นเซลลูโลสเท่ากับ 0.03กรัมและที่ระดับ B = -0.70399 หรือคิดเป็นเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์เท่ากับ 3 ชั่วโมง

4.2 อิทธิพลของปริมาณเซลลูโลสและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ต่อความแข็งแรงของตัวรองรับด้วยวิธีพันธะโคเวเลนต์

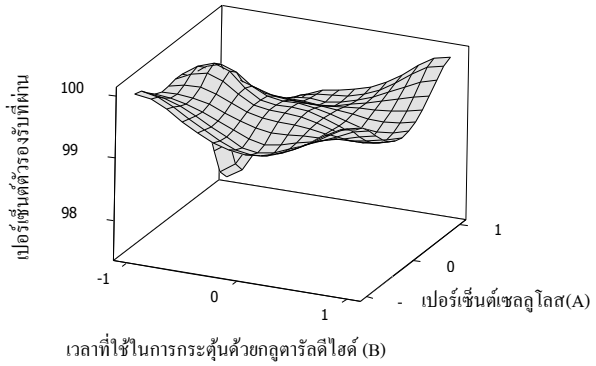
จะทำการทดลองทั้งหมด 39 การทดลอง (ทำซ้ำ 3ครั้ง)เช่นเดียวกันกับพันธะไอออนิกและจากการนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์จะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 และได้กราฟความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์ตัวรองรับที่ผ่านกับปริมาณเซลลูโลสและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ แสดงในรูปที่ 2

จะเห็นว่าปัจจัย A*B มีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อความแข็งแรงของตัวรองรับที่เตรียมด้วยพันธะโคเวเลนต์ และจากค่าสัมปะสิทธิ์สามารถเขียนสมการได้ดังนี้

$$y = 39.7851 - 0.20A + 0.1529B - 0.1873A^2 + 0.146B^2 + 0.25AB \quad (2)$$

ตารางที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์ ค่า P-value และค่า t-value จากมินิแท็ป สำหรับพันธะโคเวเลนต์

เทอม	Coef	t-value	P-value
Constant	39.7851	458.988	0.000
A	-0.2000	-1.934	0.062
B	0.1529	1.478	0.149
A*A	-0.1873	-0.770	0.447
B*B	0.1460	0.600	0.553
A*B	0.2500	2.162	0.038



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์ตัวรองรับที่ผ่านกับเปอร์เซ็นต์เซลลูโลสและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (พันธะโคเวเลนต์)

จากรูปที่ 2 จะเห็นว่า เปอร์เซ็นต์ของตัวรองรับที่ผ่านมีค่าใกล้กันมาก คือมีค่าอยู่ระหว่าง 97-100 เปอร์เซ็นต์ (คิดเป็น 39-40 เม็ด โดยจำนวนตัวรองรับเริ่มต้นคือ 40 เม็ด) จึงอาจกล่าวได้ว่าตัวรองรับที่เตรียมได้จากสภาวะเหล่านี้มีความแข็งแรงใกล้เคียงกัน

4.3 การเปรียบเทียบการเตรียมตัวรองรับโดยใช้พันธะไอออนิกและพันธะโคเวเลนต์

จากผลการทดลองที่ได้ จะพบว่า การเตรียมตัวรองรับด้วยพันธะโคเวเลนต์ เปอร์เซ็นต์ตัวรองรับที่ผ่านมีค่าอยู่ระหว่าง 97.5-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการเตรียมตัวรองรับด้วยพันธะไอออนิกที่มีเปอร์เซ็นต์ตัวรองรับที่ผ่านอยู่ระหว่าง 2.5-90 เปอร์เซ็นต์ดังนั้นกล่าวได้ว่า การเตรียมตัวรองรับด้วยพันธะโคเวเลนต์มีความเหมาะสมกว่าเพราะให้จำนวนตัวรองรับที่เสียหายน้อยกว่า นอกจากนี้ยังเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลลูโลสหรือเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ไม่ได้ส่งผลต่อการสูญเสียจำนวนตัวรองรับมากนัก จึงเหมาะอย่างยิ่งที่จะใช้ในการตรึงเอนไซม์มากกว่าการเตรียมด้วยพันธะไอออนิกที่ได้รับอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ตัวรองรับที่ผ่านที่มาก

4.4 อิทธิพลของปริมาณเซลลูโลสและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวรองที่เตรียมด้วยพันธะโคเวเลนต์

จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี two level factorial โดยปัจจัยที่ศึกษา คือเปอร์เซ็นต์เซลลูโลสและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (12 การทดลอง โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง)และจากการวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อหาค่าผลกระทบของแต่ละปัจจัย (ตารางที่ 3) พบว่า P-value ของปัจจัยหลักและปัจจัยร่วมมีค่าต่ำกว่า 0.05 โดยเมื่อพิจารณาปัจจัยหลักทั้งสองพบว่า เฉพาะค่า P-value ของปัจจัย A เท่านั้นที่มีผลต่อค่ากิจกรรมที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น มีการหาค่าสัมประสิทธ์ของสมการที่ได้จากการวิเคราะห์ โดยหาได้จาก ค่าผลกระทบของปัจจัยหารสอง ดังแสดงในสมการ

$$y = 133.12 - 18.09A + 1.04B + 4.13AB \quad (3)$$

ตารางที่ 3 ผลจากการวิเคราะห์ 2 level factorial

Source	F	P-value
Main Effects	93.66	0.0000
A	186.71	0.0000
B	0.61	0.457
2-Way Interactions		0.014
A*B	9.70	0.014

4.5 อิทธิพลของปริมาณเซลลูโลสและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่มีต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงบนตัวรองที่เตรียมด้วยพันธะไอออนิก

โดยจะสนใจเพียงอิทธิพลเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่ส่งผลต่อความแข็งแรงของตัวรองรับเท่านั้น โดยได้กำหนดให้เปอร์เซ็นต์เซลลูโลส (A) คงที่ที่ 0.3 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนค่าของเวลา คือ 2.3 และ 6 ชั่วโมงโดยนำค่ากิจกรรมที่วัดได้ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทิศทางเดียว (ตารางที่ 5) พบว่าค่า $P < 0.05$ นั่นแสดงว่าปัจจัย B มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวรองรับที่เตรียมด้วยพันธะไอออนิกที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ในขณะที่เมื่อเพิ่มเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์มากขึ้นจะทำให้ค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นด้วย

ตารางที่ 5ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทิศทางเดียว

Source	F	P-value
B	26.03	0.007

4.6 การเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวรองรับที่เตรียมจากพันธะไอออนิกและพันธะโคเวเลนต์

สามารถแบ่งได้เป็น 2 กรณี คือกรณีแรกมีปริมาณเซลลูโลสผสม ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวรองรับที่เตรียมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (ปริมาณเซลลูโลสมีผลต่อค่ากิจกรรม)ที่วัดได้จะมีค่าสูงกว่าพันธะไอออนิก (ได้รับอิทธิพลจากเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์) อย่างมาก กรณีที่สอง ไม่มีปริมาณเซลลูโลสผสม พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวรองรับที่เตรียมด้วยพันธะโคเวเลนต์ยังมีค่ามากกว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวรองรับที่เตรียมด้วยพันธะไอออนิก

5. สรุปผล

จากการศึกษาอิทธิพลที่มีผลต่อความแข็งแรงของตัวรองรับและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรึงรูป พบว่า การเชื่อมขวางด้วยพันธะไอออนิกจะทำให้เกิดการสูญเสียตัวรองรับมาก (ได้รับอิทธิพลจากเวลาที่ใช้กระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์)ในขณะที่การเชื่อมขวางด้วยพันธะโคเวเลนต์จะทำให้ได้ตัวรองรับที่แข็งแรงมากกว่า (สูญเสียตัวรองรับมากที่สุดเพียง 3 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้น การเตรียมตัวรองด้วยพันธะโคเวเลนต์จึงมีความแข็งแรงกว่าพันธะไอออนิกมาก และปริมาณเซลลูโลสไม่มีผลต่อความแข็งแรงของตัวรองรับ (ปริมาณเซลลูโลสไม่ได้ช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้แก่ตัวรองรับมากนัก) เมื่อนำไปใช้งานจริง จึงเลือกใช้การเตรียมตัวรองรับด้วยพันธะโคเวเลนต์ โดยไม่จำเป็นที่จะต้องผสมเซลลูโลสในขั้นตอนการเตรียมตัวรองรับ ก็จะได้ตัวรองรับที่มีความแข็งแรงมากแล้ว

เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลเดียวกันนี้ ที่มีต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวรองรับที่เตรียมได้ พบว่าการใช้พันธะโคเวเลนต์ในการเตรียมตัวรองรับยังทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าสูงกว่าเอนไซม์ที่ตรึงรูปบนตัวรองรับที่เตรียมจากพันธะไอออนิกถึง 10 เท่า โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์บนตัวรองรับที่เตรียมด้วยพันธะโคเวเลนต์จะได้รับอิทธิพลจากปริมาณเซลลูโลส คือ ตัวรองรับที่ผสมเซลลูโลส จะมีค่ากิจกรรมต่ำกว่าตัวรองรับที่ไม่ได้ผสมเซลลูโลส ในขณะที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวรองรับที่เตรียมด้วยพันธะไอออนิก จะได้รับอิทธิพลจากเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ จึงอาจสรุปได้ว่าการใช้พันธะโคเวเลนต์ให้ผลเป็นที่น่าพอใจทั้งในเรื่องความแข็งแรงของตัวรองรับและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรึงรูป โดยไม่จำเป็นต้องผสมเซลลูโลสในตัวรองรับ

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.นันทิยา หาญศุภลักษณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานหลัก ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนแนวทางในการแก้ปัญหา อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการวิเคราะห์และสรุปผล รวมทั้งการตรวจแก้ไขโครงงานจนกระทั่งงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์อย่างยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ซึ่งเป็นคณะกรรมการสอบโครงงานทุกท่านที่ให้คำแนะนำและความคิดเห็นต่างๆเพื่อแก้ไขโครงงานนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมถึงอาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมเคมีทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ต่อในภายหน้าและขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมีทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ

7. เอกสารอ้างอิง

Almeida, E.V.R.; Frollini, E.; Castellan, A.; Coma, V.; Chitosan, sisal cellulose, and biocomposite chitosan/sisal cellulose films prepared from thiourea/NaOH aqueous solution, *Journal of Carbohydrate Polymers*, 80 (2010) 655-664

Altun, G.D.;Cetinus, S.A.; Immobilization of pepsin on chitosan beads, *Journal of Food Chemistry*, 100 (2005) 964-971

Azeredo, H.M.C.; Mattoso, L.H.C.; Avena-Bustillos, R.J.; Filho, G.C.; Munford, M.L.; Wood, D.; McHugh, T.H.; Nanocellulose Reinforced Chitosan Composite Films as Affected by Nanofiller Loading and Plasticizer Content, *Journal of Food Science*, 75 (2009) N1-N7.

Biro, E.; Nemeth, A.S.; Sisak, C.; Feczko, T.; Gyenis, J.; Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization, *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70 (2008) 1240-1246

Goncalves, V.L.;Laranjeira, M.C.M.;Favere, V.T.; Effect of crosslinking Agents on Chitosan Microsphere in Controlled Release of Diclofenac Sodium, *Polimeros: Ciencia e Tecnologia,* vol.15(2005) 6-12

LI, Q.; Zhou, J.; Zhang, L.; Structure and Properties of the Nanocomposite Films of Chitosan Reinforced with Cellulose Whiskers, *Journal of Polymer Science*, 47 (2009) 1069-1077.

Xi, F.; Wu, J.; Macroporous chitosan layer coated on non-porous silica gel as a support for metal chelate affinity chromatographic adsorbent, *Journal of Chromatography A*, 1057 (2004) 41-47