

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาผลการเตรียมที่มีต่อสมบัติของ RF gel/RF carbon gel  
และการนำ RF gel/Carbon gel ไปใช้ประโยชน์

The effect of preparation methods on porous properties of RF gel/RF carbon gel  
and the application of RF gel/RF carbon gel

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. วิวัฒน์ คันทะพานิชกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิจัยที่สหภาพ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการวิจัยร่วมภาครัฐ-เอกชน ประจำปีงบประมาณ 2547

### บทคัดย่อ

รีโซซินอล-ฟอร์มาลดีไฮด์ เจล เป็นวัสดุตั้งต้นที่มีความเหมาะสมในการเตรียมเป็นคาร์บอนที่มีรูพรุน ในช่วงไมโครพอร์และมีโซพอร์ได้ โดยปรกติแล้ว รีโซซินอล-ฟอร์มาลดีไฮด์ เจล เตรียมขึ้นด้วยวิธี โซล-เจล พอลิ คอนเดนเซชัน ของ รีโซซินอล กับ ฟอร์มาลดีไฮด์ ภายใต้สภาวะหลายที่เป็นต่าง ในงานวิจัยนี้แบ่งศึกษาเป็น 3 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้กระบวนการอบแห้งด้วยคลื่น ไมโครเวฟเพื่อใช้ในการอบแห้ง RF Gel ที่เตรียมด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงระหว่างกระบวนการ โซล เจล พอลิคอนเดนเซชัน พบว่าเมื่อใช้คลื่น ไมโครเวฟในการอบแห้ง ปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างหรือค่า C/W ต้องมีค่าน้อยกว่า 40 โมลต่อลูกบาศก์เมตร เพื่อรักษารูพรุนแบบมีโซไว้ แต่เมื่อค่า C/W มาก (C/W มากกว่า 40 โมลต่อลูกบาศก์เมตร) คาร์บอนเจลจะมีรูพรุนแบบมีโซน้อยมาก ในงานวิจัยนี้คาร์บอนเจลที่มีรูพรุนแบบมีโซถูกเตรียมขึ้น โดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนเชิงโมลของรีโซซินอลกับตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างหรือค่า R/C ในสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มาลดีไฮด์ และการใช้คลื่นเหนือเสียงระหว่างขั้นตอน โซล-เจล พอลิคอนเดนเซชัน แล้วตามด้วยการอบแห้งด้วยคลื่น ไมโครเวฟ (Microwave drying) พบว่าภายใต้สภาวะการเตรียมที่มีค่า C/W สูง (C/W เท่ากับ 80 โมลต่อลูกบาศก์เมตร) การใช้คลื่นเหนือเสียงและการเพิ่มค่า R/C ในสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มาลดีไฮด์ในช่วง 100 ถึง 200 โมลต่อโมล ทำให้คาร์บอนเจลที่ได้จากการอบแห้งด้วยคลื่น ไมโครเวฟสามารถรักษารูพรุนแบบมีโซไว้ได้หลังการเผาให้เป็นคาร์บอน

ส่วนที่ 2 ศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมอนุภาคคาร์บอนเจลที่มีขนาดเล็กมาก ด้วยการ ใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการอิมัลชัน จากผลการศึกษาพบว่าอนุภาคคาร์บอนขนาดเล็กมากที่มีรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ซึ่งได้จากการคาร์บอนในอนุภากรีโซซินอล-ฟอร์มาลดีไฮด์ซึ่งมีขนาดเล็กมาก ซึ่งเตรียมได้ด้วยวิธีอิมัลชันชนิดน้ำมันด้วย SPAN80 และคลื่นเหนือเสียง โดยได้พื้นที่ผิว BET เป็น 510 – 610 m<sup>2</sup>/g ปริมาตรรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ เป็น 0.86 cm<sup>3</sup>/g นอกจากนี้ยังพบว่าคลื่นเหนือเสียงส่งผลต่อสมบัติพื้นผิวและรูพรุนในช่วงมีโซพอร์อย่างเห็นได้ชัด จากการสังเกตเปรียบเทียบกับการใช้ไมโครเวฟ โซโนจีเนชันเซอร์ในการเตรียมสารอิมัลชันพบว่าคลื่นเหนือเสียงสามารถเตรียมอนุภาคคาร์บอนที่มีขนาดเล็กกว่ามากได้.

และส่วนที่ 3 ศึกษากระบวนการเตรียมเรโซซินอลฟอร์มาลดีไฮด์ เจล และคาร์บอนเจล ด้วยวิธีต่างกันคือ ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอไอออนิก (RF-CS) และ ไม่ใช้สารลดแรงตึงผิว (RF-NS) โดย RF-NS Carbon มีสมบัติความเป็นรูพรุนดีที่สุดทั้งปริมาตรรูพรุนระดับเมโซเป็น 0.81 cm<sup>3</sup>/g พื้นที่ผิวเป็น 550 m<sup>2</sup>/g และค่าสูงสุดการกระจายตัวของรูพรุนระดับเมโซ (Rp) เป็น 7.2 nm จากนั้นนำ RF Gel และ RF Carbon Gels ที่เตรียมได้ไปใช้ตรึง เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธีการตรึงที่แตกต่างกันคือ การตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ และวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล จากผลการวิจัยพบว่า การตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจลของ RF-NS Gel สามารถตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดเป็น 86.30% และ 84.36% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นตามลำดับ และเมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบน RF-CS Carbon มีกิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดเป็น 103.80 units/ml-mg protein เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระที่มีกิจกรรมจำเพาะเป็น 50.58 units/ml-mg protein ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-NS Carbon มีกิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดเป็น 23.35 units/ml-mg protein เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ ที่มีกิจกรรมจำเพาะเป็น 9.69 units/ml-mg protein เอนไซม์ที่ตรึงใน RF-NS Gel และ RF-NS Carbon Gel มีเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูงกว่าเอนไซม์อิสระ โดยภายหลังการเร่งปฏิกิริยา 5 รอบ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงใน RF-NS Gel คงกิจกรรมไว้ได้สูงที่สุดเป็น 64.89% ขณะที่เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-NS Carbon คง กิจกรรมไว้ได้สูง

ที่สุดเป็น 62.23% และภายหลังการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทั้งเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-NS Carbon สามารถรักษากิจกรรมไว้ได้สูงที่สุด โดยสามารถรักษากิจกรรมภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ได้มากกว่า 94%

คำสำคัญ: การอบแห้งด้วยไมโครเวฟ คาร์บอนที่มีรูพรุน การคาร์บอนไนซ์เซชัน การดูดซับ สภพความพรุน อาร์เอฟเจล คาร์บอนเจล การตรึงเอนไซม์ อนุภาคคาร์บอนที่มีขนาดเล็กมาก การทำอิมัลชันด้วยคลื่นเหนือเสียง



เลขหมู่  
เลขทะเบียน 013601  
รับ. เดือน. ปี 20พ.ค.51

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## Abstract

Resorcinol-Formaldehyde gels are suitable materials to produce microporous and mesoporous carbon gels. Normally, they can be prepared via sol-gel polycondensation method under basic solution. In this research have 3 parts as follows.

Part 1, the probability to use microwave drying for RF gels, which was prepared by ultrasound during sol-gel polycondensation process, was studied. When microwave drying was used, the catalyst concentration or C/W value of RF solution should be kept smaller than  $40 \text{ mol/m}^3$  to obtain mesoporous carbon gels. At high C/W value ( $C/W > 40 \text{ mol/m}^3$ ) of RF solution, microwave dried mesoporous carbon gels had a few mesopores. In this work, mesoporous carbon gels are prepared by adjusting molar ratio of resorcinol to catalyst (R/C [mol/mol]) and using ultrasonic irradiation to RF solution during sol-gel polycondensation step followed by microwave drying. Mesoporous properties of microwave dried mesoporous carbon gels can be retained by using ultrasonic irradiation and the increment of R/C value, 100-200 mol/mol, of RF solution at high C/W value ( $C/W = 80 \text{ mol/m}^3$ ).

Part 2, the probability to use ultrasonic emulsification technique for submicron carbon spheres preparing was studied. In this work submicron mesoporous carbon spheres with the BET surface area of  $510 - 610 \text{ m}^2/\text{g}$  and the mesopore volume of  $0.86 \text{ cm}^3/\text{g}$  can be firstly obtained from carbonization of resorcinol-formaldehyde (RF) submicron spheres which are prepared from water-in-oil emulsification with span80 and ultrasonic dispersion. Moreover, surface texture and mesoporous properties can be obviously changed by ultrasonic emulsification. By using ultrasonic emulsification, more number and much smaller size submicron carbon spheres can be observed compared to homogenized and mechanically stirred emulsifications.

Part 3, in this work we studied two techniques of RF gels and carbon gels preparation, synthesized with and without cationic surfactant (RF-CS and RF-NS corresponding). RF-NS carbon shows the best porous properties comparing to RF-NS gel and RF-CS carbon with mesopore volume as high as  $0.81 \text{ cm}^3/\text{g}$ , surface area as high as  $550 \text{ m}^2/\text{g}$  and mesopore size distribution peak ( $R_p$ ) of 7.2 nm. Next, RF gels and carbon gels were used for alkaline protease and lipase immobilization. The two immobilization techniques used were physical adsorption for RF carbon gels and entrapped for RF gel. Results showed that RF-NS gel gave highest enzyme loading; 86.30% of initial enzyme for alkaline protease and 84.36% of initial enzyme for lipase. Immobilized alkaline protease on RF-CS carbon demonstrated the specific activity of 103.80 units/ml-mg protein comparing to 50.58 units/ml-mg protein of free enzyme. Immobilized lipase on RF-NS carbon demonstrated the specific activity of 23.35 units/ml-mg protein comparing to 9.69 units/ml-mg protein of free enzyme. Moreover, immobilized enzyme in RF-NS gel and carbon gel showed higher operation stability comparing to free enzymes. After 5 cycle run,



immobilized alkaline protease in RF-NS gel gave 64.89% retention activity, while immobilized lipase in RF-NS carbon gave 62.23% retention activity. Immobilized enzyme in RF-NS carbon stored at room temperature and 4°C for 4 weeks gave more than 94% retention activity.

Keyword : Microwave Drying, Porous Carbon, Carbonization, Adsorption, Porosity, RF Gels, Carbon Gels, Enzyme Immobilization, Submicron Mesoporous Carbon Sphere, Ultrasonic Emulsification,



ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้เนื่องจากความร่วมมือและความกรุณาจากบุคคลและหน่วยงานต่างๆหลายฝ่าย คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณ โครงการวิจัยร่วม ภาครัฐ-เอกชน สำหรับเงินสนับสนุนตลอดการวิจัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูป	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 บทนำและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 แนวทางการทดลอง	2
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย	2
บทที่ 2 ความรู้เบื้องต้น	3
2.1 รีโซซินอล ฟอรั่มลดีไฮด์ เจล และคาร์บอนเจล	3
2.1.1 ขั้นตอนการเตรียมเจลก่อนการอบแห้ง	3
2.1.2 การอบแห้ง	7
2.1.3 การเผาให้เป็นคาร์บอน	9
2.2 การใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการเคมี	11
2.3 เอนไซม์และการตรึงเอนไซม์	14
2.3.1 กระบวนการตรึงเอนไซม์	15
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	23
3.1 วัตถุประสงค์และเครื่องมือที่ใช้	23
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	23
3.3 รายละเอียดวิธีการทดลอง	24
3.3.1 การทดลองเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติรูพรุนแบบมีโซของ รีโซซินอล-ฟอรั่มลดีไฮด์ คาร์บอนเจล ที่ใช้และไม่ใช้คลื่นเหนือเสียงระหว่างขั้นตอนโซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน โดยผ่านขั้นตอนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ	25



## สารบัญ

	หน้า
3.3.2 ศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเล็กมาก (Ultramicrosphere) ด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ Inverse emulsion	31
3.3.2.1 การเตรียมอนุภาคทรงกลมของ RF Gel	31
3.3.3 การนำ RF Gel/Carbon gel ไปใช้งานด้าน Biochemical Engineering	33
3.3.3.1 รายละเอียดการทดลอง	33
3.3.3.1.1 การเตรียมและการวิเคราะห์คุณสมบัติของอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลที่ใช้ในการทดลองส่วนนี้	33
3.3.3.1.2 การศึกษาตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอส	35
3.3.3.1.3 การศึกษาตรึงเอนไซม์ไลเปส	39
บทที่ 4 ผลการศึกษาและการอภิปรายผล	44
4.1 ผลการศึกษาและการอภิปรายผลเรื่องความเป็นไปได้ในการใช้กระบวนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave dryi-ng) เพื่อใช้ในการอบแห้ง RF gel ที่เตรียมด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ โซล-เจล พอลิ คอนเดนเซชัน (Sol-gel polycondensation)	44
4.1.1 รีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจล ที่มีโครงสร้างรูพรุนแบบมีโซ	44
4.1.2 การปรับเปลี่ยนค่า C/W และค่า R/C ที่ใช้ในการเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอน เจลซึ่งผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ	46
4.1.3 รีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจลที่ผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟเปรียบเทียบกับวิธีการอบแห้งแบบเย็นเยือก	54
4.2 ผลการศึกษาและการอภิปรายผลเรื่องความเป็นไปได้ในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเล็กมาก (Ultramicrosphere) ด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ Inverse emulsion	59
4.3 ผลการศึกษาและการอภิปรายผลเรื่องการนำ RF Gel/Carbon gel ไปใช้งานด้าน Biochemical Engineering	64
4.3.1 ผลการเตรียมอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล	64
4.3.1.1 ผลการตรวจสอบสมบัติความเป็นรูพรุนของ อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล	64

## สารบัญ

	หน้า
4.3.1.1.1 ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน (Nitrogen Adsorption-Desorption Isotherm)	65
4.3.1.1.2 ปริมาตรรูพรุนระดับเมโซพอร์ (Mesopore volume)	66
4.3.1.1.3 การกระจายขนาดรูพรุนในช่วงเมโซพอร์ (Mesopore Size Distribution)	66
4.3.1.1.4 พื้นที่ผิว BET (BET Surface Area)	68
4.3.1.2 ผลการตรวจสอบรูปร่างของ อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล	68
4.3.2 ผลการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปส	69
4.3.2.1 ผลการตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ	70
4.3.2.1.1 ผลการทดสอบปริมาณโปรตีนที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอนเจล	70
4.3.2.1.2 ผลการทดสอบความสามารถในการจุเอนไซม์ของอาร์เอฟคาร์บอนเจล	74
4.3.2.1.3 ผลการทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น	76
4.3.2.1.4 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยา	79
4.3.2.1.5 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษา	82
4.3.2.2 ผลการตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล	85
4.3.2.2.1 ผลการทดสอบปริมาณโปรตีนที่ตรึงในอาร์เอฟเจล	85
4.3.2.2.2 ผลการทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น	88
4.3.2.2.3 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยา	89
4.3.2.2.4 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษา	91
บทที่ 5 สรุป	
5.1 สรุป	95
5.1.1 ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้กระบวนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave dryi-ng) เพื่อใช้ในการอบแห้ง RF gel ที่เตรียมด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ โซล-เจล พอลิ คอนเดนเซชัน (Sol-gel polycondensation)	95
5.1.2 ศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเล็กมาก (Ultramicrosphere) ด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ Inverse emulsion	96

## สารบัญ

	หน้า
5.1.3 การนำ RF Gel/Carbon gel ไปใช้งานด้าน Biochemical Engineering เน้นที่การทำ Immobilization enzyme (เอนไซม์ตรึงรูป) โดยศึกษาถึงความ เป็นไปได้ในการนำ enzyme ไปตรึงอยู่บน RF Carbon gel	96
5.1.3.1 ผลการเตรียม RF เจล และ RF คาร์บอนเจล	96
5.1.3.2 ผลการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอส และเอนไซม์ไลเปส	96
5.1.3.3 เติลยรภาพในการเร่งปฏิกิริยา	97
5.1.3.4 เติลยรภาพในการเก็บรักษา	97
5.2 ข้อเสนอแนะ	98
รายการอ้างอิง	99
ภาคผนวก	103



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 การเปลี่ยนสภาวะการเผาให้เป็นคาร์บอนที่ส่งผลต่อลักษณะสมบัติรูพรุนของคาร์บอนเจล	10
ตารางที่ 3.1 วิธีเตรียมรูปและสมบัติของเอนไซม์ครึ่งรูป	21
ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะในการเตรียม Carbon gel ที่มีโครงสร้างแบบมีโซเมื่อค่า $C/W$ ค่าโดยใช้คลื่นเหนือเสียงและใช้วิธีอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ	25
ตารางที่ 3.2 แสดงสภาวะในการเตรียม Carbon gel ที่มีโครงสร้างแบบมีโซเมื่อค่า $C/W$ สูงโดยใช้คลื่นเหนือเสียงและใช้วิธีทำให้แห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ	26
ตารางที่ 3.3 สภาวะการเตรียมคาร์บอนไมโครสเฟียร์	31
ตารางที่ 3.4 แสดงสรุปเงื่อนไขในการเตรียมอาร์เอฟเจลและ คาร์บอนเจล และการนำไปใช้ในการครึ่งเอนไซม์	43
ตารางที่ 4.1 ค่าลักษณะสมบัติรูพรุนของ Carbon Sonogel และ Carbon Gel ที่สภาวะต่างๆ	49
ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบค่าลักษณะสมบัติรูพรุนของ Carbon gel และ Carbon sonogel ที่ผ่านขั้นตอนการอบแห้งแบบเย็นเยือกและการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟเมื่อสภาวะในการเตรียมเหมือนกัน	55
ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยแบบต่างๆและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีต่างๆ	59
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าพื้นที่ผิวจำเพาะบีเอที ( $S_{BET}$ ) และปริมาตรมีโซพอร์ ( $V_{mes}$ ) ของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วยวิธีต่างๆ	62
ตารางที่ 4.5 แสดงค่าสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF-CS carbon RF-NS carbon และ RF-NS gel	66
ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณ โพรดิน(แอลคาไลน์โปรตีน)ที่หลุดจาก RF-CS carbon และ RF-NS carbon จากการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง	73
ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณ โพรตีน(ไลเปส) ที่หลุดจาก RF-CS carbon และ RF-NS carbon จากการล้างด้วยเฮปแทน 3 ครั้ง	73
ตารางที่ 4.8 แสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสอีเอส และ เอนไซม์ไลเปส	78

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.9 แสดงปริมาณโปรตีน(เอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสเฟส)ที่หลุดจากอาร์เอฟคาร์บอน ในน้ำล้างภายหลังการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ	81
ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณ โปรตีน(เอนไซม์ไลเปส)ที่หลุดจากอาร์เอฟคาร์บอนที่มากับน้ำล้างภายหลังการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ	82
ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณ โปรตีน(แอลคาไลน์ฟอสเฟส) ที่หลุดมาจาก RF-NS gel มากับน้ำล้างภายหลังการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ	91
ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณ โปรตีน(ไลเปส) ที่หลุดมาจาก RF-NS gel มากับน้ำล้างภายหลังการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ	91
ตารางที่ 4.13 ตารางสรุปคุณสมบัติของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสเฟสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสเฟสตรึงรูป	94
ตารางที่ 4.14 ตารางสรุปคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป	94
ตารางที่ ก.1 แสดงผลการดูดซับ-คายซับ ในโครเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF carbon sonogel และ RF carbon gel ที่มีค่า $C/W$ เท่ากับ $20 \text{ mol/m}^3$ , $R/C = 200 \text{ mol/mol}$	105
ตารางที่ ก.2 แสดงผลการดูดซับ-คายซับ ในโครเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF carbon sonogel และ RF carbon gel ที่มีค่า $C/W$ เท่ากับ $40 \text{ mol/m}^3$ , $R/C = 200 \text{ mol/mol}$	106
ตารางที่ ก.3 แสดงผลการดูดซับ-คายซับ ในโครเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF carbon sonogel และ RF carbon gel ที่มีค่า $C/W$ เท่ากับ $80 \text{ mol/m}^3$ , $R/C = 200 \text{ mol/mol}$	107
ตารางที่ ก.4 แสดงผลการดูดซับ-คายซับ ในโครเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF carbon sonogel และ RF carbon gel ที่มีค่า $C/W$ เท่ากับ $80 \text{ mol/m}^3$ , $R/C = 100 \text{ mol/mol}$	108
ตารางที่ ก.5 แสดงผลการดูดซับ-คายซับ ในโครเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF carbon sonogel และ RF carbon gel ที่มีค่า $C/W$ เท่ากับ $80 \text{ mol/m}^3$ , $R/C = 50 \text{ mol/mol}$	109
ตารางที่ ก.6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายที่มีความเข้มข้นของไทโรซีนต่างๆ	110

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ ก.7 แสดงค่าอัตราส่วนพื้นที่ของโครมาโตกราฟระหว่าง บิวทานอลกับเฮปเทนกับความเข้มข้นของบิวทานอลค่าต่างๆ	111
ตารางที่ ก.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นค่าต่างๆ	112
ตารางที่ ก.9 ผลไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ (Adsorption-Desorption Isotherm) ของไนโตรเจนที่ 77 เคลวิน ของ RF-NS Carbon	113
ตารางที่ ก.10 ผลไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ (Adsorption-Desorption Isotherm) ของไนโตรเจนที่ 77 เคลวิน ของ RF-CS Carbon	114
ตารางที่ ก.11 แสดงปริมาณโปรตีน(แอลคาไลน์โปรตีนเอส)ที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอนที่ เวลาการตรึงต่างๆ	115
ตารางที่ ก.12 แสดงกิจกรรมที่เปลี่ยนไปของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสอิสระ เมื่อทำการทดสอบที่สภาวะเดียวกับการตรึงที่เวลาต่างๆ	116
ตารางที่ ก.13 แสดงปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้บน RF-NS คาร์บอนที่ค่าความเข้มข้นเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอส ค่าต่างๆ	116
ตารางที่ ก.14 แสดงปริมาณไทโรซินที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสอิสระ	117
ตารางที่ ก.15 แสดงปริมาณไทโรซินที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสอิสระ	117
ตารางที่ ก.16 แสดงปริมาณไทโรซินที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน	118
ตารางที่ ก.17 แสดงปริมาณไทโรซินที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน	118
ตารางที่ ก.18 แสดงปริมาณไทโรซินที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ตรึงด้วย RF-NS เจล	118
ตารางที่ ก.19 แสดงค่า retention activity จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสอิสระ และแอลคาไลน์โปรตีนเอสตรึงรูป	119
ตารางที่ ก.20 แสดงค่ากิจกรรม (unit activity) ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสอิสระ และแอลคาไลน์โปรตีนเอส ตรึงรูป ภายหลังจากการรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ	119



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ ก.21 แสดงผลการคำนวณ retention activity ของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรตีเอสอิสระ และแอลคาไลน์โพรตีเอสครึ่งรูป ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ	120
ตารางที่ ก.22 แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส)ที่ครึ่งดิคบน RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอนที่เวลาการครึ่งต่างๆ	120
ตารางที่ ก.23 แสดงปริมาณโปรตีนที่ครึ่งดิคบน RF-NS คาร์บอนที่ปริมาณเอนไซม์ไลเปสค่าต่างๆ	120
ตารางที่ ก.24 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ใช้ไปเป็นเวลาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ	121
ตารางที่ ก.25 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปเป็นเวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ	121
ตารางที่ ก.26 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปเป็นเวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่ครึ่งบน RF-CS คาร์บอน	122
ตารางที่ ก.27 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปเป็นเวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่ครึ่งบน RF-NS คาร์บอน	122
ตารางที่ ก.28 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปเป็นเวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่ครึ่งด้วย RF-NS เจล	123
ตารางที่ ก.29 แสดงค่า retention activity จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และไลเปสครึ่งรูป	123
ตารางที่ ก.30 แสดงค่ากิจกรรม (unit activity) ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และไลเปสครึ่งรูป ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ	124
ตารางที่ ก.31 แสดงผลการคำนวณ retention activity ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และไลเปสครึ่งรูป ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ	124

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงการเกิดวัสดุรูพรุน RF gel	4
รูปที่ 2.2 กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ RF Gel	4
รูปที่ 2.3 แนวคิดของกลไกการกลายเป็นเจลของรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล (a) กรณีที่มีค่า C/W สูง และ (b) กรณีที่มีค่า C/W ต่ำ	5
รูปที่ 2.4 แสดงการให้ความร้อนแบบธรรมดาเปรียบเทียบกับการให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ	9
รูปที่ 2.5 แสดงปฏิกิริยาระหว่าง bisdiazobenzidine กับเอนไซม์	20
รูปที่ 2.6 แสดงการทำ polyacrylamide gel ที่มีช่องตาข่ายสำหรับหุ้มเอนไซม์	20
รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการเตรียมสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์	27
รูปที่ 3.2 แสดงการใช้คลื่นเหนือเสียงในขั้นตอน โซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน ของสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์	28
รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการทำอบแห้ง RF gel ด้วยคลื่นไมโครเวฟ	30
รูปที่ 3.4 แผนผังกระบวนการเผาให้เป็นคาร์บอน (Carbonization)	30
รูปที่ 3.5 แผนผังกระบวนการเผาให้เป็นคาร์บอน (Carbonization)	33
รูปที่ 3.6 แสดงขั้นตอนการเตรียม RF carbon gels ทั้งแบบ RF-NS carbon gel และ RF-CS carbon gel	34
รูปที่ 3.7 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF Carbon Gels	36
รูปที่ 3.8 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจลของ RF-NS Gel	37
รูปที่ 3.9 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF Carbon Gels	40
รูปที่ 3.10 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจลของ RF-NS Gel	41
รูปที่ 4.1 แผนผังศึกษาผลของการใช้คลื่นไมโครเวฟในขั้นตอนของการอบแห้ง เพื่อเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจล	45
รูปที่ 4.2 ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ในโครเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ Carbon gel และ Carbon sonogel ที่ผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟเมื่อ R/C = 200 mol/mol และมีค่า C/W เป็น (a) 20 mol/m <sup>3</sup> (b) 40 mol/m <sup>3</sup> และ (c) 80 mol/m <sup>3</sup>	47

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 4.3 ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ในโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ Carbon gel และ Carbon sonogel ที่ผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟเมื่อ $C/W = 80 \text{ mol/m}^3$ และมีค่า R/C เป็น (a) 50 mol/mol (b) 100 mol/mol และ (c) 200 mol/mol	48
รูปที่ 4.4 ค่าปริมาตรรูพรุนแบบมีโซที่ค่า C/W ต่างๆ ของ Carbon gel และ Carbon sonogel เมื่อค่า R/C เท่ากันคือ 200 mol/mol	51
รูปที่ 4.5 การกระจายขนาดครีมีรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ ( $r_p$ ) ของ Carbon gel และ Carbon sonogel เมื่อ R/C = 200 mol/mol และมีค่า C/W เป็น (a) 20 mol/m <sup>3</sup> , (b) 40 mol/m <sup>3</sup> และ (c) 80 mol/m <sup>3</sup>	51
รูปที่ 4.6 ค่าปริมาตรรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ที่ค่า R/C ต่างๆ ของ Carbon gel และ Carbon sonogel เมื่อค่า C/W เท่ากันคือ 80 mol/m <sup>3</sup>	53
รูปที่ 4.7 การกระจายขนาดครีมีรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ ( $r_p$ ) ของ Carbon gel และ Carbon sonogel และภาพถ่าย SEM ของ Carbon sonogel เมื่อค่า C/W = 80 mol/m <sup>3</sup> และ ค่า R/C เป็น (a) 50 mol/mol, (b) 100 mol/mol และ (c) 200 mol/mol	54
รูปที่ 4.8 ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ในโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ Carbon gel และ Carbon sonogel เมื่อ $C/W = 80 \text{ mol/m}^3$ และมีค่า R/C = 100 mol/mol โดยที่ (a) Freeze drying (b) Microwave drying	56
รูปที่ 4.9 การกระจายขนาดครีมีรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ ( $r_p$ ) ของ Carbon gel และ Carbon sonogel เมื่อค่า C/W เท่ากับ 40 mol/m <sup>3</sup> และ 80 mol/m <sup>3</sup> โดยผ่านขั้นตอน (a), (c) การอบแห้งแบบเย็นเยือก และ (b), (d) การอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ	57
รูปที่ 4.10 การกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วย ไบกวน (C) โซโมจิไนซ์เซอร์ (H1, H2, H3, H4) และคลื่นเหนือเสียง (B60, B100)	59
รูปที่ 4.11 รูปถ่าย SEM ของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วย ไบกวน (C) โซโมจิไนซ์เซอร์ (H1, H2, H3, H4) และคลื่นเหนือเสียง (B60, B100)	60
รูปที่ 4.11 รูปถ่าย SEM ของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วย ไบกวน (C) โซโมจิไนซ์เซอร์ (H1, H2, H3, H4) และคลื่นเหนือเสียง (B60, B100)	61
รูปที่ 4.12 ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วย ไบกวน (C) โซโมจิไนซ์เซอร์ (H1, H2, H3, H4) และคลื่นเหนือเสียง (B60, B100)	63



## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 4.13 แสดงไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ในโครเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF-CS carbon RF-NS carbon และ RF-NS gel โดยที่เครื่องหมายที่บคือการดูดซับและเครื่องหมายโปร่งคือการคายซับ	65
รูปที่ 4.14 แสดงการกระจายขนาดรัศมีรูพรุนในช่วงเมโซพอร์ ของ RF-CS carbon RF-NS carbon และ RF-NS gel	67
รูปที่ 4.15 แสดงภาพถ่าย SEM ของ RF carbon a) RF-CS carbon และ b) RF-NS carbon ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า	68
รูปที่ 4.16 แสดงภาพถ่าย SEM ของ RF-NS gel ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า	69
รูปที่ 4.17 แสดงปริมาณโปรตีน(แอลคาไลน์โปรตีนเอส) ที่ถูกตรึงบน RF-CS และ RF-NS carbon 3 กรัม ที่เวลาต่างๆ	72
รูปที่ 4.18 แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส) ที่ถูกตรึงบน RF-NS carbon และ RF-CS carbon 2 กรัมที่เวลาต่างๆ	72
รูปที่ 4.19 แสดงผลของวิธีการครั้งด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพที่มีต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอส อิสระ และเอนไซม์ไลเปสอิสระ	74
รูปที่ 4.20 แสดงปริมาณโปรตีน(แอลคาไลน์โปรตีนเอส) ที่ถูกตรึงบน RF-NS carbon 2 กรัม ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีนเอสค่าต่างๆ	75
รูปที่ 4.21 แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส) ที่ถูกตรึงบน RF-NS carbon 2 กรัม ที่ปริมาณเอนไซม์ ไลเปส ค่าต่างๆ	75
รูปที่ 4.22 แสดงปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นในช่วงการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น จากการเร่งปฏิกิริยาของ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสอิสระที่ 45°C, 5 นาที และ 150 รอบต่อนาที	77
รูปที่ 4.23 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปในช่วงการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นจากการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสอิสระ ที่ 37°C, 180 นาที และ 150 รอบต่อนาที	77
รูปที่ 4.24 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสอิสระ	80
รูปที่ 4.25 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน และเอนไซม์ไลเปสอิสระ	81



## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 4.26 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์แอลคาไลน์ โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน	83
รูปที่ 4.27 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ของเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน	83
รูปที่ 4.28 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน	84
รูปที่ 4.29 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ของเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน	84
รูปที่ 4.30 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึง ในอาร์เอฟเจล เปรียบเทียบกับเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ	89
รูปที่ 4.31 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงในอาร์เอฟเจล เปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงใน RF-NS เจลที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆ	90
รูปที่ 4.32 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป	91
รูปที่ 4.33 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้องของเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป	92
รูปที่ 4.34 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป	92
รูปที่ 4.35แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป	93
รูปที่ ก.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน	110
รูปที่ ก.2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล	112
รูปที่ ก.3 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA	113

## บทที่ 1

### 1.1 บทนำและมูลเหตุจูงใจ

ในปัจจุบันได้มีความพยายามในการสังเคราะห์ และผลิตวัสดุอนุภาคแบบใหม่ โดยมุ่งเน้นให้วัสดุอนุภาคเหล่านั้นมีสมบัติพิเศษเพื่อให้สามารถตอบสนองความต้องการใช้งานในรูปแบบใหม่ๆ ของมนุษย์ ไม่ว่าจะเป็นสารดูดซับสมรรถนะสูง วัสดุรองรับตัวเร่งปฏิกิริยา วัสดุสำหรับทำตัวกรองน้ำทะเล หรือการใช้เป็นส่วนประกอบของขั้วไฟฟ้าเพื่อใช้ในตัวเก็บประจุแบบสองชั้นที่มีขนาดเล็กมากเพื่อใช้ในอุปกรณ์สื่อสารสมัยใหม่ หรือใช้ในเซลล์เชื้อเพลิง

ในบรรดาวัสดุดังกล่าววัสดุคาร์บอนที่มีรูพรุนที่ได้มาจากกระบวนการเผาให้เป็นคาร์บอน (Carbonization) ของ รีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล หรือ RF Gel ได้รับความสนใจอย่างมากเป็นพิเศษเนื่องจากเป็นวัสดุที่เป็นแหล่งกำเนิดคาร์บอน (Carbon Precursor) ที่มีสภาพความพรุนสูง (Porosity) และสามารถควบคุมลักษณะสมบัติรูพรุน เช่น ปริมาตรรูพรุน พื้นที่ผิวจำเพาะ ขนาดรัศมีรูพรุน ได้ง่ายหลายเทคนิควิธี เช่น การควบคุมสัดส่วนของสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา การควบคุมค่า pH ในสภาวะการเตรียมเริ่มแรก เป็นต้น

โดยปกติแล้ว RF Gel เตรียมจากปฏิกิริยา โซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน (Sol-gel Polycondensation) ระหว่างรีโซซินอลกับฟอร์มัลดีไฮด์ในน้ำ โดยมีโซเดียมคาร์บอเนตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดด่าง (Basic Catalyst) เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจนกระทั่งกลายเป็นเจลแล้วจึงนำเจลดังกล่าวไปอบแห้งเพื่อคั่งน้ำซึ่งได้จากปฏิกิริยาโพลีคอนเดนเซชันออกจากรูพรุน ซึ่งจะได้ RF Gel ที่มีรูพรุน หลังจากนั้นเมื่อ RF Gel ถูกเผาให้เป็นคาร์บอน (Carbonization) จะได้คาร์บอนเจลที่มีรูพรุนตามมา

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงลักษณะสมบัติของ RF gel และ RF Carbon gel เมื่อใช้เทคนิควิธีในการเตรียมที่แตกต่างกัน คือ การใช้คลื่นเหนือเสียงในการเตรียมเพื่อศึกษาถึงลักษณะสมบัติรูพรุนที่ได้ การใช้ Homogenizer เพื่อศึกษาถึง ลักษณะรูพรุนและรูปร่างของอนุภาค รวมถึงศึกษาถึงความเป็นไปได้เบื้องต้นในการประยุกต์ใช้ RF gel และ RF Carbon gel เพื่อใช้เป็นตัวรองรับเอนไซม์

### 1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้กระบวนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟเพื่อใช้ในการอบแห้ง RF Gel ที่เตรียมด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงระหว่างกระบวนการ โซล เจล โพลีคอนเดนเซชัน

1.2.2 ศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเล็กมาก ด้วยการ ใช้คลื่นเหนือเสียงที่มีขนาดเล็กมาก ด้วยการ ใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการอิมัลชันชนิดกลับวัฏภาค

1.2.3 ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำ RF Carbon gel ไปใช้งานด้านการตรึงเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาในน้ำมัน

### 1.3 แนวทางการทดลอง

เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ

### 1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1.4.1 ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้กระบวนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave drying) เพื่อใช้ในการอบแห้ง RF gel ที่เตรียมด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ โซล-เจล พอลิคอนเดนเซชัน (Sol-gel polycondensation)

ตัวแปรที่สนใจได้แก่ ความเข้มข้นของ Catalyst ที่ใช้ในการสังเคราะห์ และ กำลัง/แอมพลิจูด ของคลื่นเหนือเสียง

1.4.2 ศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเล็กมาก (Ultramicrosphere) ด้วยการ ใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ Inverse emulsion

ตัวแปรที่สนใจได้แก่ ความหนืดของ RF Solution และกำลัง/แอมพลิจูด ของคลื่นเหนือเสียง

1.4.3 การนำ RF Gel/Carbon gel ไปใช้งานด้าน Biochemical Engineering เน้นที่การทำ Immobilization enzyme (เอนไซม์ตรึงรูป) โดยศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำ enzyme ไปตรึงอยู่บน RF Carbon gel

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 2 ความรู้เบื้องต้น

### 2.1 รีโซซินอล ฟอรัมัลดีไฮด์ เจล และคาร์บอนเจล

การแบ่งแยกวัสดุที่มีรูพรุนนั้นอาจแบ่งตามการขึ้นรูปของวัสดุที่มีรูพรุนเป็น แอกริเกต (aggregates), แบบร่างแห (network), แบบรังผึ้ง (honeycomb) ฯลฯ หรือแบ่งตามขนาดของรูพรุนเป็น 3 แบบคือ แบบไมโครพอร์ (micropores :  $r_p \leq 2$  นาโนเมตร) แบบมีโซพอร์ (mesopores :  $2 < r_p < 50$  นาโนเมตร) และแบบแมโครพอร์ (macropores :  $r_p \geq 50$  นาโนเมตร)

ในปัจจุบันนี้วัสดุที่มีรูพรุนได้ก้าวเข้ามามีบทบาทอย่างมากในอุตสาหกรรมชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการดูดซับของวัสดุที่มีรูพรุนได้ก่อให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมเคมี โดยทั่วไปแล้ววัสดุที่มีรูพรุนแบบไมโคร (Micropores) มักจะถูกนำมาใช้เป็นตัวดูดซับเนื่องจากมีพื้นที่ผิวและมีแรงดูดซับของรูในระดับไมโครสูง ในขณะที่วัสดุที่มีรูพรุนแบบมีโซ (Mesopores) นิยมนำมาใช้เป็นตัวรองรับตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี (Catalyst) ถึงแม้ว่าวัสดุที่มีรูพรุนแบบมีโซจะมีพื้นที่ผิวและแรงในการดูดซับต่ำกว่าวัสดุที่มีรูพรุนแบบไมโคร แต่ก็ยังมีข้อดีในด้านการถ่ายเทมวลสารได้ง่ายกว่าแต่ก็ยังมีข้อจำกัดบางอย่างในการใช้งานเช่น ถ้าอัตราเร็วที่ใช้ในการถ่ายเทมวลสารนั้นมากเกินไปอาจจะทำให้ประสิทธิภาพในการใช้งานนั้นลดต่ำลง ดังนั้นจึงอาจเลือกใช้วัสดุรูพรุนแบบแมโคร (Macropores) ซึ่งรองรับอัตราเร็วที่ใช้ในการถ่ายเทมวลสารที่มีค่ามากได้ดีกว่าเช่น ใช้เป็น Column ใน HPLC

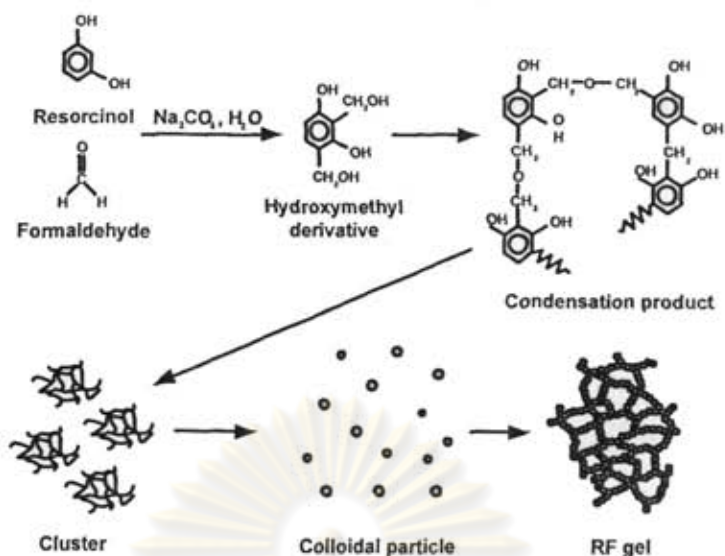
การเตรียมคาร์บอนเจลที่มีรูพรุนจากวัสดุที่เป็นแหล่งกำเนิดคาร์บอน (Carbon precursor) ที่มีสภาพความพรุน (Porosity) สูงและสามารถควบคุมลักษณะสมบัติความเป็นรูพรุนได้ง่ายจึงทำให้คาร์บอนที่ได้มีลักษณะสมบัติความเป็นรูพรุนได้ตามความต้องการที่จะนำไปประยุกต์ใช้

รีโซซินอล-ฟอรัมัลดีไฮด์ คาร์บอนเจล มีขั้นตอนในการเตรียมหลายขั้นตอน ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีตัวแปรที่สามารถกำหนดลักษณะสมบัติรูพรุนของวัสดุคาร์บอน ดังต่อไปนี้

#### 2.1.1 ขั้นตอนการเตรียมเจลก่อนการอบแห้ง

รีโซซินอล-ฟอรัมัลดีไฮด์ เจลสามารถเตรียมได้จากกระบวนการ โซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน (Sol-gel Polycondensation) [R.W. Pekala et al., 1989] ของ รีโซซินอล (R) กับ ฟอรัมัลดีไฮด์ (F) โดยมี โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังรูปที่ 2.1

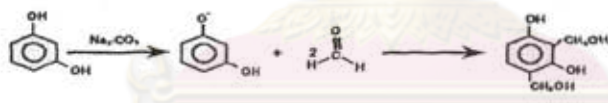




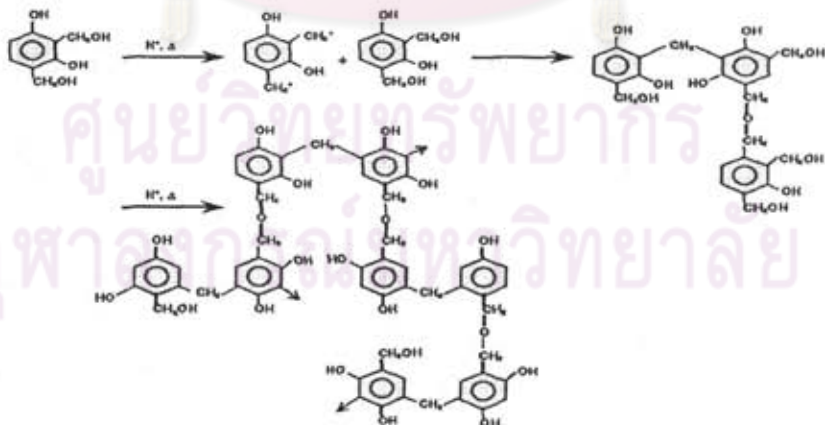
รูปที่ 2.1 แสดงการเกิดวัสดุรูพรุน RF gel [T. Yamamoto et.al., 2002]

สำหรับกลไกหลักที่ใช้ในการสังเคราะห์รีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล มี 2 กลไกหลักได้แก่ ปฏิกิริยาการเติม (Additional reaction) และปฏิกิริยาโพลีคอนเดนเซชัน (Polycondensation) ดังรูปที่ 2.2

#### 1. Addition Reaction



#### 2. Condensation Reaction



รูปที่ 2.2 กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ RF Gel [J.A. Ritter et.al, 2003]

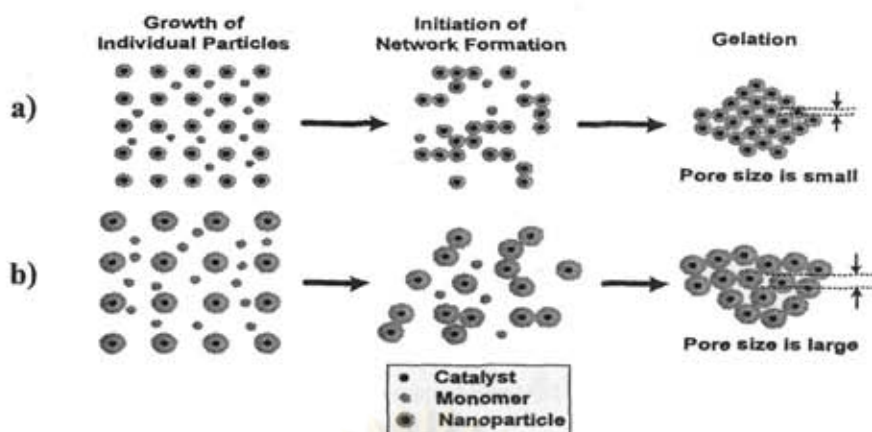
จากรูปที่ 2.2 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์รีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้คือ ภายใต้อิทธิพลของสภาวะที่เป็นด่าง รีโซซินอลจะกลายเป็นรีโซซินอล แอนไอออน (Resorcinol anion) เนื่องจากสูญเสียโปรตอนหรือไฮโดรเจนไอออน ขึ้น

ต่อมา รีโซซินอล แอนไอออน (Resorcinol anion) จะรวมตัวกับฟอร์มาลดีไฮด์ด้วยปฏิกิริยาการเติม เกิดเป็นอนุพันธ์ของ Hydroxymethyl ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) ซึ่งมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยามาก

อนุพันธ์ของ Hydroxymethyl ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) และสารตั้งต้นที่เหลือจะรวมตัวกันด้วยปฏิกิริยา โพลีคอนเดนเซชัน (Polycondensation) และเชื่อมต่อกันด้วยหมู่ Methyl ( $-\text{CH}_2-$ ) และหมู่ Methyl ether ( $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ ) และรวมตัวกันเป็นกลุ่ม (Cluster) และเติบโตจนเป็นอนุภาคปฐมภูมิที่ยึดเกาะกันเป็นโครงร่างตาข่าย 3 มิติ อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาการเติม กับปฏิกิริยาโพลีคอนเดนเซชันจะเกิดขึ้นพร้อมกันในระบบ [R.W. Pekala et.al, 1992, R.W. Pekala et.al., 1998]

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการปรับเปลี่ยนสัดส่วนของตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างกับน้ำ หรือ ค่า C/W เป็นปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญมากสำหรับ โครงสร้างรูพรุนของรีโซซินอล-ฟอร์มาลดีไฮด์ เจล (RF gel) และ รีโซซินอล-ฟอร์มาลดีไฮด์ คาร์บอนเจล (Carbon gel) ดังนั้นในปี 2002 Yamamoto และคณะได้ศึกษาการก่อตัวของโครงสร้างของ RF gel โดยใช้โซเดียมคาร์บอเนตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา(C) และใช้น้ำ (W) เป็นตัวทำละลาย โดยทำการปรับเปลี่ยนสัดส่วนเชิงโมลของรีโซซินอล กับน้ำหรือค่า R/C และสัดส่วนของรีโซซินอลกับน้ำหรือ R/W ให้อยู่ในช่วง 12.5 ถึง 200 โมลต่อโมล และ 0.125 ถึง 0.500 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ โดยให้สัดส่วนของรีโซซินอล กับฟอร์มาลดีไฮด์หรือค่า R/F คงที่ที่ 0.500 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จากการทดลองพบว่า ในช่วงแรกนั้นอัตราการเติบโตของอนุภาคคอลลอยด์ (Growth rate of colloidal particles) ขึ้นอยู่กับ สัดส่วนของตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างกับน้ำหรือค่า C/W ในสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มาลดีไฮด์ เริ่มแรก โดยเมื่อค่า C/W สูงขึ้น จะทำให้อัตราการเติบโตของอนุภาคคอลลอยด์สูงขึ้นด้วย แต่ในขณะเดียวกันอัตราการเติบโตของอนุภาคคอลลอยด์ในขั้นสุดท้ายจะมีค่าลดลงอีกด้วย และเมื่อศึกษา ผลต่อเนื่องไปถึงลักษณะรูพรุนของรีโซซินอล-ฟอร์มาลดีไฮด์ เจล (RF gel) พบว่าที่ค่า C/W สูงขึ้น ขนาดรูพรุนจะมีขนาดเล็กลง นอกจากนี้ปริมาตรรูพรุนแบบมีโซก็มีค่าลดลงด้วย จึงได้มีการเสนอ แนวคิดเกี่ยวกับบทบาทของค่า C/W ที่มีต่อกลไกการกลายเป็นเจล ดังรูปที่ 2.3

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 แนวคิดของกลไกการกลายเป็นเจลของรีโซซินอล-ฟอร์มาลดีไฮด์ เจล (a) กรณีที่มีค่า C/W สูง และ (b) กรณีที่มีค่า C/W ต่ำ [T. Yamamoto et.al., 2002]

แนวคิดของกลไกดังกล่าวอธิบายได้ว่า เมื่อปริมาณ C/W มีค่ามาก ภายใต้สภาวะดังกล่าว เป็นการสนับสนุนการเกิด รีโซซินอล แอนไอออน (Resorcinol anion) ทำให้สามารถเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาการเติมเป็นผลให้อัตราการเพิ่มจำนวนอนุพันธ์ของ Hydroxymethyl ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) มีจำนวนมาก ทำให้มีการรวมกลุ่ม (Cluster) กันด้วยปฏิกิริยาโพลีคอนเดนเซชัน หรือ เกิดเป็นอนุภาคก่อกำเนิด (Initiator Particle) จำนวนปริมาณมากในช่วงแรก ทำให้อนุภาคปฐมภูมิ (Primary Particle) ที่ได้มีขนาดเล็ก ผลที่ตามมาคือ อนุพันธ์ของ Hydroxymethyl ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) ที่เกิดขึ้นทีหลังจะมีปริมาณที่น้อยลงและจะเข้าร่วมตัวกับอนุภาคก่อกำเนิดที่มีอยู่ก่อนแล้วด้วยปฏิกิริยาโพลีคอนเดนเซชัน เป็นผลให้อนุภาคปฐมภูมิที่ได้มีขนาดเล็กด้วยเหตุนี้ เจลที่ได้จะมีช่องว่างระหว่างอนุภาคที่เล็ก หรือมีขนาดรูพรุนแบบมีไซที่เล็ก

ในทางตรงข้ามเมื่อค่า C/W มีค่าลดลง อัตราการเกิดปฏิกิริยาการเติมจะช้าลง เนื่องจากปริมาณ รีโซซินอล แอนไอออน (Resocinol Anion) เป็นผลให้อัตราการเพิ่มจำนวนอนุพันธ์ของ Hydroxymethyl ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) มีจำนวนน้อย ทำให้มีการรวมกลุ่ม (Cluster) หรือ จำนวนอนุภาคก่อกำเนิดมีปริมาณน้อยในช่วงแรก ผลที่ตามมาคือ อนุพันธ์ของ Hydroxymethyl ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) ที่เกิดขึ้นทีหลังซึ่งมีปริมาณมากจะเข้าร่วมตัวกับอนุภาคก่อกำเนิดที่มีอยู่ก่อนแล้วด้วยปฏิกิริยาโพลีคอนเดนเซชัน เป็นผลให้อนุภาคปฐมภูมิที่ได้มีขนาดเพิ่มขึ้น ด้วยเหตุนี้เจลที่ได้จะมีขนาดช่องว่างระหว่างอนุภาคใหญ่ หรือมีขนาดรูพรุนแบบมีไซใหญ่

จากข้างต้นจะเห็นได้ว่าการปรับเปลี่ยนค่า C/W นั้นมีผลต่อลักษณะความเป็นรูพรุนของ RF gel และ Carbon gel ที่สังเคราะห์ได้อย่างเห็นได้ชัด นอกจากการปรับเปลี่ยนค่า C/W แล้วยังมีงานวิจัยอีกหลายชิ้นที่ศึกษาถึงผลของการปรับเปลี่ยนค่าอัตราส่วนเชิง โมลของรีโซซินอลกับตัวเร่งปฏิกิริยา หรือ ค่า R/C ซึ่งพบว่า ค่ารัศมีสูงสุด ( $r_p$ , Peak radius) ที่ได้จากการกระจายขนาดรัศมีของรูพรุน(Pore size distribution) จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อค่า R/C สูงขึ้น [T. Yamamoto et.al., 2001]



เนื่องจากว่าปริมาณของสารตั้งต้นสูงขึ้นเมื่อเทียบกับปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้มีการรวมกลุ่ม (Cluster) หรือ จำนวนอนุภาคก่อนกำเนิดมีปริมาณน้อยในช่วงแรก เป็นผลให้อนุภาคปฐมภูมิที่ได้ในต่อมามีขนาดเพิ่มขึ้น จากเหตุผลที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น

### 2.1.2 การอบแห้ง

การอบแห้งเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งในการเตรียมวัสดุรูพรุน โดยกระบวนการโซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน (Sol-gel Polycondensation) ซึ่งในแต่ละวิธีของการอบแห้งนั้นมีผลต่อลักษณะรูพรุนของ RF gel และ Carbon gel ที่ได้ โดยส่วนใหญ่วิธีที่ใช้ในการอบแห้งนั้นจะนิยมใช้กันอยู่ทั้งหมด 4 วิธี ดังนี้

*การอบแห้งด้วยลมร้อน (Subcritical Drying)* เป็นการระเหยสารละลายที่อยู่ในโครงสร้างของเจลด้วยลมร้อนที่ความดันบรรยากาศ RF gel ที่ได้จากการอบแห้งด้วยวิธีนี้จะเรียกว่า “RF xerogel” จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การอบแห้ง RF gel ด้วยวิธีนี้จะทำให้คุณสมบัติความเป็นรูพรุนนั้นค่อนข้างต่ำ เนื่องจากว่าจะเกิดการหดตัวของเจลอย่างมากขณะทำการอบแห้ง โดยขนาดของการหดตัวนี้จะขึ้นอยู่กับอัตราเร็วของลมร้อนที่ใช้ในการอบแห้งและขนาดของ RF gel ซึ่งขนาดของการหดตัวจะสูงเมื่ออัตราเร็วของลมร้อนมีค่ามากหรือ RF gel ที่นำมาอบแห้งนั้นมีขนาดใหญ่ [H. Tamon et.al., 2000] แต่ถ้าให้อัตราเร็วของลมร้อนต่ำก็จะทำให้เวลาที่ใช้ในการอบแห้งนั้นนานขึ้นด้วย

*การอบแห้งด้วยสภาวะเหนือวิกฤติ (Supercritical Drying)* เป็นการทำให้สารละลายที่อยู่ในโครงสร้างของ RF gel อยู่ในสภาวะเหนือวิกฤติหลังจากนั้นจะทำการปล่อยสารละลาย (ก๊าซคาร์บอน ไดออกไซด์เหลว) อีกตัวหนึ่งที่มีแรงตึงผิวต่ำกว่าเข้าไปแทนที่แล้วปล่อยอากาศที่สภาวะเหนือวิกฤติที่อัตราเร็วต่ำๆ ตามเข้าไปเพื่อกำจัดสารละลาย (ก๊าซคาร์บอน ไดออกไซด์เหลว) ที่อยู่ในโครงสร้างของ RF gel ออกไป โดย RF gel ที่ได้จากการอบแห้งด้วยวิธีนี้จะเรียกว่า “RF aerogel” ซึ่งการอบแห้งด้วยวิธีนี้จะแก้ปัญหาเรื่องการหดตัวของ RF gel หลังการอบแห้ง [S. Berthhon et.al., 2001]

*การอบแห้งแบบเย็นเยือก (Freeze Drying)* ใช้หลักการระเหิดตัวทำละลายออกจากรูพรุนของ RF gel โดยการทำให้สารละลายที่อยู่ในโครงสร้างของ RF gel เกิดการแข็งตัวที่อุณหภูมิเย็นเยือก (Pre-Freezing) หลังจากนั้นทำการระเหิด (Sublimation) สารละลายออกมา โดย RF gel ที่ได้จากการอบแห้งด้วยวิธีนี้จะเรียกว่า “RF cryogel” ซึ่งการอบแห้งด้วยวิธีนี้จะช่วยแก้ปัญหาเรื่องการหดตัวของ RF gel หลังการอบแห้งด้วย โดยพบว่า Carbon cryogel ที่ได้จากการอบแห้งด้วยวิธีนี้จะมีพื้นที่ผิวจำเพาะมากกว่า 800 ตารางเมตรต่อกรัม และปริมาตรของรูพรุนสูงกว่า 0.55 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกรัม [H. Tamon et.al., 1999, T. Yamamoto et.al., 2002] แต่พื้นที่ผิวจำเพาะและปริมาตรรูพรุนแบบมีไซของ Carbon cryogel จะมีค่าต่ำกว่า Carbon aerogel



จากวิธีการอบแห้ง 3 วิธีข้างต้นพบว่าแต่ละวิธีจะมีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน โดยการอบแห้งด้วยลมร้อนจะมีปัญหาเรื่องการหดตัวของ RF gel และเวลาที่ใช้ในการอบแห้งส่วนการอบแห้งด้วยสภาวะเหนือวิกฤติและการอบแห้งแบบเย็นเยือกถึงแม้จะช่วยแก้ปัญหาเรื่องการหดตัวของ RF gel แต่ค่าใช้จ่ายในการอบแห้งค่อนข้างสูงดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ศึกษาวิธีการอบแห้งโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave Drying) เพื่อแก้ปัญหาในเรื่องเวลา และค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการอบแห้ง

*การอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave Drying)* เป็นการทำให้สารละลายที่อยู่ในโครงสร้างของเจลเกิดการระเหยเมื่อได้รับพลังงานความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟโดย RF gel ที่ได้จาก การอบแห้งด้วยวิธีนี้จะเรียกว่า “RF MW gel” สำหรับการอบแห้งด้วยวิธีนี้พบว่าเมื่อค่า C/W ที่ใช้ในการเตรียม Carbon MW gel มีค่ามากกว่า 20 โมลต่อลูกบาศก์เมตร สมบัติความเป็นรูพรุนของ Carbon MW gel นั้นค่อนข้างต่ำมาก [H. Tamon et.al., 2003] เมื่อเปรียบเทียบกับ Carbon aerogel และ Carbon cryogel แต่สูงกว่า Carbon xerogel สำหรับคุณสมบัติของคลื่นไมโครเวฟมีดังต่อไปนี้

#### ก. คุณสมบัติของคลื่นไมโครเวฟ

คลื่นไมโครเวฟมีคุณสมบัติเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ามีลักษณะเหมือนแสงที่เคลื่อนที่เป็นเส้นตรง และสามารถทะลุผ่านสสารที่มีความโปร่งใสได้ โดยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจะมีความยาวคลื่นและความถี่ที่แตกต่างกับคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าชนิดอื่น ๆ ก็อยู่ในช่วงของคลื่นวิทยุกับรังสีอินฟราเรด ความยาวคลื่นของแม่เหล็กไฟฟ้าจะแปรผกผันกับความถี่ซึ่งมีความถี่อยู่ในช่วงประมาณ 300 MHz ถึง 300 GHz คลื่นไมโครเวฟสามารถที่จะสะท้อนและหักเหกับโลหะและตัวกลางอื่นๆ ได้ แต่ไม่ทุกชนิด เช่น แก้วบางชนิด กระจกและพลาสติก คลื่นไมโครเวฟสามารถถูกดูดกลืนได้ด้วยสารจำพวกไดอิเล็กตริก (dielectric) เช่น น้ำ เมื่อคลื่นไมโครเวฟวิ่งเข้าไปชนวัตถุหนึ่งๆและถูกสะท้อนกลับแสดงว่ามันไม่สามารถให้ความร้อนกับวัตถุชิ้นนั้นได้ มันจะให้ความร้อนเฉพาะกับวัตถุที่ดูดกลืนมันเท่านั้น ในการให้ความร้อนมันจะสูญเสียพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้า (Loss factor) ดังนั้นวัตถุที่ดูดกลืนไมโครเวฟได้สูงสามารถถูกทำให้ร้อนได้ง่ายด้วยคลื่นไมโครเวฟ

#### ข. กลไกการให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ

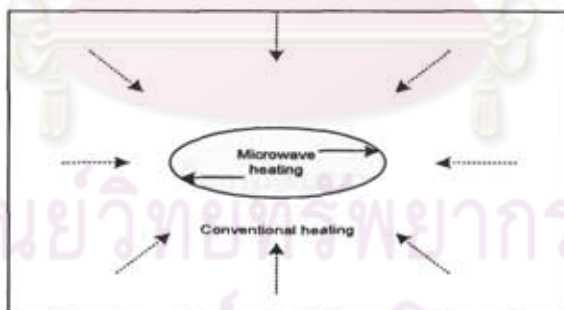
วัตถุโดยทั่วไปจะประกอบไปด้วยอนุภาคประจุไฟฟ้าบวก และอนุภาคประจุไฟฟ้าลบ จำนวนเท่าๆ กัน จึงทำให้วัตถุนั้นแสดงความเป็นกลางทางไฟฟ้า ซึ่งเรียกว่า “สารไดอิเล็กตริก” แต่เมื่อนำไปวางในสนามแม่เหล็กไฟฟ้า โมเลกุลเหล่านี้จะถูกเหนี่ยวนำทำให้เกิดการเคลื่อนที่ไปในทิศทางต่างๆ และพยายามเรียงตัวตามสนามแม่เหล็กไฟฟ้า ในสนามแม่เหล็กไฟฟ้านี้โมเลกุลจะพยายามทำตัวเหมือนมีสองขั้วและหมุนรอบตัวตามแกน โมเลกุลเหล่านี้จะจัดเรียงตัวตามแนวขั้วบวกและขั้วลบ กระแสไฟฟ้าทั่วไปจะเปลี่ยนทิศทางกลับไปกลับมา 60 ครั้งใน 1 วินาที ในทำนองเดียวกันคลื่นไมโครเวฟที่มีความถี่ในช่วง 915-2450 เมกกะเฮิร์ต เมื่อถูกผ่านเข้าไปในโมเลกุลทำให้โมเลกุลที่มีขั้วมีแนวโน้มที่จะเรียงตัวเป็นเส้นตรงตามสนามแม่เหล็ก แต่

สนามแม่เหล็กจะกลับไปกลับมา 915-2540 ล้านครั้งต่อวินาที โมเลกุลซึ่งพยายามจะแกว่งที่ความถี่นั้นจะทำให้เกิดแรงเสียดทานระหว่างโมเลกุลจึงทำให้เกิดความร้อนขึ้นอย่างรวดเร็ว

จากการที่สารไดอิเล็กตริกสามารถทำให้ร้อนขึ้นได้จากการให้พลังงานของคลื่น ไมโครเวฟเข้าไปโดยความร้อนที่เกิดขึ้น มาจากการจัดเรียงตัวของสารไดอิเล็กตริกตามขั้วไฟฟ้าภายใต้สนามแม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งมีการสลับไปมาอย่างรวดเร็วเรียกว่า “การไดโพลโรเทชัน” (Dipole rotation) ผลจากการเกิดไดโพลโรเทชันทำให้สารไดอิเล็กตริกร้อนขึ้นอย่างรวดเร็ว ยกตัวอย่างเช่น โมเลกุลของน้ำ ซึ่งปกติเป็น โมเลกุลที่มีขั้ว ภายใต้ภาวะปกติโมเลกุลของมันจะจัดเรียงตัวแบบอิสระ แต่เมื่อมันมีสนามไฟฟ้ามากระทำ มันจะพยายามจัดเรียงตัวตามสนามไฟฟ้า ผลจากการสลับไปมาของขั้วไฟฟ้า ทำให้โมเลกุลของมันต้องปรับตัวตามการเปลี่ยนแปลงมีผลทำให้ความร้อนเกิดขึ้น อันเนื่องมาจากการเสียดสีกันในระหว่างการหมุนของโมเลกุลตามสนามไฟฟ้า

### ก. ความแตกต่างของการให้ความร้อน

การให้ความร้อนจากคลื่น ไมโครเวฟเมื่อเปรียบเทียบกับการให้ความร้อนโดยทั่วไป เช่น การใช้เปลวไฟโดยตรง การแผ่รังสี และการใช้อากาศร้อน แหล่งความร้อนจะให้โมเลกุลของวัตถุร้อนจากภายนอกเข้าไปข้างใน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Temperature gradient) ซึ่งอาจจะเผาไหม้ส่วนนอกก่อนที่อุณหภูมิข้างในจะสูงถึงระดับที่ต้องการ ในทางตรงข้ามไมโครเวฟจะทะลุทะลวงวัตถุที่หนาหลายๆ เซนติเมตรพร้อมกันหมด ทำให้โมเลกุลที่มีขั้วสั่นสะเทือนในเวลาเดียวกันจะ ไม่มีการนำความร้อนจากผิวนอกเข้าไปข้างใน แต่ความร้อนจะถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วพร้อมๆ กันทั่ววัตถุ ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงการให้ความร้อนแบบธรรมดาเปรียบเทียบกับการให้ความร้อนด้วยคลื่น ไมโครเวฟ

### 2.1.3 การเผาให้เป็นคาร์บอน (Carbonization)

การเผาให้เป็นคาร์บอนเป็นขั้นตอนที่ทำให้วัสดุอินทรีย์เกิดการแตกตัวทางเคมีของสารที่ไม่ใช่คาร์บอน เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน และไฮโดรเจน ออกมาในรูปของแก๊สทำให้ได้โครงสร้างที่เกือบจะเป็นคาร์บอนที่บริสุทธิ์ โดยการเผาในบรรยากาศเฉื่อยที่อุณหภูมิประมาณ 400-600 องศาเซลเซียส



สำหรับโครงสร้างของ RF Gel ที่ผ่านกระบวนการเผาให้เป็นคาร์บอน (Carbonization) เรียกว่า “Carbon gel” การเผาให้เป็นคาร์บอนของ RF Gel โดยส่วนมากแล้วมักกระทำในเตาเผาแบบท่อ (Tube Furnace) โดยมีก๊าซเช่น ไนโตรเจน ฮีเลียม เป็นต้น ไหลผ่านด้วยอัตราการไหลเชิงปริมาตรคงที่และเพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิต่ำไปจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการ และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าขั้นตอนในการเผาให้เป็นคาร์บอนนั้นมีผลต่อความเป็นรูพรุนของ Carbon gel ที่ได้ ดังตารางที่ 2.1 ซึ่งแสดงสภาวะต่างๆ ในกระบวนการเผาให้เป็นคาร์บอนว่ามีผลต่อลักษณะสมบัติรูพรุนของคาร์บอนเจลอย่างไร

สภาวะที่ปรับเปลี่ยน	อิทธิพล
1. เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการเผาให้เป็นคาร์บอน	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ลดองค์ประกอบออกซิเจน</li> <li>- คาร์บอนเจลที่ได้มีพื้นที่ผิวลดลง</li> <li>- ปริมาตรรูพรุนมีค่าลดลง</li> <li>- เพิ่มการกระจายขนาดรูพรุนขนาดแมโคร (Macropore Size Distribution)</li> <li>- เพิ่มการกระจายขนาดรูพรุนขนาดมีโซ (Mesopore Size Distribution)</li> </ul>
2. เพิ่มระยะเวลาการเผาให้เป็นคาร์บอน	- เพิ่มขนาดรูพรุน ปริมาตร และพื้นที่ผิว

ตารางที่ 2.1 การเปลี่ยนสภาวะการเผาให้เป็นคาร์บอนที่ส่งผลกระทบต่อลักษณะสมบัติรูพรุนของคาร์บอนเจล [J.A. Ritter et.al., 2003]

จากที่การเผาให้เป็นคาร์บอนเป็นการกลั่นสลายของสารอินทรีย์เพื่อเพิ่มปริมาณคาร์บอนในสารอินทรีย์ โดยจะเกิดการหักออกของโมเลกุลตรงบริเวณที่มีพันธะอ่อน ทำให้กลุ่มโมเลกุลที่เป็นวงแหวนแตกออกจากกันเป็นกลุ่มๆ จำนวนมาก ส่งผลให้เกิดรูพรุนและช่องว่างภายใน Carbon gel ซึ่งการจัดเรียงตัวของคาร์บอนอะตอมจะเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิที่เผาทำให้สมบัติความเป็นรูพรุนของ Carbon gel ที่ได้แตกต่างกัน โดยส่วนมากจะใช้อุณหภูมิในช่วง 600 – 2100 องศาเซลเซียส [T. Yamamoto et.al., 2001, J.L. Kaschmitter et.al., 1998]

ผลของการเผาให้เป็นคาร์บอนนั้นทำให้รูพรุนแบบแมโครของ Carbon gel นั้นลดลง เนื่องจากการหดตัวของ RF gel แต่จะทำให้รูพรุนแบบไมโครและมีโซเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้พื้นที่ผิวจำเพาะของ Carbon gel นั้นเพิ่มขึ้นด้วย [H. Tamon et.al., 1997]

## 2.2 การใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการเคมี (Sonochemistry)

อิทธิพลทางเคมีและสมบัติเชิงกลของคลื่นเหนือเสียงมีสาเหตุมาจากการเกิดและการยุบตัวของฟองควิวเทชัน (Cavitation bubble) ซึ่งถูกสร้างขึ้นระหว่างช่วงขยายของคลื่นเหนือเสียง และเกิดการยุบตัวอย่างรวดเร็ว (Collapse) ในช่วงของการอัดตัว (Compression) การสั่นของคลื่นเหนือเสียงจะช่วยลดความหนาของชั้นฟิล์มและของเหลวซึ่งเป็นการเพิ่มการถ่ายเทแก๊ส (Gas transfer) การยุบตัวอย่างรวดเร็วของฟองควิวเทชันจะทำให้เกิดจุดความร้อน (Local temperature) ซึ่งมีอุณหภูมิที่สูง และความดันจากการยุบตัวของฟองควิวเทชันที่รุนแรง แม้ว่าสภาวะที่รุนแรงนี้จะเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่สั้น ๆ แต่ผลของมันก็สร้างอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา เช่น  $H\cdot, OH\cdot$  [A. Henglein et.al., 2003]

สำหรับงานวิจัยที่ใช้คลื่นเหนือเสียงช่วยในการสังเคราะห์ Carbon gel นั้นยังมีไม่มากนัก แต่ในงานวิจัยของ Tonanon และคณะ (2004) ได้ใช้คลื่นเหนือเสียงในการสังเคราะห์ Carbon gel จาก ริโซซินอลกับฟอร์มัลดีไฮด์ โดยใช้กำลังของคลื่นเหนือเสียง ในช่วง 0-30 วัตต์ และทำการปรับเปลี่ยนค่า C/W 3 ค่า (20, 40, 80 mol/m<sup>3</sup>) พบว่าเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ Carbon gel นั้นลดลงอย่างมาก และที่ C/W เท่ากับ 20 และ 80 โมลต่อลูกบาศก์เมตร พบว่าคลื่นเหนือเสียงจะช่วยทำให้ค่า  $R_p$  (Peak radius) ของการกระจายตัวของรูพรุน (Pore size distribution) ใน Carbon gel นั้นสูงขึ้น แต่กำลังของคลื่นเหนือเสียงนั้น ไม่มีผลต่อสมบัติความเป็นรูพรุนแบบมีโซ (mesopore) ของ Carbon gel นอกจากนี้ที่ C/W เท่ากับ 80 โมลต่อลูกบาศก์เมตร Carbon gel ที่สังเคราะห์โดยใช้คลื่นเหนือเสียงสามารถรักษาสมบัติความเป็นรูพรุนไว้ได้ ซึ่งแตกต่างจาก Carbon gel ที่ไม่ได้ใช้คลื่นเหนือเสียงในการสังเคราะห์นั้นจะไม่มีรูพรุนเหลืออยู่

จากการที่คลื่นเหนือเสียงมีผลต่อการสังเคราะห์วัสดุรูพรุน โดยเกี่ยวข้องกับการเกิดและการยุบตัวของฟองควิวเทชัน (Cavitation bubble) ขณะเกิดปฏิกิริยาเคมีซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสมบัติของวัสดุรูพรุน ดังนั้นการควบคุมการเกิดฟองควิวเทชันจึงมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีด้วย โดยปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเกิดควิวเทชันมีดังต่อไปนี้

### ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อควิวเทชัน

ปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อความรุนแรงของควิวเทชันซึ่งเป็นผลโดยตรงต่ออัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาหรือผลได้ของปฏิกิริยา (Yield) เงื่อนไขเหล่านี้เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิ ความดัน ความถี่ของคลื่นเหนือเสียง กำลังของคลื่นเหนือเสียง ความเข้มของคลื่นเหนือเสียง และปัจจัยอื่น ๆ ที่รวมไปถึงธรรมชาติของก๊าซที่ละลายในของเหลว ตัวทำละลาย การเตรียมตัวอย่าง ดังรายละเอียดต่อไปนี้



### ธรรมชาติของก๊าซที่ละลายในของเหลว

ก๊าซที่ละลายแสดงการเกิดของควาวิเทชัน (Cavitation) ก๊าซจะถูกเคลื่อนย้ายจากของผสมที่ทำปฏิกิริยาเนื่องจากการระเบิดจากการยุบตัวอย่างรวดเร็วของฟองควาวิเทชันมีอยู่ทั่วทั้งของผสมและมีผลต่อการเกิดขึ้นของควาวิเทชัน แต่ชนิดของก๊าซก็มีความสำคัญ ก๊าซที่มีสัดส่วนของความร้อนจำเพาะ (Specific heat ratio) สูงจะมีผลต่อการเกิดควาวิเทชันมากกว่าก๊าซที่มีสัดส่วนความร้อนจำเพาะต่ำ เนื่องจากการยุบตัวอย่างรวดเร็วของฟองเกิดขึ้นในช่วงเวลาน้อย โดยสมมติฐานว่าเป็นการยุบตัวของฟองควาวิเทชันแบบกระบวนการไม่สูญเสียความร้อน (Adiabatic)

ก๊าซโมเลกุลเดี่ยวเช่น อาร์กอน ฮีเลียม เปลี่ยนเป็นพลังงานจำนวนมากกว่าควาวิเทชันสูงกว่าพวก Diatomic gas เช่น  $N_2$ ,  $O_2$  เนื่องจากมีสัดส่วนความร้อนจำเพาะมากกว่า

ค่าสภาพการนำความร้อน (Thermal conductivity) ของก๊าซมีความสำคัญเนื่องจาก ก๊าซที่มีค่าสภาพการนำความร้อนสูงกว่าจะทำให้อุณหภูมิที่เกิดจากการยุบตัวอย่างรวดเร็วของควาวิเทชันน้อยกว่าก๊าซที่มีค่าสภาพการนำความร้อนต่ำกว่า เนื่องด้วยความร้อนปริมาณน้อยของก๊าซที่มีค่าสภาพการนำความร้อนสูงกว่าจะถ่ายเทไปสู่กระแสน้ำของของเหลวผสมที่ทำปฏิกิริยาระหว่างที่เกิดการยุบตัวอย่างรวดเร็วเป็นปริมาณที่มากกว่า

สภาพการละลายได้ (Solubility) ของก๊าซในของเหลวมีผลต่อการเกิดควาวิเทชัน ดังนั้นก๊าซที่มีค่าสภาพการละลายได้ของก๊าซสูงจึงมีแนวโน้มอย่างมากที่จะแพร่เข้าสู่ฟองควาวิเทชันง่ายซึ่งจะช่วยในการเกิดฟองควาวิเทชันได้จำนวนมาก

ในปี 1997 Entezari และคณะได้ศึกษาลักษณะการละลายได้ของก๊าซที่มีผลต่อความเข้มข้นของควาวิเทชัน โดยศึกษาอิทธิพลของคลื่นเหนือเสียงต่ออัตราเร็วของการสลายคาร์บอน ไดซัลไฟด์ (Carbon disulfide) พบว่า ฮีเลียมให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเร็วกว่าคาร์บอน ไดออกไซด์ ซึ่งอัตราการลดลงของอัตราเร็วเป็นไปตามชนิดของก๊าซดังนี้  $He > H_2 > Ar > O_2 > CO_2$  แม้ว่าก๊าซอาร์กอนจะมีค่าสัดส่วนความร้อนจำเพาะสูงกว่าฮีเลียม ทำให้ Entezari และคณะค่อนข้างแปลกใจกับผลการทดลองที่ได้และได้สรุปว่าอิทธิพลที่มีผลในระบบเกิดจากสภาพการละลายได้ของก๊าซซึ่งอาร์กอนมีสภาพการละลายได้ต่ำกว่าฮีเลียม สภาพการละลายได้สูงของฮีเลียมทำให้มีแหล่งกำเนิดต่อการเกิดควาวิเทชันมาก

### อุณหภูมิต่ำ

ในการเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยาทำให้ลดอิทธิพลของการเกิดปฏิกิริยาด้วยคลื่นเหนือเสียง (Sonochemistry) การลดลงของอัตราเร็วเกิดเนื่องมาจากอย่างแรกคือ เมื่ออุณหภูมิของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ความดันไอของระบบจะเพิ่มขึ้น (สร้างฟองได้ง่ายเพราะเป็นการลดควาวิเทชันเทรชโฮลด์ (Cavitation threshold)) อย่างไรก็ตามฟองที่ถูกสร้างขึ้นจำนวนมาก ๆ จะลดอิทธิพลของคลื่นเหนือเสียงเพราะจะไปลดการระเบิด (Cushion) เนื่องจากการยุบตัวอย่างรวดเร็วของฟอง โดยใช้เอนทัลปี

ปีที่สร้างขึ้นในการกลั่นตัวของไอ โดยปกติแล้วปฏิกิริยาเคมีภายใต้คลื่นเหนือเสียงจะมีอิทธิพลมากที่สุดที่อุณหภูมิต่ำ ๆ เมื่อฟองประกอบด้วยก๊าซเป็นองค์ประกอบหลัก

ในปี 1981 Sehgal และ Wang สังเกตว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นอย่างมีขีดจำกัดเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ และลดลงเมื่อลดอุณหภูมิ ในการเกิดปฏิกิริยาคีตราเคชั่น (Degradation) ของ Thymine อิทธิพลของอุณหภูมิที่ถูกสังเกต โดยมีอิทธิพลต่อจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาเคมีที่มีฟองควาเวชัน (Cavitation bubble) รอบ ๆ เหตุผลที่อธิบายปรากฏการณ์นี้เนื่องด้วย Thymine เป็นสารที่ไม่ระเหย โดยปฏิกิริยาคีตราเคชั่น (Degradation) เกิดขึ้นในฟิล์มของก๊าซและของเหลวที่อยู่ระหว่างฟองควาเวชันและกระแสน้ำของเหลวที่ทำปฏิกิริยา ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการแพร่ของ Thymine จากกระแสน้ำของเหลวเข้าสู่พื้นที่ที่เข้าทำปฏิกิริยาจะถูกเร่งขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอุณหภูมิก็คงเกิดการลดความเข้มข้นของควาเวชันด้วย ด้วยเหตุนี้จึงเป็นการลดจำนวนอนุภาคอิสระที่ถูกผลิตขึ้นในฟอง (คาดคะเนว่าอนุภาคอิสระถูกใช้สำหรับการเกิดปฏิกิริยาคีตราเคชั่น (Degradation) และจากการแพร่ของไอของสารตั้งต้นในควาเวชันเข้าสู่ชั้นฟิล์มของก๊าซและของเหลว)

#### ความดัน

การเพิ่มความดันให้กับปฏิกิริยา โดยปกติแล้วผลของมันจะเพิ่มอิทธิพลของปฏิกิริยาภายใต้คลื่นเหนือเสียง เนื่องจากการลดลงของของผสม การลดความดัน ไอจะเพิ่มความเข้มข้นของควาเวชันเนื่องจากการยุบตัวอย่างรวดเร็วของฟอง ดังนั้นจึงเป็นการสร้างพลังงานบนควาเวชัน

อย่างไรก็ตามสิ่งนี้ก็ยังมีขอบเขตจำกัด โดยในปี 1983 และ 1987 Moulton และคณะได้ทดสอบปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) ภายใต้คลื่นเหนือเสียงของน้ำมันถั่วเหลือง ขณะที่ดำเนินการปฏิกิริยาที่ 200 psig และมากกว่านั้น พบว่าคลื่นเหนือเสียงมีอิทธิพลน้อยมากต่ออัตราการเร่งปฏิกิริยา ขณะที่ความดันลดลงเป็น 115 psig อิทธิพลของคลื่นเหนือเสียงกลับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดูเหมือนว่าการดำเนินการปฏิกิริยาที่ความดัน 200 psig และมากกว่านั้น จะเป็นการเพิ่มควาเวชันเทรชโฮลด์ (Cavitation threshold) ในระบบสุญญากาศที่ซึ่งฟองควาเวชันไม่สามารถที่จะถูกผลิตให้อยู่อย่างยาวนานหรือถูกผลิตได้จำนวนน้อย ดังนั้นจึงไม่มีอิทธิพลที่มีนัยสำคัญต่อปฏิกิริยา

#### การเลือกตัวทำละลาย

ควาเวชันถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีความดันไอมาก ความหนืดต่ำ และแรงตึงผิวต่ำ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของควาเวชันจะมีประโยชน์ต่อปฏิกิริยาเมื่อดำเนินการภายใต้เงื่อนไขที่ตรงข้ามจากที่ได้กล่าวมา

ในปี 1987 Lorimer และ Mason ได้ตรวจสอบอิทธิพลทางธรรมชาติของแรงยึดเหนี่ยวของตัวทำละลายบนควาเวชันและพบว่าควาเวชันที่มีความเข้มข้นมากเกิดขึ้นในตัวทำละลายที่มีความหนืดมาก นักวิจัยท่านอื่น ๆ พบว่าควาเวชันถูกยับยั้งเมื่อใช้ตัวทำละลายที่ระเหยได้มาก



### ความถี่ของคลื่นเหนือเสียง

ความถี่ของคลื่นเหนือเสียงมีอิทธิพลอย่างมีนัยบนกระบวนการสร้างควาเวชันเนื่องจากสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดวิกฤตของฟองควาเวชัน เมื่อความถี่ของคลื่นเหนือเสียง สูง อิทธิพลของความเข้มของควาเวชันจะลดลงเนื่องจากเวลาในรอบของการขยายตัวของของเหลว ในช่วงความดันลดซึ่งไม่เพียงพอที่จะเริ่มต้นสร้างควาเวชัน หรือ ไม่ก็ช่วงการอัดเกิดขึ้นเร็วกว่าเวลาที่ใช้สำหรับการที่ฟองอากาศเล็ก ๆ จะยุบตัวอย่างรวดเร็ว ไม่อย่างใดก็อย่างหนึ่ง

คลื่นเหนือเสียงที่มีความถี่ต่ำจะทำให้ผลของการยุบตัวอย่างรวดเร็วของควาเวชันเป็นไปอย่างรุนแรงทำให้ได้อุณหภูมิเฉพาะจุดที่สูงและความดันที่สูงอย่างไรก็ตามมีงานวิจัยบางส่วนพบว่า ที่ความถี่สูงทำให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยามีค่าเพิ่มขึ้นเช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน เนื่องด้วยเมื่อให้ความถี่สูงอาจจะช่วยเพิ่มจำนวนอนุภาคลิเธเร (แม้ว่าจะลดความรุนแรงของการยุบตัวของควาเวชันไปมาก) เพราะจำนวนของควาเวชันที่มีมากขึ้น ดังเช่น ในปี 1996 Francoey และ Petrier พบว่า อัตราการสลายตัวของคาร์บอนเตตระคลอไรด์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ความถี่คลื่นเหนือเสียงเป็น 500 กิโลเฮิร์ต เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้คลื่นเหนือเสียงที่มีความถี่ 20 กิโลเฮิร์ต แต่ถ้าใช้ความถี่ที่สูงมากๆ อิทธิพลของควาเวชันก็จะลดลง

### กำลังของคลื่นเหนือเสียง

นักวิจัยหลายคนพบว่ากำลังของคลื่นเหนือเสียง ที่ส่งผ่านสู่ของผสมที่ทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น จะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นแต่เมื่อถึงจุดสูงสุดจะลดลงเมื่อมีการเพิ่มกำลังของคลื่นเหนือเสียง (จากงานของ Gutierrez และ Henglein ในปี 1990) ความเป็นไปได้ที่อธิบายสาเหตุนี้คือที่กำลังของคลื่นเหนือเสียงมากความหนาแน่นของควาเวชัน (เปรียบเสมือนกลุ่มหมอก) ที่ถูกสร้างขึ้นก็จะมากบริเวณที่ปลายของแหล่งกำเนิดของคลื่นเหนือเสียง ซึ่งจะขัดขวางการส่งผ่านพลังงานจากแหล่งกำเนิดสู่ของไหล (จากงานของ Ratoasinoro และคณะในปี 1995, Contamine และคณะในปี 1994) และ ในปี 1997 Whillock และ Harvey ได้เสนอว่ากำลังของคลื่นเหนือเสียงที่เหมาะสมจะขึ้นกับความถี่ที่ใช้

## 2.3 เอนไซม์และการตรึงเอนไซม์

เอนไซม์ (Enzyme) คือ ตัวเร่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่เกิดในสิ่งมีชีวิต (biocatalyst) ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นได้ถึง  $10^4 - 10^8$  เท่าของปฏิกิริยาเดิมที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้น สารที่เข้าทำปฏิกิริยากัน (reactant) มีชื่อเรียกว่าสับสเตรท (substrate) โดยส่วนใหญ่แล้ว เอนไซม์ชนิดหนึ่ง ๆ จะสามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะเท่านั้น นั่นคือ เอนไซม์เป็นตัวเร่งที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรท



ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ จะขึ้นอยู่กับโครงรูป (conformation) ของโปรตีน เพื่อแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโครงสร้างของเอนไซม์ที่มีต่อการทำงาน จะเห็นว่าสายพอลิเพปไทด์ (polypeptide chain) ของเอนไซม์ไม่ได้อยู่ในรูปเส้นตรง แต่จะอยู่ในรูปที่พันกัน (folding) มีผลทำให้หมู่แขนงข้าง R (side chain R group) ของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา (active amino acid) ซึ่งจะอยู่ห่างกันมากถ้าสายพอลิเพปไทด์ไม่เกิดการพันกันจนเป็นก้อนให้เข้ามาอยู่ใกล้กันเกิดเป็นบริเวณแอคทีฟ (active site) ของเอนไซม์ บริเวณแอคทีฟของเอนไซม์นี้จะมีกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็นบริเวณจับ (binding site) สำหรับสับสเตรต โคเอนไซม์ โคแฟกเตอร์ หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรต และจะมีกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างหรือการแตกออกของพันธะ [T. Yamamoto et.al, 2002]

การเร่งปฏิกิริยา (catalysis) หมายถึงการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายใต้การทำงานของสารที่เรียกว่า ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ในการเร่งปฏิกิริยา ตัวเร่งจะเข้าร่วมทำปฏิกิริยาเกิดเป็นปฏิกิริยาขั้นตอนมูลฐานต่าง ๆ (elementary step) และในปฏิกิริยาขั้นตอนมูลฐานสุดท้ายจะให้ตัวเร่งที่ไม่มีเปลี่ยนแปลงทางเคมีกลับคืนมา ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาขณะที่ไม่มีตัวเร่ง กับปฏิกิริยาที่มีตัวเร่ง จะพบว่าปฏิกิริยาขณะที่มีตัวเร่งจะมีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับจำนวนและชนิดของปฏิกิริยาขั้นตอนมูลฐานที่เกิด นอกจากนี้ตัวเร่งจะไม่ทำให้ค่าสมมูลคงที่ของปฏิกิริยาเปลี่ยนไป โดยตัวเร่งเพียงแต่ไปทำให้อัตราเร็วคงที่ของปฏิกิริยาไปทางขวา (forward reaction) และของปฏิกิริยาทวนกลับ (reverse reaction) เพิ่มขึ้นในปริมาณที่เท่า ๆ กันเท่านั้น และเมื่อพิจารณาถึงการทำงานของเอนไซม์ จะเห็นว่าเอนไซม์ก็คือตัวเร่งของปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ ที่เกิดในสิ่งที่มีชีวิตนั่นเอง [7] คุณสมบัติเหล่านี้ได้แก่

1. เอนไซม์ในปริมาณน้อย ๆ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. เอนไซม์จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี หลังจากทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาแล้ว
3. เอนไซม์ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงค่าผลต่างของพลังงานอิสระ (free energy change,  $\Delta G$ ) หรือค่าสมมูลคงที่ (equilibrium constant,  $K_{eq}$ ) ของปฏิกิริยาได้

### 2.3.1 กระบวนการตรึงเอนไซม์

กระบวนการตรึงเอนไซม์ (enzyme immobilization) เป็นกระบวนการปรับปรุงความสามารถของเอนไซม์ประเภทหนึ่ง โดยการนำเอนไซม์ไปเกาะหรือยึดติดบนตัวรองรับ (supports) ด้วยเทคนิคกระบวนการต่าง ๆ ถึงแม้เอนไซม์อิสระ (free enzyme) จะมีข้อดีหลายประการ แต่การนำเอนไซม์มาใช้ในระดับอุตสาหกรรมมีข้อจำกัด

หากจะพิจารณาถึงข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระนั้นมีอยู่มากมายหลายประการ

1. เอนไซม์อิสระไม่เสถียร
2. เอนไซม์อิสระใช้งานในลักษณะไม่ต่อเนื่อง หรือใช้ครั้งเดียว (batch)

3. เอนไซม์อิสระ ใน in vitro ใช้แบบ multi-enzymes system ไม่ได้
4. เอนไซม์อิสระจำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนใช้งานเพื่อให้มีแอกทิวิตีสูง
5. เอนไซม์อิสระจะผสมปนลงไปในการละลายของสับสเตรต และผลผลิตทำให้แยกออกไม่ได้ และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน จะปนเปื้อนในลักษณะสารปนเปื้อนโปรตีน (proteinaceous contaminants) โดยเฉพาะถ้าอยู่ในอาหารจะเกิดเป็นตะกอนเมื่อถึงระดับอุณหภูมิ พีเอชของโปรตีนชนิดนั้น แยกออกได้ต้องใช้กรรมวิธีเพิ่มขึ้น กล่าวคือ ผ่านหน่วยแยกอีกครั้ง
6. เอนไซม์อิสระมีสภาวะทำปฏิกิริยา (reaction condition) จำเพาะ ฉะนั้นบางครั้งอาจไม่เหมาะสมในกระบวนการแปรรูปอาหารบางกระบวนการ
7. เอนไซม์อิสระส่วนใหญ่ละลายน้ำ ละลายในสารละลายได้ ฉะนั้นจะนำมาใช้ในลักษณะตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดของแข็ง (solid catalyst) ไม่ได้ มีผลให้ไม่สามารถใช้กับเครื่องปฏิกรณ์ประเภทต่าง ๆ เช่น ฟลูอิดไดซ์เบด (fluidized bed) และ แพ็คเบด (packed bed) ในระบบต่อเนื่อง (continuous) ได้
8. เอนไซม์อิสระในอุตสาหกรรมมีต้นทุนการใช้งานสูงอันเนื่องมาจากการใช้งานได้ครั้งเดียว
9. เอนไซม์อิสระในเซลล์อินทรีย์ (intracellular enzymes) เมื่อนำมาใช้งานต้องผ่านกระบวนการสกัด และทำให้บริสุทธิ์ก่อน
10. เอนไซม์อิสระอาจก่อพิษต่อผู้ใช้ ในลักษณะของการสูดหายใจ การสัมผัสในปริมาณมาก

ด้วยขีดจำกัดเหล่านี้จึงนำไปสู่ทางออกในการแก้ปัญหาด้วยการนำเทคโนโลยีของเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ [T. Yamamoto et.al, 2002]

เอนไซม์ตรึงรูป หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้อยู่ในขอบเขตที่จำกัดไว้ โดยที่อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้น หรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวกลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา เทอมต่าง ๆ ที่ใช้เรียกเอนไซม์ดังกล่าวได้แก่ เอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzymes) เอนไซม์ที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble enzymes) เอนไซม์จับรูป (trapped หรือ entrapped enzyme) เอนไซม์ยึดรูป (fixed enzymes) และเอนไซม์พุงรูป (matrix-supported enzymes) โดยชื่อที่น่าจะเหมาะสมและใช้ได้กว้างกว่าชื่ออื่น ๆ เนื่องจากไม่ได้ระบุลักษณะให้จำเพาะทั้งสภาพและกรรมวิธีการเตรียม คือ เอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzymes) [T. Yamamoto et.al, 2002]

วิวัฒนาการของเอนไซม์ตรึงรูปมีมานาน ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1916 Nelson และ Griffin แห่งมหาวิทยาลัยโคลัมเบีย ได้ใช้ถ่านกัมมันต์ (active carbon) และ อะลูมินา (alumina) ดูดเอนไซม์เอาไว้ แล้วนำมาใช้ พบว่า เอนไซม์ยังมีกิจกรรม (activity) อยู่บ้าง จนกระทั่งปี ค.ศ. 1951 Campbell



และคณะ ได้นำแอนติเจน (antigen) ตรึงไว้บนเซลลูโลส (cellulose) โดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent bonding) แล้วแยกแอนติบอดี (antibody) ออกมาได้สำเร็จ จึงทำให้การตรึงรูปเอนไซม์เป็นที่น่าสนใจอย่างกว้างขวาง และมีการศึกษาวิจัยเพื่อหาตัวรองรับและวิธีตรึงรูปที่เหมาะสมมาอย่างต่อเนื่องจนปัจจุบัน

#### ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป

1. สามารถแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากสิ่งแวดล้อมที่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ง่าย
2. สามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ได้อีก
3. กระบวนการผลิตที่ใช้เอนไซม์ตรึงรูป สามารถนำมาทำในระบบต่อเนื่อง (continuous system) ได้
4. เอนไซม์บางชนิดหลังการตรึงรูปแล้ว จะมีคุณสมบัติบางประการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่เป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น ความเสถียรต่อความร้อน (thermal stability) การเก็บรักษา (storage) ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate specificity) ความไวในการตอบสนองต่อตัวยับยั้ง (sensitivity of inhibitor) อุณหภูมิ และความเป็นกรดค่าที่มีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น [T. Yamamoto et.al, 2002]
5. มีโอกาสเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ได้ถ้าวิธีเหมาะสม
6. ใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์ เอนไซม์ได้ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างตัวรองรับ และลักษณะสัณฐาน
7. เอนไซม์ที่นำมาตรึงรูป ไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดีเหมือนเอนไซม์บริสุทธิ์ ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีการตรึงรูป [T. Yamamoto et.al, 2002]

อย่างไรก็ตามในบางครั้งผลกระทบจากการเตรียมและการใช้เอนไซม์ตรึงรูปอาจมีบ้างดังนี้ [T. Yamamoto et.al, 2002]

กิจกรรมอาจจะถูกกระทบกระเทือน เนื่องจากการยึดโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวรองรับ มีผลให้โครงรูปสามมิติ (conformation) เปลี่ยนไป และอาจมีผลต่อหมู่เคมีที่อยู่ในบริเวณเร่งด้วย

มีปัญหาด้านการถ่ายเทมวล (mass transfer) กับสัณฐานที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือ สัณฐานมีลักษณะแขวนลอย (suspension) เมื่อพิจารณาถึงรูปของเอนไซม์ตรึงรูปอาจแบ่งได้ดังนี้

#### 1. อนุภาค (particles)

ตัวรองรับที่ใช้จะเป็นตัวกำหนดขนาดอนุภาค เช่น ทราช ผงคาร์บอน สารดูดซับ แก้วพรุน เปลือกไข่ โคลดิน และสารพอลิเมอร์ที่ทำเป็นแคปซูลเล็ก เป็นต้น ขนาดโดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 50-200 เมช มีรูปร่างทรงกลม

#### 2. เยื่อ (membranes) หรือ ฟิล์ม (film) หรือ แผ่น (plate)

เยื่อของเอนไซม์สามารถเตรียมได้ โดยการใช้ตัวรองรับตรึงรูป ให้อยู่ในลักษณะเยื่อ



ส่วนวิธีการครึ่งรูปนั้นทำได้หลายแบบ เช่น วิธีการเกาะกับตัวรองรับในลักษณะมีพันธะเคมี ฟิสิกส์ หรือไม่มีพันธะเคมี และวิธีการห่อหุ้มด้วยเยื่อ เป็นต้น

### 3. หลอด (tubes)

การทำเอนไซม์ครึ่งรูปแบบหลอด มีผู้ทดลองศึกษากันบ้าง แต่ไม่แพร่หลายเท่าการทำแบบเยื่อ ส่วนวิธีการครึ่งรูปสามารถทำได้หลายวิธีเช่นเดียวกับแบบอนุภาคและเยื่อ ตัวอย่างตัวรองรับที่เป็นหลอด ได้แก่ หลอดไนลอน หลอดพอลิอะมีโนสไตรีน (polyaminostyrene tube) และหลอดพอลิอะคริลอะไมด์ (polyacrylamide tube)

### 4. เส้นใย (fibers)

การทำเอนไซม์ให้อยู่ในรูปเส้นใย ได้มีผู้ศึกษากับเอนไซม์หลายชนิด และมักทำในลักษณะการห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในเส้นใยเซลลูโลสไดอะอะซิเตต โดยมีขั้นตอนการทำดังกล่าวได้สรุปคือ ผสมสารละลายเอนไซม์ในกลีเซอรอลที่ละลายลงในสารละลายของเซลลูโลสอะซิเตตที่ละลายในเมธิลีนคลอไรด์ กวนสารละลายนี้ช้า ๆ จนกระทั่งเกิดเป็นอิมัลชัน เมื่อแช่ในสารละลายอิมัลชันลงในภาชนะสำหรับตกตะกอนที่มีโทลูอีนพร้อม ๆ กับค่อย ๆ สปิน (spin) จะได้เส้นใย ทำเส้นใยที่ได้ให้แห้งโดยภาวะสูญญากาศเพื่อแยกตัวทำละลาย ตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้ทดลองทำโดยวิธีนี้ ได้แก่ อินเวอร์เทส แลคเทส

### 5. เยื่อกรองบางอัลตรา (ultrafiltration membranes)

การใช้เยื่อกรองบางอัลตรา เป็นตัวพุงของเอนไซม์นั้น ได้นำมาใช้ศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลายถึงระดับผลิตเชิงพาณิชย์ และเยื่อดังกล่าวก็สามารถนำไปใช้ในกระบวนการเอนไซม์อย่างต่อเนื่องได้ดี และอาจกล่าวได้ว่าการใช้เยื่อแบบนี้ไม่ต้องอาศัยวิธีการครึ่งรูปที่กล่าวไว้เลย นอกจากนี้ วิธีการใช้เอนไซม์แบบนี้สัปดาห์แรกต้องมีมวลโมเลกุลใหญ่ และผลผลิตมีมวลโมเลกุลเล็กเท่านั้น เพราะปฏิกิริยาเกิดขึ้นเฉพาะบนผิวเยื่อกรองบางอัลตรา

วิธีการครึ่งรูปเอนไซม์ แบ่งได้ 4 วิธี ดังนี้

#### 1. วิธีดูดซับบนตัวรองรับ (adsorption method)

วิธีนี้เอนไซม์จะถูกดูดซับอยู่บนตัวรองรับที่เป็นของแข็ง โดยใช้แรงต่าง ๆ เช่น แรงจากพันธะไอออนิก พันธะไฮโดรเจน และแรงดึงดูดไฮโดรโฟบิก ความแข็งแรงของพันธะระหว่างเอนไซม์กับพื้นผิวค่อนข้างอ่อน จึงมีความอ่อนไหว (sensible) ต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะโดยรอบ อาทิเช่น ค่าพีเอช ค่าความแข็งแรงทางไอออนิก (ionic strength) และอุณหภูมิ [52]

หากเมื่อพิจารณาถึงข้อดีของวิธีนี้ การที่มีแรงเกาะกันระหว่างตัวรองรับกับเอนไซม์อ่อนนั้น จึงทำให้สามารถนำตัวรองรับมาใช้ซ้ำได้ง่าย เหมาะกับตัวรองรับราคาแพง อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน มีภาวะไม่รุนแรง และใช้ได้กับเอนไซม์ทุกชนิด [T. Yamamoto et.al, 2002]

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการดูดซับนั้น คือ อัตราส่วนระหว่าง พื้นที่ผิวของตัวรองรับกับ

ปริมาตรของเอนไซม์ ขนาดของตัวรองรับ และอัตราส่วนระหว่างหมู่ไฮโดรฟิลิกกับหมู่ไฮโดรโฟบิก ตัวรองรับที่ใช้กันมาก ได้แก่ อะลูมินา (alumina) ซิลิกาเจล (silica gel) คอลลาเจน (collagen) คาลิโอไนท์ (kalionite) แคลเซียมคาร์บอเนต คาร์บอน เซลลูโลส และไคติน [H. Nishihara et.al, 2004]

## 2. วิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent linkage method)

เป็นวิธีการตรึงเอนไซม์กับตัวรองรับที่ไม่ละลายน้ำ ด้วยพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งเป็นพันธะที่เกิดจากอะตอมรวมกันโดยการถ่ายเทอิเล็กตรอนอย่างสมบูรณ์และมีการใช้อิเล็กตรอนร่วมกันการสร้างพันธะโคเวเลนต์ได้นั้น ต้องผ่านขั้นตอนของการสลายพันธะโคเวเลนต์เดิม การสร้างพันธะโคเวเลนต์เป็นกระบวนการที่ค่อนข้างรุนแรง จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมได้ การตรึงด้วยวิธีนี้เอนไซม์ไม่หลุดออกจากตัวรองรับโดยง่าย เนื่องจากมีพันธะยึดเหนี่ยวอย่างแข็งแรง ระหว่างหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์ และหมู่ฟังก์ชันของตัวรองรับ [วิเชียร , 2521]

ตัวรองรับที่ใช้ในวิธีนี้มีสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ ตัวรองรับที่สังเคราะห์ขึ้น (synthetic support) ได้แก่ acrylamide-based polymer, maleic anhydride-based polymer, methacrylic acid-based polymer, styrene-based polymer และ polypeptide อีกกลุ่มคือตัวรองรับที่ได้จากธรรมชาติ (natural support) ได้แก่ อะกาโรส เซลลูโลส เค็กซ์แทรน แก้ว และแป้ง แต่เนื่องจากตัวรองรับจากธรรมชาติ สามารถถูกปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย จึงไม่นิยมนำมาใช้ [H. Nishihara et.al, 2004]

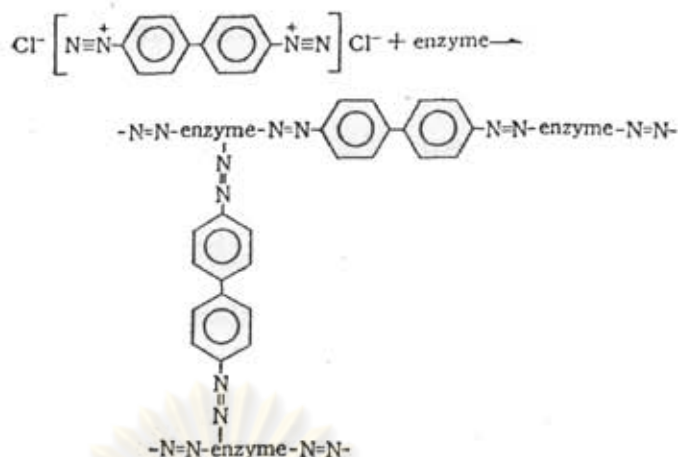
## 3. การเชื่อมขวาง (cross-linking method)

เป็นวิธีที่ใช้การเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ ระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ โดยการใช้สารเคมีที่เป็นไบ (bi-) หรือมัลติฟังก์ชันแนล (multi-functional) ทำให้เกิดโครงสร้างเป็นตาข่ายของเอนไซม์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งไม่ต้องอาศัยตัวกลาง (carrier) สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ dimethyl adipidate, dimethyl suberimidate, aliphatic diamines และกลูตาไรลดีไรด์ ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้มากที่สุด [H. Nishihara et.al, 2004]

วิธีนี้อาจใช้ร่วมกับการตรึงเอนไซม์วิธีอื่น ๆ เช่น การตรึงเอนไซม์บนตัวรองรับของแข็ง และใช้การเชื่อมขวาง จะช่วยเพิ่มความเสถียรของการตรึงรูป [S. Seema et.al, 2002]

ตัวอย่างของวิธีนี้ เช่น การใช้ bisdiazobenzidine เป็นตัวเชื่อมขวางแบบ diazo coupling กับปาเปนที่มีหมู่ฟีนอลิกของไทโรซีน หรือ หมู่อิมิดาโซลของฮิสติดีน หรือ หมู่อะมิโนอิสระ แสดงดังรูปที่ 2.5





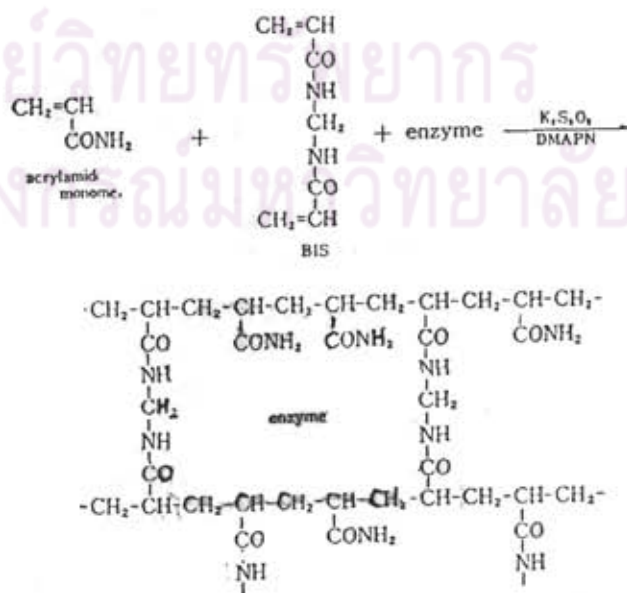
รูปที่ 2.5 แสดงปฏิกิริยาระหว่าง bisdiazobenzidine กับเอนไซม์ [7]

4. วิธีห่อหุ้ม (entrapment or encapsulation method)

เป็นวิธีการตรึงเอนไซม์ไว้ในช่องตาข่ายพอลิเมอร์ของตัวรองรับ ที่เป็นของแข็ง [12] เอนไซม์กับพอลิเมอร์ไม่มีการจับยึด หรือคูดยึด หรือเกิดพันธะใด ๆ ดังนั้น การตรึงเอนไซม์ โดยวิธีห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในตัวรองรับ จะได้เอนไซม์ที่มีสมบัติเหมือนกับเอนไซม์ที่อยู่อย่างอิสระในสารละลาย กิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยวิธีนี้จะลดลงจากกิจกรรมของเอนไซม์อิสระน้อยกว่ากรณีที่ตรึงด้วยวิธีการทางเคมี

พอลิเมอร์ที่ใช้ในวิธีนี้ ได้แก่ คอลลาเจน (collagen), อัลจีเนต (alginate), คาราจีแนน (carrageenan), พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) และ แป้ง [12]

ตัวอย่างการตรึงเอนไซม์วิธีนี้ แสดงดังรูปที่ 2.6 ซึ่งเป็นการทำ polyacrylamide gel ที่มีช่องตาข่ายสำหรับหุ้มเอนไซม์



รูปที่ 2.6 แสดงการทำ polyacrylamide gel ที่มีช่องตาข่ายสำหรับหุ้มเอนไซม์ [7]



เมื่อเปรียบเทียบวิธีตรึงรูปตามสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูปดังตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่า วิธีดูดซับทางกายภาพถึงแม้จะมีแรงเชื่อมพันธะอ่อน แต่เมื่อพิจารณาถึงข้อดีนั้นมีหลายประการ ทั้งในแง่การเตรียมที่ง่าย กิจกรรมเอนไซม์สูง ใช้ค่าใช้จ่ายน้อย ความจำเพาะต่อสับสเตรทไม่เปลี่ยน อีกทั้งยังสามารถนำตัวรองรับกลับไปใช้ใหม่ได้อีกด้วย

สำหรับวิธีห่อหุ้มเอนไซม์นั้น เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ เอนไซม์ตรึงรูปมีความแข็งแรงของพันธะของตัวรองรับรอบเอนไซม์สูง อีกทั้งยังเป็นวิธีที่มีราคาถูก สามารถนำไปใช้งานได้สูง แต่มีข้อเสียอยู่บ้าง คือ วิธีการเตรียมค่อนข้างยุ่งยาก และไม่สามารถนำตัวรองรับกลับมาใช้ได้อีกครั้ง

สมบัติ	วิธีเชื่อมกับตัวพวยง			
	วิธีดูดซับทางกายภาพ	วิธีเชื่อมพันธะโคเวเลนต์	วิธีเชื่อมขวาง	วิธีห่อหุ้ม
การเตรียม (Preparation)	ง่าย	ยาก	ยาก	ยาก
กิจกรรม (Enzyme activity)	สูง	ต่ำ	ปานกลาง	ปานกลาง
ความจำเพาะต่อสับสเตรท (Substrate specificity)	ไม่เปลี่ยน	เปลี่ยนได้	เปลี่ยนได้	ไม่เปลี่ยน
แรงเชื่อมพันธะ (Binding force)	อ่อน	แข็งแรง	แข็งแรง	แข็งแรง
การนำกลับคืน (Regeneration)	ได้	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้
ความสามารถในการนำไปใช้ (Applicability)	ได้ต่ำ	ได้ปานกลาง	ได้ต่ำ	ได้สูง
ค่าใช้จ่าย (Cost of immobilization)	ถูก	แพง	ปานกลาง	ถูก

ตารางที่ 3.1 วิธีตรึงรูปและสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูป [T. Yamamoto et.al., 2002]

องค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการตรึงเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ ตัวรองรับ และวิธีการที่ทำให้เอนไซม์ติดกับตัวรองรับ หรืออยู่ในตัวรองรับ สารที่ใช้เป็นตัวรองรับ มีความสำคัญต่อกิจกรรม และความคงตัวของเอนไซม์ โดยที่ไม่มีวิธีการตรึงและตัวรองรับชนิดใดที่สามารถใช้ตรึงเอนไซม์ได้ทุกชนิด [วิเชียร , 2521]

การเลือกตัวรองรับอย่างรอบคอบ จะช่วยปรับปรุงค่าครึ่งชีวิตของระบบเอนไซม์ครึ่งรูป รวมถึงสมรรถภาพของเอนไซม์ครึ่งรูปได้อีกด้วย [S. Seema et.al., 2002]

ตัวรองรับที่ดีโดยทั่วไปควรมีลักษณะจำเพาะ ดังต่อไปนี้

- มีพื้นที่ผิวมากเพื่อใช้สำหรับการจับยึด
- มีการซึมผ่านได้ของสาร
- ไม่ละลายน้ำ
- เสถียรต่อสารเคมี ความร้อนและแรงกระทบ
- มีรูปร่างและขนาดที่พอเหมาะ
- มีความต้านทานต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
- นำกลับคืนมาใช้ใหม่ได้อีก

ในการนำไปใช้งานนั้นควรพิจารณาถึงสมบัติของตัวรองรับ ในส่วนของพื้นที่ผิว รูปร่าง องค์ประกอบ และการดัดแปลง เป็นต้น



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทที่ 3

#### วิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุคิบและเครื่องมือที่ใช้

##### วัสดุคิบที่ใช้

1. รีโซซินอล 98 % (Resorcinol (R),  $C_6H_4(OH)_2$ ) โดยบริษัทฟลูก้า (Fluka) ประเทศเยอรมันนี
2. ฟอรั่มลดีไฮด์ 38 % (Formaldehyde (F), HCHO) โดยบริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals ประเทศออสเตรเลีย
3. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate (C),  $Na_2CO_3$ )
4. น้ำกลั่น
5. t-Butanol โดยบริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals ประเทศออสเตรเลีย
6. ก๊าซไนโตรเจน 99.99 %
7. เอ็น-บิวทานอล (n-Butanol, ) บริษัท Univar
8. เอ็น-เฮปเทน (n-Heptane,  $C_7H_{16}$ ) บริษัท Univar
9. กรดบิวทาริก (Butyric Acid, ) บริษัท Fluka
10. เฮกซะนอล (Hexanol, ) บริษัท Fluka
11. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper Sulphate) บริษัท Ferak
12. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต (Sodium Potassium Tartrate) บริษัท Ferak
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide) บริษัท Univar
14. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate) บริษัท Univar
15. โฟลิน ซีโอแคลซัวร์ รีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu Reagent) บริษัท Merck
16. โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) บริษัท Sigma

หมายเหตุ : สารเคมีที่ใช้ทุกตัวเป็นสารเคมีที่มีคุณภาพระดับ Lab grade

#### 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการเคมีทั่วไป
2. เครื่องกำเนิดคลื่นเหนือเสียงความถี่ 20 กิโลเฮิร์ตซ์ (Vibra Cell รุ่น VC150) ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. เหนือเสียง โพรบ (Ultrasonic Probe) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ปลายโพรบ 6 มิลลิเมตร (Vibra Cell) จากประเทศสหรัฐอเมริกา
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Cooling Bath)



5. เตาอบไมโครเวฟที่ห้อ TURBORA รุ่น TRX – 2021 โดยบริษัทปราณีภัณฑ์ จำกัด ประเทศไทย
6. เตาเผา (Furnace) สำหรับกระบวนการเผาให้เป็นคาร์บอน (Carbonization) อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการเคมี
7. เครื่องกวนแบบใบกวน (Mechanical Stirrer) ของบริษัท Kika Work Asia ประเทศมาเลเซีย
8. เครื่องเขย่าแนวระดับ (Platform Shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิและความเร็วรอบ รุ่น GYROMAX 939XL ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ของบริษัท Sigma ประเทศเยอรมนี
11. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. เครื่องอบแห้งแบบเย็นเยือก (Freeze Dryer) รุ่น CRYODOS-50 บริษัท Millrock Technology ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) ของบริษัท Sartorius ประเทศเยอรมนี เครื่องวัด
14. อัตราการดูดซับไนโตรเจน (Specific surface area measurement) รุ่น BELSORP28 ของบริษัท BEL Japan ประเทศญี่ปุ่น
15. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) รุ่น JSM-6301F ของบริษัท JEOL ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น JENWAY 6405 ของบริษัท Krackeler Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. แก๊สโครมาโทกราฟีก๊าซ (Gas Chromatography) รุ่น CG-7AG ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

### 3.3 รายละเอียดวิธีการทดลอง

การทดลองในรายงานวิจัยในฉบับนี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งเป็นการทดลอง 3 เรื่องด้วยกันคือ

1. ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้กระบวนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave dryi-ng) เพื่อใช้ในการอบแห้ง RF gel ที่เตรียมด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ โซล-เจล พอลิ คอนเดนเซชัน (Sol-gel polycondensation)

2. ศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเล็กมาก (Ultramicrosphere) ด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ Inverse emulsion

3. การนำ RF Gel/Carbon gel ไปใช้งานด้าน Biochemical Engineering โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.3.1 การทดลองเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติรูพรุนแบบมีโซของ รีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอน เจล ที่ใช้และไม่ใช้คลื่นเหนือเสียงระหว่างขั้นตอนโซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน โดยผ่านขั้นตอนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ

เป็นการทดลองเพื่อศึกษาการอบแห้งด้วยคลื่น ไมโครเวฟที่มีผลต่อลักษณะสมบัติรูพรุนแบบมีโซของ Carbon gel โดยจะทำการปรับเปลี่ยนสัดส่วนของตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีฤทธิ์เป็นด่างกับ น้ำหรือค่า  $C/W$  และสัดส่วนเชิงโมลของรีโซซินอลกับตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีฤทธิ์เป็นด่างหรือค่า  $R/C$  ที่สภาวะเริ่มแรก โดยใช้คลื่นเหนือเสียงช่วยในการเตรียม

ค่า  $C/W$  ต่ำ ( $20$  และ  $40 \text{ mol/m}^3$ ) และค่า  $C/W$  สูง ( $80 \text{ mol/m}^3$ )

การทดลองนี้จะศึกษาถึงผลของคลื่นเหนือเสียงที่มีผลต่อลักษณะสมบัติรูพรุนแบบ มีโซของ Carbon gel เมื่อค่า  $C/W$  ที่ใช้ในการเตรียม Carbon gel มีค่าต่ำโดยจะทำการปรับ ค่า  $R/C$  ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และ ตารางที่ 3.2 เมื่อ  $R$  = รีโซซินอล,  $F$  = ฟอร์มัลดีไฮด์,  $W$  = น้ำ,  $C$  = โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะในการเตรียม Carbon gel ที่มีโครงสร้างแบบมีโซเมื่อค่า  $C/W$  ต่ำโดยใช้คลื่นเหนือเสียงและใช้วิธีอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ

$C/W$ ( $\text{mol/m}^3$ )	$R/C$ ( $\text{mol/mol}$ )	$R/W$ ( $\text{g/cc}$ )	Power of Ultrasonic (watt)
20	200	0.44	0
20	200	0.44	22
40	200	0.89	0
40	200	0.89	22

ตารางที่ 3.2 แสดงสถานะในการเตรียม Carbon gel ที่มีโครงสร้างแบบมีโซเมื่อค่า  $C/W$  สูงโดยใช้คลื่นเหนือเสียง และใช้วิธีทำให้แห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ

C/W (mol/m <sup>3</sup> )	R/C (mol/mol)	R/W (g/cc)	Power of Ultrasonic (watt)
80	200	1.76	0
80	200	1.76	22
80	100	0.89	0
80	100	0.89	22
80	50	0.44	0
80	50	0.44	22

หมายเหตุ - Power of Ultrasonic = 0 watt แสดงว่าไม่ใช้คลื่นเหนือเสียงในการเตรียม Carbon gel

ในที่นี้จะเรียก Carbon gel ที่เตรียมโดยใช้คลื่นเหนือเสียงว่า “Carbon sonogel” และเรียก Carbon gel ที่ไม่ได้เตรียมโดยใช้คลื่นเหนือเสียงว่า “Carbon gel”

#### การเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล ก่อนการอบแห้ง

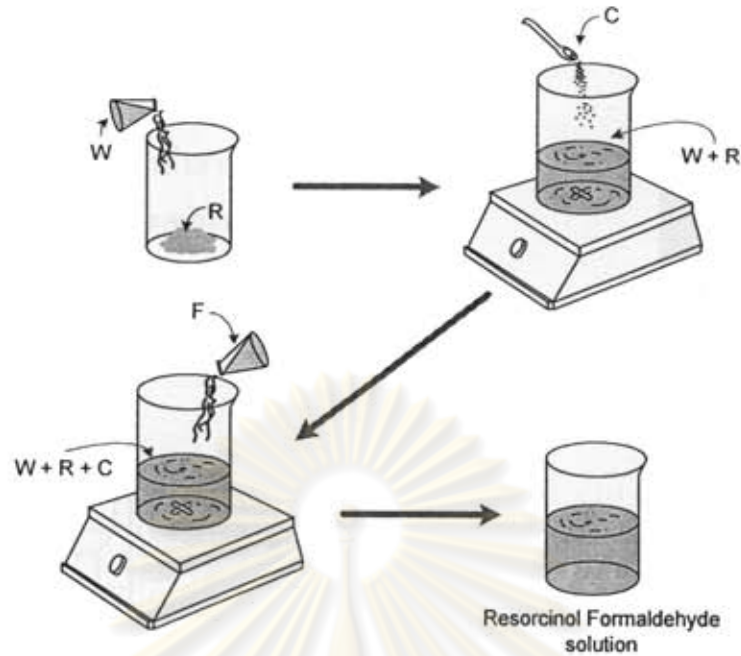
สารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เตรียมขึ้นจากรีโซซินอล (Resorcinol (R),  $C_6H_4(OH)_2$ ) ฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde (F), HCHO) น้ำกลั่น และ โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate (C),  $Na_2CO_3$ ) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีฤทธิ์เป็นด่าง (Basic Catalyst)

#### 1) การเตรียมสารละลายเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์

เป็นขั้นตอนเริ่มแรกในการเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจล โดยมี ขั้นตอน การเตรียมดังแสดงในรูปที่ 3.1

1. ผสมสารตั้งต้นในอัตราส่วนที่ต้องการดังที่แสดงในตารางที่ 3.1
2. นำรีโซซินอลฟอร์มัลดีไฮด์มาละลายด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง
3. เติมตัวเร่งปฏิกิริยาโซเดียมคาร์บอเนต แล้วปั่นกวนจนกระทั่งโซเดียมคาร์บอเนตถูกทำให้ละลายจนหมด
4. เติมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 38 % ลงไป แล้วปั่นกวนจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันจะได้สารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์





รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการเตรียมสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์

#### ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาโซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน (Sol-gel polycondensation)

การทดลองในขั้นนี้แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ (1) ไม่ใช้คลื่นเหนือเสียงในขั้นตอน โซล-เจล โพลี-คอนเดนเซชัน และ (2) ใช้คลื่นเหนือเสียงระหว่างขั้นตอน โซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

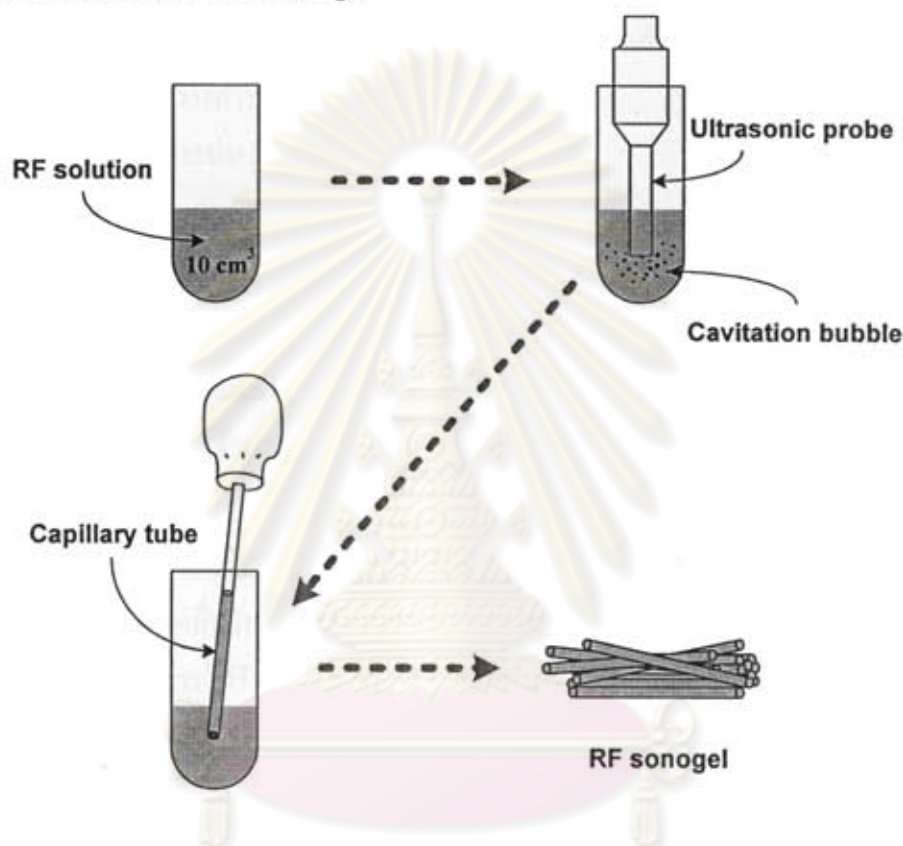
#### ไม่ใช้คลื่นเหนือเสียงในขั้นตอน โซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน

ในส่วนนี้การเตรียม RF gel จะไม่ใช้คลื่นเหนือเสียงในขั้นตอนโซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน (Sol-gel polycondensation) โดยจะปล่อยให้สารละลายรีโซซินอล - ฟอร์มัลดีไฮด์ (RF Solution) เกิดเป็นเจลที่อุณหภูมิที่ควบคุม  $35 \pm 5$  องศาเซลเซียส

#### การใช้คลื่นเหนือเสียงในขั้นตอน โซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน

- นำสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ ที่เตรียมไว้แล้ว 10 ลูกบาศก์เซนติเมตรใส่ในหลอดทดลองขนาดกลาง (เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร) ดังรูปที่ 3.2
- ทำการป้อนคลื่นเหนือเสียงลงในสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ จากเครื่องกำเนิดคลื่นเหนือเสียงชนิดโพรบโดยใช้กำลังของคลื่นเหนือเสียง 22 วัตต์ และให้ปลายโพรบอยู่ที่ระดับกลางของสารละลาย ในขั้นนี้จะสังเกตเห็นฟองควาเวชันในสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์

3. รองนกระทั้งสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ หนืดมากๆ และไม่สามารถสังเกตเห็นฟองคาวิเทชันได้ จึงหยุดการป้อนคลื่นเหนือเสียง เนื่องจากว่าถ้าสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เริ่มกลายเป็นเจลจะเกิดการเปลี่ยนแปลงความหนืดอย่างรวดเร็ว
4. ใช้หลอดคาพิลลารี (Capillary tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3.5 มิลลิเมตร ดูดสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ (RF Solution) ที่หนืดมากๆ ขึ้นมาเพื่อขึ้นรูปเจลเป็นแท่งทรงกระบอก ได้ RF sonogel



รูปที่ 3.2 แสดงการใช้คลื่นเหนือเสียงในขั้นตอน โชล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน ของสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์

### ตัวแปรที่ปรับเปลี่ยนและสภาวะควบคุมในการทดลอง

1. ตัวแปรที่ปรับเปลี่ยน คือ
  - ค่าสัดส่วนของโซเดียมคาร์บอเนตกับน้ำตอนเริ่มแรก หรือ ค่า C/W เป็น 20, 40 และ 80 โมลต่อลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ
  - ค่าสัดส่วนเชิง โมลของรีโซซินอลกับโซเดียมคาร์บอเนตหรือ ค่า R/C เป็น 50, 100 และ 200 ตามลำดับ
2. ตัวแปรควบคุม คือ
  - ค่าสัดส่วนเชิง โมลของรีโซซินอลกับฟอร์มัลดีไฮด์ หรือ ค่า R/F เป็น 0.5
  - กำลังของคลื่นเหนือเสียง 22 วัตต์

- ความถี่ของคลื่นเหนือเสียง 20 กิโลเฮิร์ตซ์
- อุณหภูมิ  $35 \pm 5$  องศาเซลเซียส
- ปริมาตรของสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มาลดีไฮด์ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร
- ระดับของปลายโพรบอยู่ที่ระดับกลางของระดับสารละลาย รีโซซินอล-ฟอร์มาลดีไฮด์

### 3) ขั้นตอนการบ่ม (Aging)

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ควบคุมสภาวะการทดลองเหมือนกันทุกๆตัวอย่างการทดลอง ดังนี้

1. อุณหภูมิระหว่างการบ่ม เป็น 75 องศาเซลเซียส
2. เวลาที่ใช้ในการบ่ม เป็น 7 วัน

### 4) ขั้นตอนการแลกเปลี่ยนตัวทำละลาย (Solvent exchange)

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ควบคุมสภาวะการทดลองเหมือนกันทุกๆตัวอย่างการทดลอง ดังนี้

1. ปริมาตรของ t-Butanol เป็น 10 เท่าของปริมาตรเจล
2. แช่ใน t-Butanol จำนวน 3 ครั้ง ทุก 24 ชั่วโมง

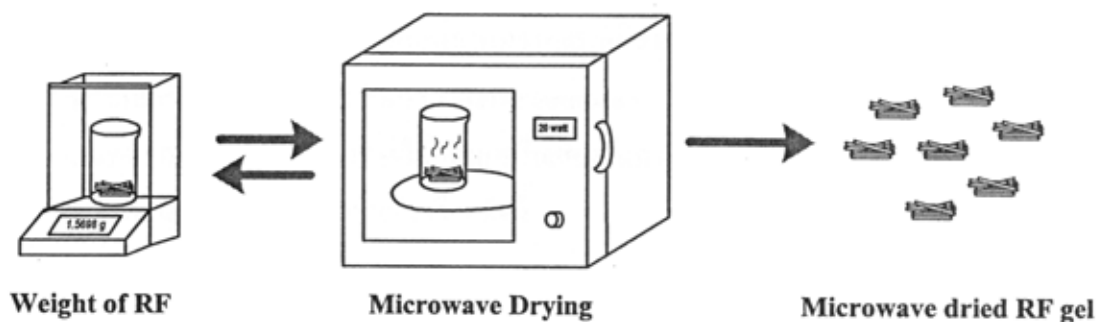
### ขั้นตอนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ

การอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟอาศัยหลักการที่ตัวทำละลายในโครงสร้างของ RF gel เกิดการระเหยเนื่องจากการได้รับพลังงานความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟ โดยขั้นตอนในการอบแห้งดังแสดงในรูปที่ 3.3

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ควบคุมสภาวะการทดลองเหมือนกันทุกๆตัวอย่างการทดลอง ดังนี้

1. นำ RF gel ที่ทำการแลกเปลี่ยนตัวทำละลายเรียบร้อยแล้วมาชั่งน้ำหนักก่อนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ บันทึกน้ำหนักไว้
2. นำ RF gel อบในเตาไมโครเวฟโดยใช้กำลังของคลื่นไมโครเวฟต่ำสุด 200 วัตต์ เพื่อทำการระเหยตัวทำละลาย t-Butanol ที่อยู่ภายในโครงสร้างของ RF gel ขณะทำการอบแห้งจะนำ RF gel ออกมาชั่งทุกๆ 10 นาที ซึ่งพบว่าน้ำหนักของ RF gel จะลดลงอย่างต่อเนื่อง
3. เมื่อน้ำหนักของ RF gel คงที่ที่ค่าหนึ่งแสดงว่าทำการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟเสร็จเรียบร้อยแล้ว





รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการทำอบแห้ง RF gel ด้วยคลื่นไมโครเวฟ

### ขั้นตอนการเผาให้เป็นคาร์บอน

กระบวนการเผาให้เป็นคาร์บอน (Carbonization) เป็นกระบวนการที่เพิ่มปริมาณธาตุคาร์บอนภายในวัสดุอินทรีย์ด้วยอุณหภูมิสูงภายใต้บรรยากาศเฉื่อยซึ่งในการทดลองนี้ จะใช้ก๊าซไนโตรเจน 99.99 %

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ควบคุมสภาวะการทดลองเหมือนกันทุกๆตัวอย่างการทดลอง ดังนี้

1. ควบคุมอัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจน เป็น 200 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที
2. ควบคุมอุณหภูมิและอัตราการเพิ่มอุณหภูมิดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 แผนผังกระบวนการเผาให้เป็นคาร์บอน (Carbonization)

### 3.3.2 ศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเล็กมาก (Ultramicrosphere) ด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ Inverse emulsion

การทดลองส่วนนี้ศึกษาถึงการ ใช้คลื่นเหนือเสียงในการเตรียมอนุภาคทรงกลมของ RF Gel ในขั้นตอน Inverse Emulsion ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

#### 3.3.2.1 การเตรียมอนุภาคทรงกลมของ RF Gel

##### การเตรียมสารละลายเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์

เตรียมสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ ด้วยวิธีเดียวกับที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.3.1 โดยไม่ใช้คลื่นเหนือเสียง โดยมีอัตราส่วนเชิงโมลระหว่างรีโซซินอลกับไซเคียมคาร์บอเนต (R/C) เท่ากับ 400 อัตราส่วนระหว่างรีโซซินอลกับน้ำ (R/W) เป็น  $0.25 \text{ g/cm}^3$  อัตราส่วนเชิงโมลระหว่างรีโซซินอลกับฟอร์มัลดีไฮด์ เป็น 0.5

##### การเตรียมอิมัลชันของรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล

นำสารละลายรีโซซินอลฟอร์มัลดีไฮด์ ที่เตรียมขึ้นในข้างต้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 100 นาที หลังจากนั้นนำไปทำให้เป็นสารอิมัลชัน โดยกระจายตัวในวัฏภาคน้ำมัน ซึ่งประกอบด้วย span80 (Sorbitan monooleate) 5 % โดยปริมาตรใน ไซโครเฮกเซน (Cyclohexane) อัตราส่วนเชิงปริมาตรระหว่างสารละลายรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์กับวัฏภาคน้ำมันเป็น 1 ต่อ 10 โดยมีสภาวะการเตรียมตามตารางที่

ตารางที่ 3.3 สภาวะการเตรียมคาร์บอนไมโครสเฟียร์

สภาวะ	เครื่องมือที่ใช้ทำอิมัลชัน	td* [min]
C	โบทันกาน (800 rpm)	180
H1	โฮโมจิไนเซอร์ (8000 rpm)	10
H2	โฮโมจิไนเซอร์ (9500 rpm)	10
H3	โฮโมจิไนเซอร์ (13500 rpm)	10
H4	โฮโมจิไนเซอร์ (20500 rpm)	10
U100	คลื่นเหนือเสียง ( $60 \text{ W/cm}^2$ )	60
U60	คลื่นเหนือเสียง ( $32 \text{ W/cm}^2$ )	60

\* td เป็นเวลาที่เตรียมสารอิมัลชัน

การเตรียมอนุภาคทรงกลมของรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์เจล

นำสารอิมัลชันของรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล ที่ได้ในข้างต้น มากรองแยกเม็ดอนุภาคทรงกลมของรีโซซินอลฟอร์มัลดีไฮด์ เจล ออกจากวัฏภาคน้ำมัน และนำอนุภาคทรงกลมดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องอีก 3 วัน จากนั้นนำไปแช่ใน *n*-butanol จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 1 วัน แล้วนำไปอบแห้งด้วยวิธีอบแห้งแบบเย็นเยือก จะได้เม็ดอนุภาคทรงกลมของรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล

การเตรียมอนุภาคทรงกลมของคาร์บอนเจล

นำเม็ดอนุภาคทรงกลมของรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล ที่ได้จากขั้นตอนก่อนไปคาร์บอนไนซ์ ภายใต้สภาวะที่เสนอ ดังรูปที่ ... จะได้อนุภาคทรงกลมของคาร์บอน เจล



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 3.3.3 การนำ RF Gel/Carbon gel ไปใช้งานด้าน Biochemical Engineering

การทดลองส่วนนี้เป็นการนำ RF Gel และ Carbon Gel ไปทำ Immobilization enzyme (เอนไซม์ตรึงรูป) โดยศึกษาถึงความเป็นไปในการนำ enzyme ไปตรึงอยู่บน RF Carbon gel โดยมีรายละเอียดดังนี้

#### 3.3.3.1 รายละเอียดการทดลอง

##### 3.3.3.1.1 การเตรียมและการวิเคราะห์คุณลักษณะของอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลที่ใช้ในการทดลองส่วนนี้

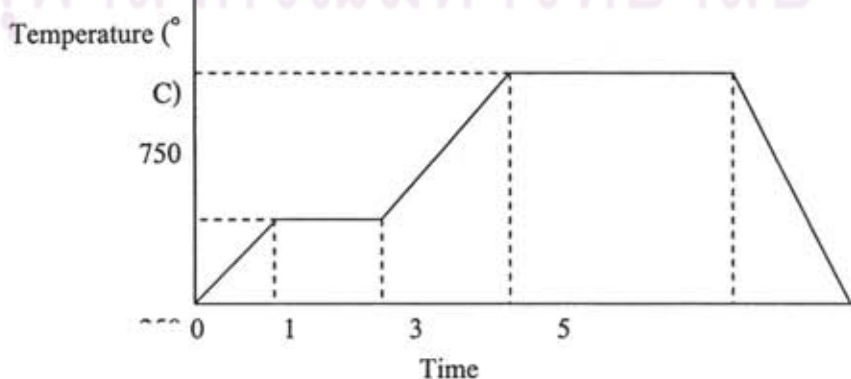
###### การเตรียมอาร์เอฟคาร์บอนเจลโดยไม่ใช้สารลดแรงดึงผิวชนิดแคทอออนิก

อาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมโดยวิธีดั้งเดิม (RF-NS) กล่าวคือ ไม่มีการใช้สารลดแรงดึงผิวชนิดแคทอออนิก (Trimethylstearylammonium chloride) เตรียมได้จากสารละลายเริ่มต้นระหว่าง ริโซซินอล (R) และ ฟอรัมาลดีไฮด์ (F) โดยมีน้ำกลั่น (W) เป็นตัวทำละลาย และ โซเดียมคาร์บอเนต (C) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดด่าง (Base catalyst) อัตราส่วนระหว่าง R/F และ C/W มีค่าคงที่คือ 0.5 และ 5.67 โมลต่อลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ

เมื่อผสมสารละลายตามอัตราส่วนข้างต้น ปล่อยให้สารละลายเกิดเป็นเจล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นทำการกวนเพื่อให้เจลละเอียด แล้วทำการบ่ม (aging) ที่อุณหภูมิเดียวกันนาน 1 วัน และที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน นำอาร์เอฟไฮโดรเจล (RF hydrogel) ที่เตรียมได้ไปแลกเปลี่ยนตัวทำละลาย (solvent exchange) โดยแช่ RF hydrogel ใน t-Butanol จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำ RF gel ให้แห้งโดยการอบแห้งด้วยตู้อบไมโครเวฟ (Microwave Oven) ด้วยใช้กำลัง 160 วัตต์ เป็นเวลา 25 นาที

RF carbon gel สามารถเตรียมได้โดยการเผา RF gel ให้เป็นคาร์บอน (Carbonization) โดยมีอุณหภูมิการเผาเป็น 750 องศาเซลเซียส เผาภายใต้บรรยากาศเฉื่อยของก๊าซไนโตรเจน ด้วยอัตราการไหล 200 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที

ขั้นตอนการควบคุมอุณหภูมิ และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิแสดงดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 3.5 แผนผังกระบวนการเผาให้เป็นคาร์บอน (Carbonization)

### 3.3.3 การนำ RF Gel/Carbon gel ไปใช้งานด้าน Biochemical Engineering

การทดลองส่วนนี้เป็นการนำ RF Gel และ Carbon Gel ไปทำ Immobilization enzyme (เอนไซม์ตรึงรูป) โดยศึกษาถึงความเป็นไปในการนำ enzyme ไปตรึงอยู่บน RF Carbon gel โดยมีรายละเอียดดังนี้

#### 3.3.3.1 รายละเอียดการทดลอง

##### 3.3.3.1.1 การเตรียมและการวิเคราะห์คุณลักษณะของอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลที่ใช้ในการทดลองส่วนนี้

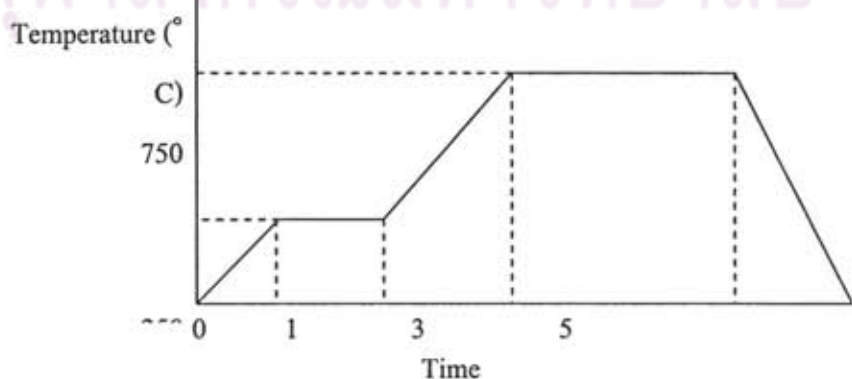
###### การเตรียมอาร์เอฟคาร์บอนเจลโดยไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอไอออนิก

อาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมโดยวิธีดั้งเดิม (RF-NS) กล่าวคือ ไม่มีการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอไอออนิก (Trimethylstearylammonium chloride) เตรียมได้จากสารละลายเริ่มต้นระหว่าง ริโซซินอล (R) และ ฟอรัมาลดีไฮด์ (F) โดยมีน้ำกลั่น (W) เป็นตัวทำละลาย และ โซเดียมคาร์บอเนต (C) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่าง (Base catalyst) อัตราส่วนระหว่าง R/F และ C/W มีค่าคงที่คือ 0.5 และ 5.67 โมลต่อลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ

เมื่อผสมสารละลายตามอัตราส่วนข้างต้น ปล่อยให้สารละลายเกิดเป็นเจล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นทำการกวนเพื่อให้เจลละเอียด แล้วทำการบ่ม (aging) ที่อุณหภูมิเดียวกันนาน 1 วัน และที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน นำอาร์เอฟไฮโดรเจล (RF hydrogel) ที่เตรียมได้ไปแลกเปลี่ยนตัวทำละลาย (solvent exchange) โดยแช่ RF hydrogel ใน t-Butanol จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำ RF gel ให้แห้งโดยการอบแห้งด้วยตู้อบไมโครเวฟ (Microwave Oven) ด้วยใช้กำลัง 160 วัตต์ เป็นเวลา 25 นาที

RF carbon gel สามารถเตรียมได้โดยการเผา RF gel ให้เป็นคาร์บอน (Carbonization) โดยมีอุณหภูมิการเผาเป็น 750 องศาเซลเซียส เผาภายใต้บรรยากาศเฉื่อยของก๊าซไนโตรเจน ด้วยอัตราการไหล 200 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที

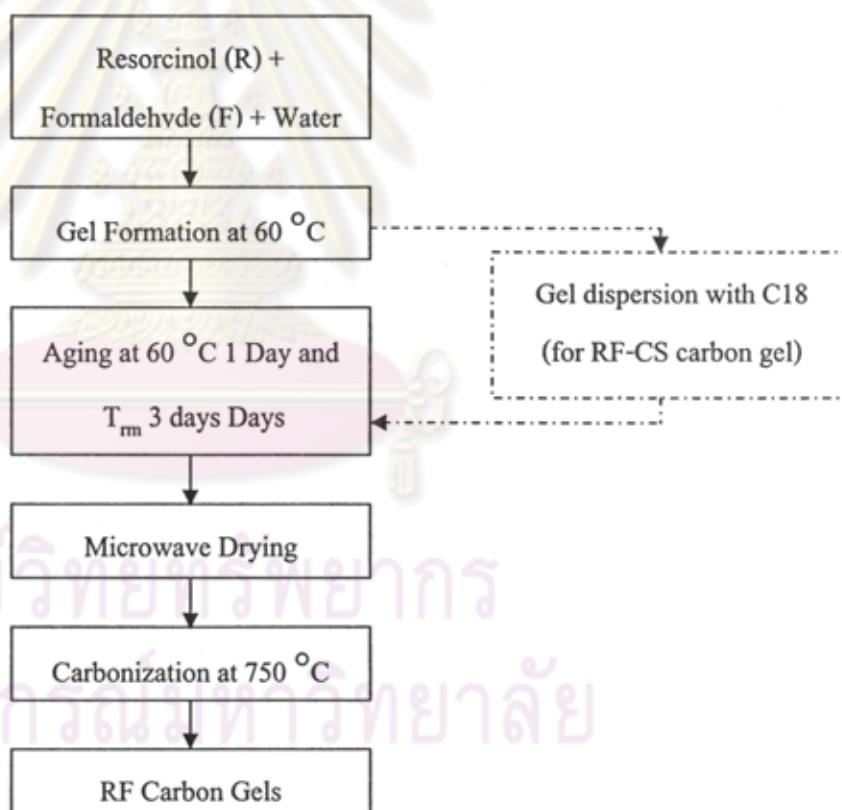
ขั้นตอนการควบคุมอุณหภูมิ และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิแสดงดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 3.5 แผนผังกระบวนการเผาให้เป็นคาร์บอน (Carbonization)

การเตรียมอาร์เอฟคาร์บอนเจลโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอไอออนิก

RF carbon gel ที่เตรียมโดยใช้สารลดแรงตึงผิว (RF-CS) เตรียมได้จากสารละลาย อาร์เอฟเริ่มต้น ผ่านกระบวนการโซล-เจล พอลิคอนเดนเซชัน (sol-gel polycondensation) เช่นเดียวกับ RF-NS แต่จะเพิ่มกระบวนการทำให้เกิดการกระจายตัว (dispersion process) โดยเติมสารละลายอาร์เอฟที่ใกล้สูญเสียดังกล่าวลงในสารละลายสารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอไอออนิก (Trimethylstearylammmonium chloride) ความเข้มข้น และมีน้ำเป็นตัวทำละลาย ทำการกวนด้วยเครื่องกวนแบบใบกวน (Mechanical Stirrer) ด้วยความเร็ว 850 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จึงกรอง RF hydrogel เพื่อนำไปบ่ม แลกเปลี่ยนตัวทำละลาย ทำให้แห้ง และเผาตามขั้นตอน และเงื่อนไขเช่นเดียวกับ RF-NS เพื่อได้เป็น RF carbon gel



รูปที่ 3.6 แสดงขั้นตอนการเตรียม RF carbon gels ทั้งแบบ RF-NS carbon gel และ RF-CS carbon gel



### 3.3.3.1.2 การศึกษาตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส

#### *การตรึงโดยวิธีดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption method)*

การตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) บน RF carbon gels โดยวิธีดูดซับทางกายภาพ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

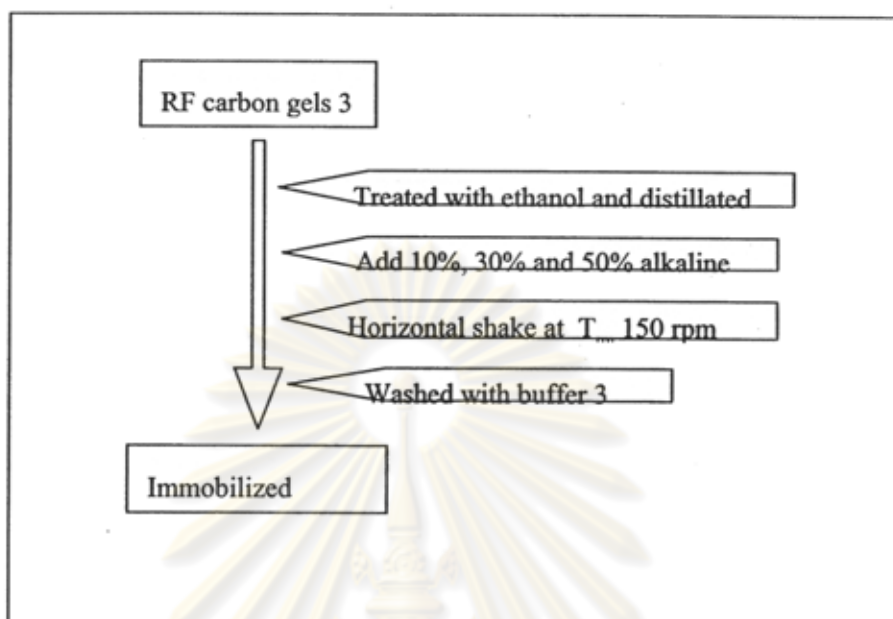
**ขั้นการเตรียมตัวรองรับ:** นำ RF carbon gels ปริมาณ 3 กรัม ไปแช่ในเอทานอล 20 มิลลิลิตร จากนั้นกรอง RF carbon gels ออกแล้วทำการล้างอีกครั้งด้วยสารละลายเอทานอล 50% เพื่อกำจัดอากาศที่อยู่ในรูพรุนของ RF carbon gels จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วทิ้งให้แห้ง

**ขั้นการตรึงเอนไซม์:** นำ RF carbon gels ที่เตรียมจากขั้นแรก ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ที่มีสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส 10%, 30% และ 50% ของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น (ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้น เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวระดับที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ทุก ๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป

ในการทดลองจะมีการทดสอบผลของแรงเฉือน (shear force) ขณะเขย่าที่มีต่อสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสโดยการเตรียมสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส 10% ของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการเขย่าในแนวระดับและเก็บตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ทุก ๆ ชั่วโมง เช่นเดียวกัน แล้วนำสารละลายเอนไซม์ตัวอย่างไปทำปฏิกิริยาเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไป

**ขั้นการล้างเอนไซม์ตรึง:** กรอง RF carbon gels ที่มีเอนไซม์ตรึงอยู่ออกจากสารละลายภายหลังการเขย่า 10 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง แล้วนำน้ำล้างไปตรวจหาปริมาณโปรตีนที่หลุดออกจาก RF carbon gels ในขั้นสุดท้าย ทำเอนไซม์ตรึงให้แห้งโดยการตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมจะนำไปใช้ ปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้คำนวณได้จากสมการที่ 4.1

$$\text{ปริมาณเอนไซม์ หรือ ปริมาณ โปรตีนที่ตรึงได้} = \text{ปริมาณ โปรตีน ใน สารละลายเอนไซม์เริ่มต้น} - \text{ปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง} - \text{ปริมาณ โปรตีนในน้ำล้าง} \quad (4.1)$$



รูปที่ 3.7 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF Carbon Gels

#### การตรึงโดยวิธีห่อหุ้มภายในเจล (Gel entrapment method)

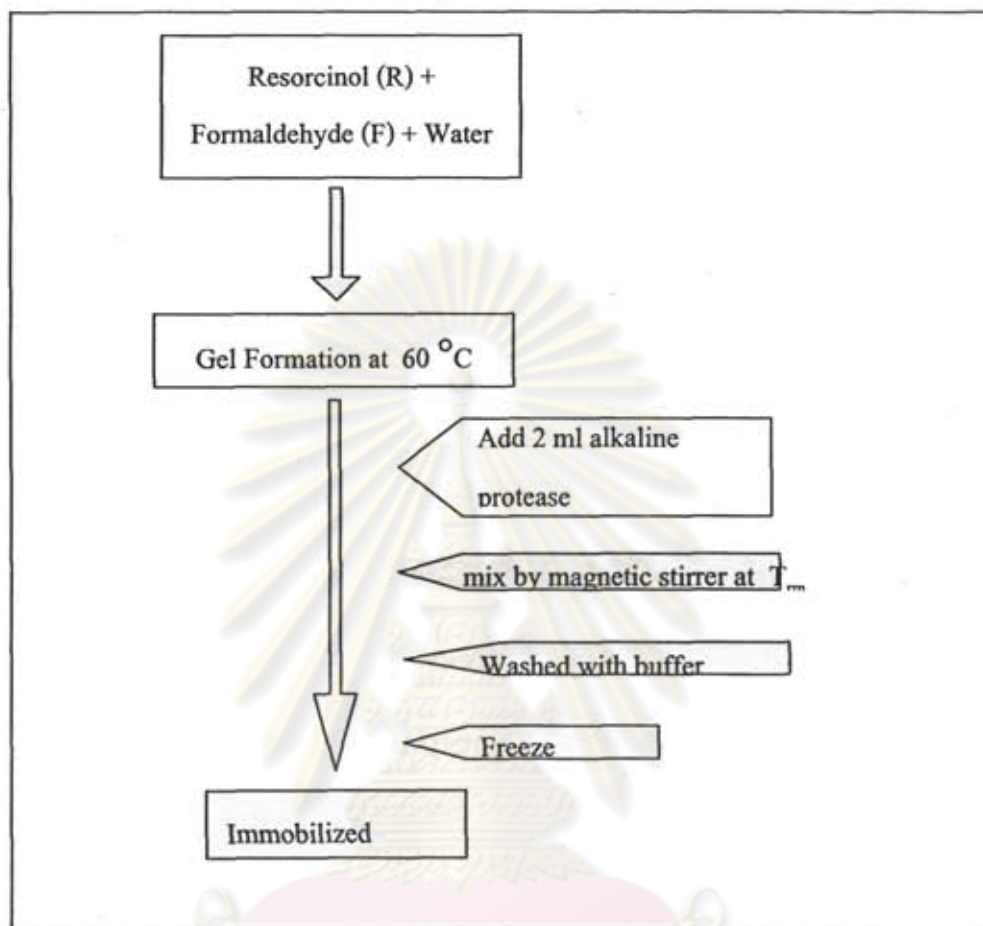
สำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสโดยวิธีห่อหุ้มภายในเจลนั้น จะทำการตรึงเฉพาะกับ RF-NS gel เท่านั้น โดยเริ่มจากการเตรียมสารละลาย RF ที่มีอัตราส่วน R/F และ C/W เป็น 0.5 และ 5.67 mol/m<sup>3</sup> เช่นเดียวกันแต่ปริมาณน้ำ (W) รวมของระบบจะเป็นปริมาณน้ำที่เติมในขั้นตอนการเตรียมสารละลาย RF รวมกับ ปริมาณน้ำที่มาจากสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสทั้งนี้เพื่อควบคุมให้อัตราส่วน C/W ของเอนไซม์ตรึงมีค่าคงเดิม

นำสารละลาย RF ที่เตรียมได้แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายใกล้สูญเสียบรรยากาศของไหล จึงนำออกมาแช่อ่างน้ำเย็นเพื่อลดอุณหภูมิของสารละลาย เมื่อสารละลายเย็นตัวลง ทำการเติมสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส 2 มิลลิลิตร ลงไป แล้วกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเบา ๆ จนสารละลายรวมตัวเป็นเนื้อเดียว แล้วจึงตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายแข็งตัวกลายเป็นเจล

ทำการล้าง RF gel ที่มีเอนไซม์อยู่ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ นำน้ำล้างไปหาปริมาณ โปรตีนที่หลุดออก หรืออีกนัยหนึ่งคือปริมาณ โปรตีนที่ไม่ถูกตรึงอยู่ใน RF gel

เอนไซม์ตรึงถูกทำให้แห้งโดยการอบแห้งแบบเย็นเยือก (Freeze Drying) ที่อุณหภูมิแช่แข็ง -40 องศาเซลเซียส 30 นาที และทำการระเหิดที่ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เอนไซม์ที่

แห้งจะถูกตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 2x2x2 มิลลิเมตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมจะนำไปใช้



รูปที่ 3.8 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธีห่อหุ้มในโครงเจลของ RF-NS Gel

ปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้คำนวณได้จากสมการที่ 4.2

$$\text{ปริมาณเอนไซม์ หรือ ปริมาณ โปรตีนที่ตรึงได้} = \frac{\text{ปริมาณ โปรตีนในสารละลาย เอนไซม์เริ่มต้น} - \text{ปริมาณ โปรตีนในน้ำล้าง}}{\text{ปริมาณน้ำล้าง}} \quad (4.2)$$

#### การวิเคราะห์กิจกรรมและอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส

กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส สามารถทดสอบจากการนำเอนไซม์ไปใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis reaction) โดยมีเคซีนเป็นสับสเตรท และได้ไทโรซีนเป็นผลิตภัณฑ์



บ่มสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส 10% ของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (1 กรัมเอนไซม์ครึ่ง) ในสารละลายเคซีน 1% โดยปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายคาร์บอนเนต ไบคาร์บอนเนตบัฟเฟอร์ (pH 10.5) ปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องเขย่าแนวระดับ ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำของผสมไปแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อ นาที นาน 20 นาที แล้วแยกสารละลายส่วนในไปทดสอบค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ในการทดสอบทุกครั้งจะมีหลอดควบคุม (control) โดยจะเติมสารละลายเอนไซม์ลงไปภายหลังการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ไทโรซีนเป็นผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครกรัม ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 1 นาที

สำหรับการวิเคราะห์อัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น ทำได้โดยการเก็บตัวอย่างสารละลายในช่วงเวลา 0 ถึง 20 นาที ไปทดสอบค่าการดูดกลืนแสง เพื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีนหาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้

#### การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสในการเร่งปฏิกิริยา

การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เป็นการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาซ้ำของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์ครึ่ง

วิธีทดสอบทำลักษณะเดียวกันกับวิธีในข้อ 4.5.3 แต่จะใช้เวลาในการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบเป็น 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเอนไซม์ออกมาล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อทดสอบปริมาณเอนไซม์ที่เหลือภายหลังจากการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ จากนั้นนำเอนไซม์ครึ่งไปเร่งปฏิกิริยากับสับสเตรทใหม่

สำหรับกรณีเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ จะทำการเติมเคซีน ลงไปใหม่ในแต่ละรอบของการเร่งปฏิกิริยา

#### การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสในการเก็บรักษา

การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสในการเก็บรักษาทำได้โดย นำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ครึ่ง ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง นำ

เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ครึ่งไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.5.3 ทุก ๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

### 3.3.3.1.3 การศึกษาครึ่งเอนไซม์ไลเปส

#### การครึ่งโดยวิธีดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption method)

การครึ่งเอนไซม์ไลเปส (lipase) บน RF carbon gels โดยวิธีดูดซับทางกายภาพ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนหลักเช่นเดียวกันกับการครึ่งเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ดังนี้

**ขั้นการเตรียมตัวรองรับ:** นำ RF carbon gels ปริมาณ 2 กรัม เติมนลงในขวดรูปชมพู่ที่มี เฮปแทน 20 มิลลิลิตร แช่ไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

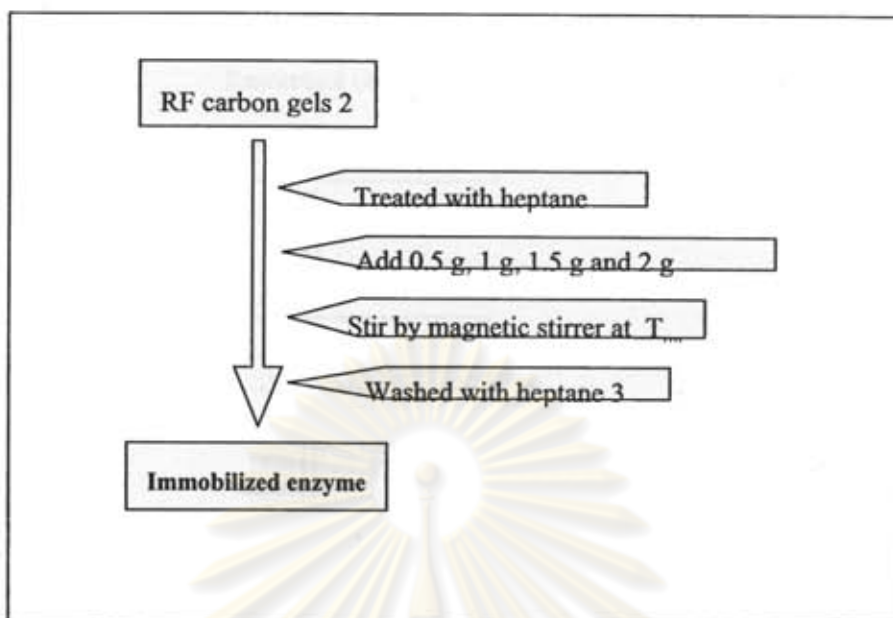
**ขั้นการครึ่งเอนไซม์:** สำหรับขั้นการครึ่งเอนไซม์นั้นจะทำการหาชั่วโมงการครึ่งที่เหมาะสมเป็นลำดับแรก โดยการเติมเอนไซม์ไลเปส 0.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี RF carbon gels แช่ในเฮปแทนจากขั้นตอนแรก จากนั้น กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 2, 5 และ 10 ชั่วโมง จากนั้นจะทำการล้างเอนไซม์ครึ่งแสดงในขั้นตอนลำดับต่อไป เพื่อหาปริมาณโปรตีนที่ครึ่งได้

เมื่อทราบชั่วโมงการครึ่งที่เหมาะสมแล้ว จะทำการทดสอบความสามารถในการรองรับปริมาณเอนไซม์ของ RF carbon gels โดยทำการครึ่งเอนไซม์ในลักษณะเดียวกัน แต่เติมเอนไซม์ในปริมาณที่ต่างกันคือ 0.5 กรัม, 1 กรัม 1.5 กรัม และ 2 กรัม จากนั้นทดสอบหาปริมาณโปรตีนที่ครึ่งได้

ในการทดลองจะมีการทดสอบผลของแรงเฉือน (shear force) ขณะกวนที่มีต่อเอนไซม์ไลเปสโดยการกวนเอนไซม์ไลเปสปริมาณ 0.5 กรัมในเฮปแทนโดยใช้เวลาการกวนเป็น 2, 5 และ 10 ชั่วโมง จากนั้นนำเอนไซม์ไลเปสไปเร่งปฏิกิริยา ซึ่งขั้นตอนการเร่งปฏิกิริยาจะแสดงในลำดับต่อไป

**ขั้นการล้างเอนไซม์ครึ่ง:** กรอง RF carbon gels ที่มีเอนไซม์ครึ่งอยู่อกจากระบบภายหลังการครึ่งเอนไซม์ ใช้เฮปแทนล้างเอนไซม์ครึ่ง 3 ครั้ง แล้วนำน้ำล้างไปตรวจหาปริมาณโปรตีนที่หลุดออกจาก RF carbon gels ในขั้นสุดท้าย ทำเอนไซม์ครึ่งให้แห้งโดยการตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมจะนำไปใช้

ปริมาณเอนไซม์ที่ครึ่งได้คำนวณได้เช่นเดียวกันกับสมการที่ 4.1



รูปที่ 3.9 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF Carbon Gels

#### การตรึงโดยวิธีห่อหุ้มภายในเจล (Gel entrapment method)

สำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีห่อหุ้มภายในเจลนั้น จะทำการตรึงเฉพาะกับ RF-NS gel เช่นเดียวกับกับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส โดยเริ่มจากการเตรียมสารละลาย RF ที่มีอัตราส่วน R/F และ C/W เป็น 0.5 และ 5.67 โมลต่อลูกบาศก์เมตร สำหรับกรณีของเอนไซม์ไลเปสที่นำมาตรึงนั้นจะอยู่ในรูปของผง ดังนั้นจึงไม่ต้องทำการชดเชยปริมาณน้ำเหมือนกับในกรณีการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส

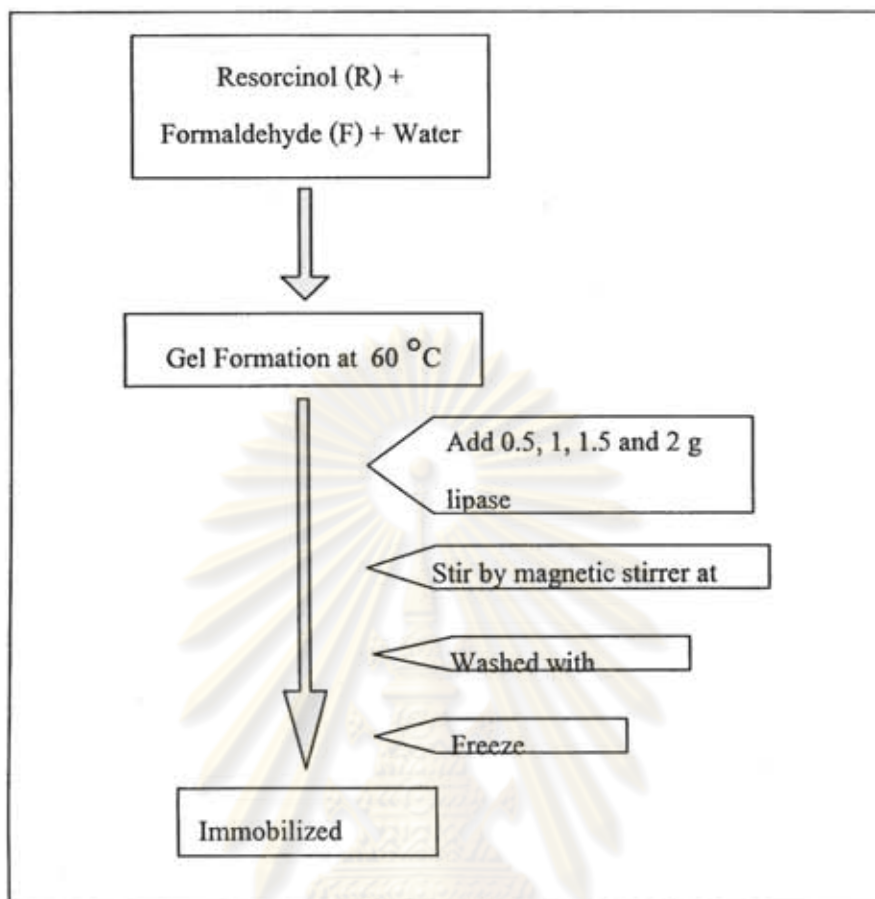
นำสารละลาย RF ที่เตรียมได้ 20 มิลลิลิตรเข้าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายใกล้จะแห้งเหือดเสียความเป็นของไหล จึงนำออกมาเข้าอ่างน้ำเย็นเพื่อลดอุณหภูมิของสารละลาย เมื่อสารละลายเย็นตัวลง ทำการเติมเอนไซม์ไลเปส 0.5 กรัม, 1 กรัม, 1.5 กรัม และ 2 กรัม ลงไป แล้วกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเบา ๆ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายแข็งขึ้นกลายเป็นเจล

ทำการล้าง RF gel ที่มีเอนไซม์อยู่ด้วยเฮปแทน นำน้ำล้างไปหาปริมาณโปรตีนที่หลุดออกหรืออีกนัยหนึ่งคือปริมาณโปรตีนที่ไม่ถูกตรึงอยู่ใน RF gel

เอนไซม์ตรึงถูกทำให้แห้งโดยการอบแห้งแบบเย็นเยือก (Freeze Drying) ที่อุณหภูมิแช่แข็ง -40 องศาเซลเซียส 30 นาที และทำการระเหยที่ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เอนไซม์ที่แห้งจะถูกตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 2x2x2 มิลลิเมตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมจะนำไปใช้

ปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้คำนวณได้เช่นเดียวกับสมการที่ 4.2





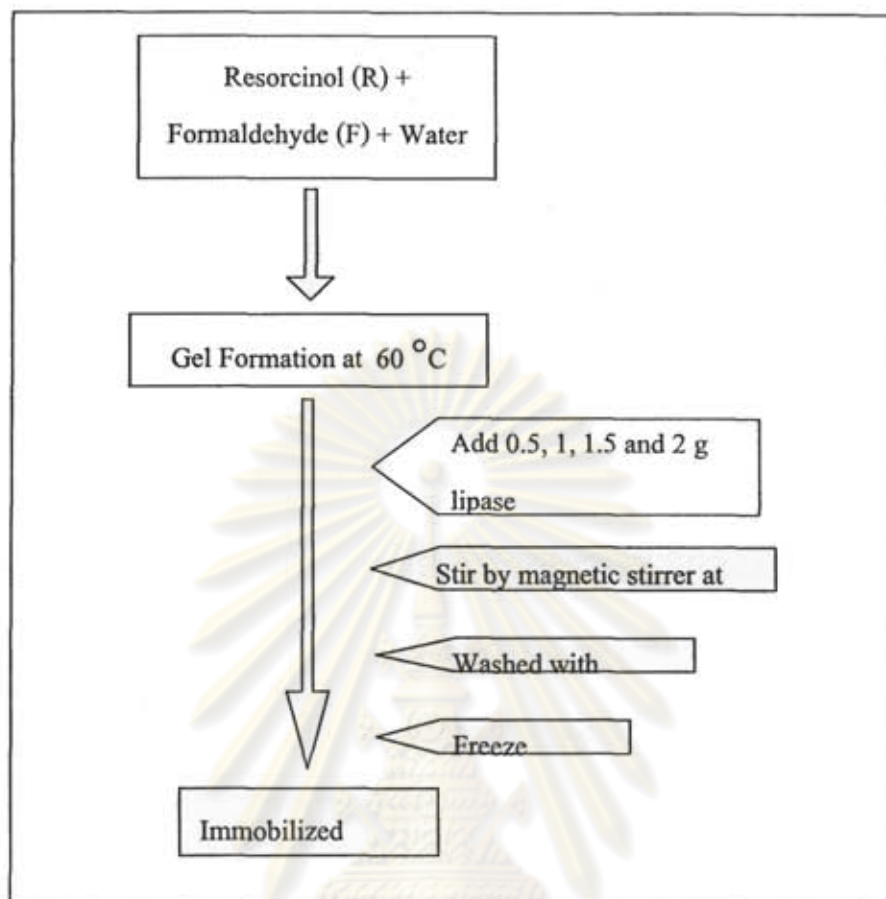
รูปที่ 3.10 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีห่อหุ้มในโครงเจลของ RF-NS Gel

#### การวิเคราะห์กิจกรรมและอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์ไลเปส

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส สามารถทดสอบจากการนำเอนไซม์ไปใช้เร่งปฏิกิริยา เอสเทอร์ริฟิเคชัน(esterification) ระหว่าง บิวทานอล กับ กรดบิวทาริก

ผสม บิวทานอล ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ และ กรดบิวทาริก ความเข้มข้น 550 มิลลิโมลาร์ ใน heptane ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปสอิสระ 50 มิลลิกรัม หรือ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 0.5 กรัม ลงในของผสม ทำการผสมด้วยเครื่องเขย่าในแนวระดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงต่างๆและหยุดการเร่งปฏิกิริยาโดยการแช่แข็ง จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ บิวทานอล ที่คงเหลืออยู่ในระบบโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟก๊าซ และใช้เฮกซะนอล เป็นสารมาตรฐาน (internal standard)

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาใช้ บิวทานอล ไป 1 ไมโครโมล ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายในเวลา 1 นาที



รูปที่ 3.10 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีห่อหุ้มในโครงเจลของ RF-NS Gel

#### การวิเคราะห์กิจกรรมและอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์ไลเปส

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส สามารถทดสอบจากการนำเอนไซม์ไปใช้เร่งปฏิกิริยา เอสเทอร์ริฟิเคชัน(esterification) ระหว่าง บิวทานอล กับ กรดบิวทาริก

ผสม บิวทานอล ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ และ กรดบิวทาริก ความเข้มข้น 550 มิลลิโมลาร์ ใน heptane ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปสอิสระ 50 มิลลิกรัม หรือ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 0.5 กรัม ลงในของผสม ทำการผสมด้วยเครื่องเขย่าในแนวระดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงต่างๆและหยุดการเร่งปฏิกิริยาโดยการแช่แข็ง จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ บิวทานอล ที่คงเหลืออยู่ในระบบโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟก๊าซ และใช้เฮกซะนอล เป็นสารมาตรฐาน (internal standard)

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาใช้ บิวทานอล ไป 1 ไมโครโมล ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายในเวลา 1 นาที

สำหรับการวิเคราะห์อัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น ทำได้โดยการเก็บตัวอย่างสารละลายในช่วงเวลา 0 ถึง 20 นาที ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ บีวทานอล เช่นเดียวกัน

#### การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยา

การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส ในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์รีฟิเคชัน เป็นการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาซ้ำของเอนไซม์เช่นเดียวกันกับกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส

วิธีทดสอบทำลักษณะเดียวกันกับวิธีในข้อ 4.6.4 เมื่อทำการเร่งปฏิกิริยาครบรอบคือ 24 ชั่วโมงเสร็จสิ้น จะทำการแยกเอนไซม์ครั้งรูปออกมาล้างด้วยเฮปแทน เพื่อทดสอบปริมาณเอนไซม์ที่เหลือภายหลังจากการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ จากนั้นนำเอนไซม์ครั้งไปเร่งปฏิกิริยากับสับสเตรทใหม่

ในกรณีของเอนไซม์ไลเปสอิสระที่อยู่ในรูปอนุภาคผง สามารถแยกเอนไซม์ออกจากระบบได้ และสามารถเติมลงในสับสเตรทใหม่ ซึ่งจะต่างกับกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ที่อยู่ในรูปของสารละลาย



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสในการเก็บรักษา

การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสในการเก็บรักษาทำได้โดย นำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึง ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง นำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.6.3 ทุก ๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากวิธีการทดลองที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3.4

Condition	Samples		
	RF-NS carbon	RF-CS carbon	RF-NS gel
<b>1. Preparation</b>			
1.1 C/W of RF solution (mol/m <sup>3</sup> )	5.67	5.67	5.67
1.2 Surfactant	-	cationic surfactant	-
1.3 Gels formation temperature ( °C)	60	60	60
1.4 Aging	60 °C 1 day, T <sub>m</sub> 3 days	60 °C 1 day, T <sub>m</sub> 3 days	-
1.5 Drying	MW drying	MW drying	Freeze drying
1.6 Solvent exchange	t-butanol	t-butanol	-
1.7 Carbonization	750 °C	750 °C	-
<b>2. Enzyme immobilization</b>			
1.1 Enzyme	Alkaline protease	Alkaline protease	Alkaline protease
	Lipase	Lipase	Lipase
1.2 Immobilization techniques	Physical adsorption	Physical adsorption	Gel entrapment

ตารางที่ 3.4 แสดงสรุปเงื่อนไขในการเตรียมอาร์เอฟเจลและ คาร์บอนเจล และการนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์

ศูนย์วิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสในการเก็บรักษา

การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสในการเก็บรักษาทำได้โดย นำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึง ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง นำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.6.3 ทุก ๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากวิธีการทดลองที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3.4

Condition	Samples		
	RF-NS carbon	RF-CS carbon	RF-NS gel
<b>1. Preparation</b>			
1.1 C/W of RF solution (mol/m <sup>3</sup> )	5.67	5.67	5.67
1.2 Surfactant	-	cationic surfactant	-
1.3 Gels formation temperature (°C)	60	60	60
1.4 Aging	60°C 1 day, T <sub>m</sub> 3 days	60°C 1 day, T <sub>m</sub> 3 days	-
1.5 Drying	MW drying	MW drying	Freeze drying
1.6 Solvent exchange	t-butanol	t-butanol	-
1.7 Carbonization	750 °C	750 °C	-
<b>2. Enzyme immobilization</b>			
1.1 Enzyme	Alkaline protease	Alkaline protease	Alkaline protease
	Lipase	Lipase	Lipase
1.2 Immobilization techniques	Physical adsorption	Physical adsorption	Gel entrapment

ตารางที่ 3.4 แสดงสรุปเงื่อนไขในการเตรียมอาร์เอฟเจลและ คาร์บอนเจล และการนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์

ศูนย์วิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการศึกษาและการอภิปรายผล

รายละเอียดในบทนี้แบ่ง 3 หัวข้อ คือ

1. ผลการศึกษาและการอภิปรายผลเรื่องความเป็นไปได้ในการใช้กระบวนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave dryi-ng) เพื่อใช้ในการอบแห้ง RF gel ที่เตรียมด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ โซล-เจล พอลิ คอนเดนเซชัน (Sol-gel polycondensation)

2. ผลการศึกษาและการอภิปรายผลเรื่องความเป็นไปได้ในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเล็กมาก (Ultramicrosphere) ด้วยการ ใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ Inverse emulsion

3. ผลการศึกษาและการอภิปรายผลเรื่องการทำ RF Gel/Carbon gel ไปใช้งานด้าน Biochemical Engineering

โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.1 ผลการศึกษาและการอภิปรายผลเรื่องความเป็นไปได้ในการใช้กระบวนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave dryi-ng) เพื่อใช้ในการอบแห้ง RF gel ที่เตรียมด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ โซล-เจล พอลิ คอนเดนเซชัน (Sol-gel polycondensation)

4.1.1 ริโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจล ที่มีโครงสร้างรูพรุนแบบมีโซ

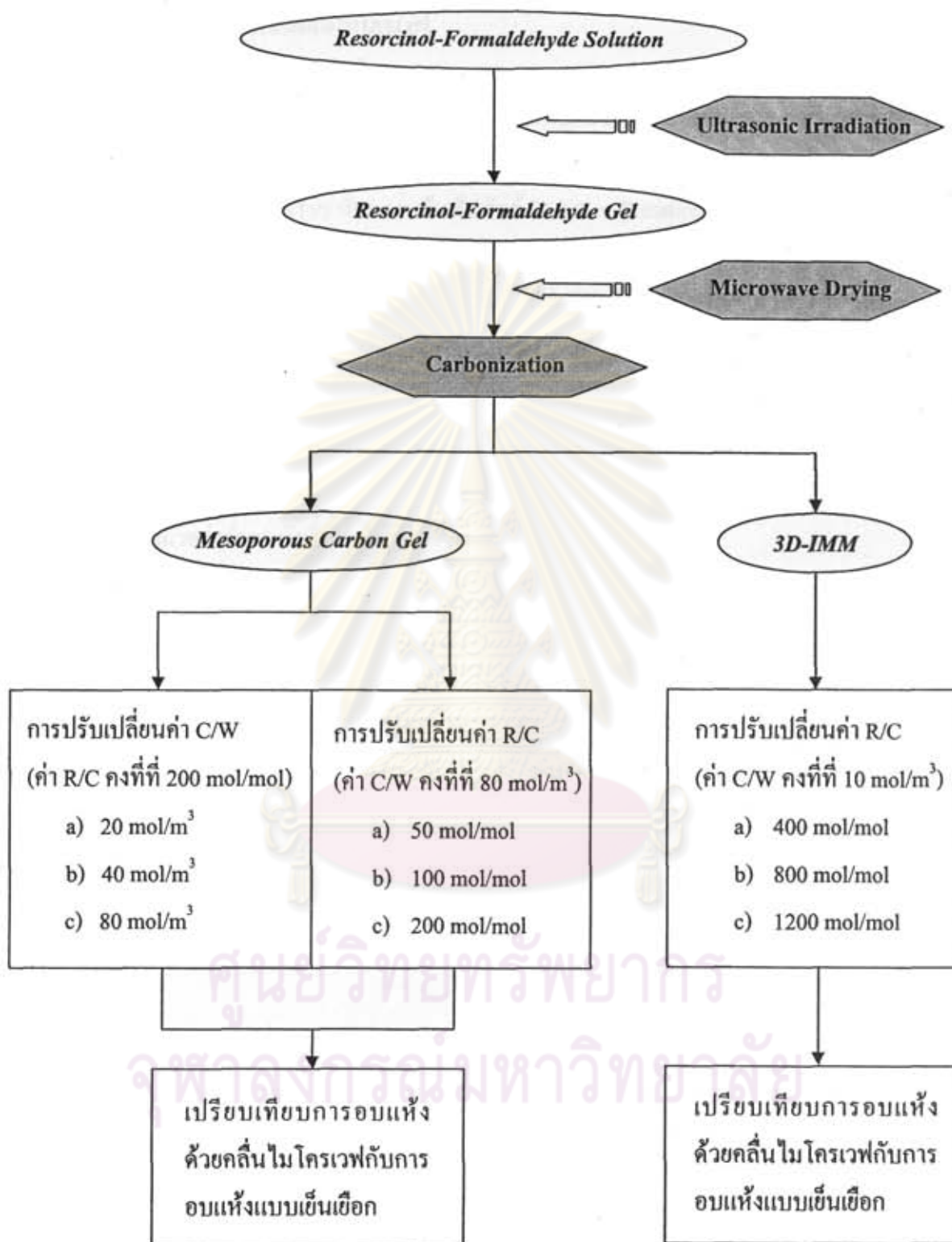
ในส่วนนี้ผลการทดลองจะศึกษาถึงผลของการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ ที่มีต่อลักษณะสมบัติรูพรุนแบบมีโซและการกระจายขนาดครีสมิรูพรุนของริโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจล ซึ่งเตรียม โดยใช้คลื่นเหนือเสียงระหว่างชั้นตอน โซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน รวมถึงการปรับเปลี่ยนค่า R/C และค่า C/W

#### สมบัติความเป็นรูพรุน

สมบัติความเป็นรูพรุนแบบมีโซของริโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจล ที่ได้จากการเผาให้เป็นคาร์บอนของริโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล ภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 750 องศาเซลเซียส โดยจะเรียก RF gel หลังจากการเผาให้เป็นคาร์บอนว่า “Carbon gel” และเรียก RF sonogel หลังจากการเผาให้เป็นคาร์บอนว่า “Carbon sonogel”



## Microwave Drying



รูปที่ 4.1 แผนผังศึกษาผลของการใช้คลื่นไมโครเวฟในขั้นตอนของการอบแห้ง เพื่อเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจล

#### 4.1.2 การปรับเปลี่ยนค่า $C/W$ และค่า $R/C$ ที่ใช้ในการเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอน เจลซึ่งผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ

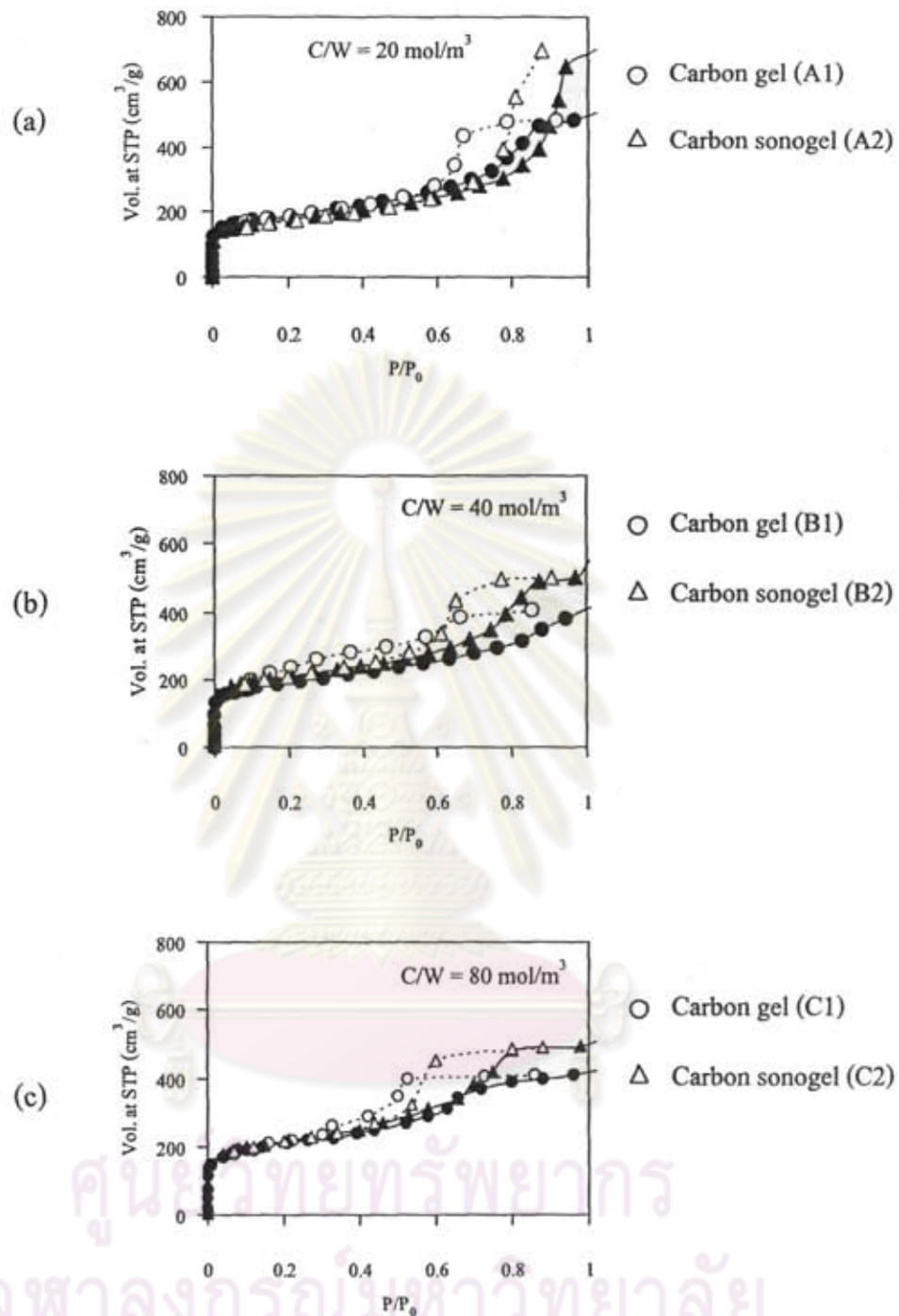
##### ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ในโตรเจน

จากการนำ Carbon gel และ Carbon sonogel ไปตรวจสอบสมบัติการดูดซับ-คายซับ ก๊าซ ในโตรเจนที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน แล้วนำข้อมูลมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของของไหลที่ถูกดูดซับ (Vol. at STP) กับความดันสัมพัทธ์ (Relative Pressure,  $P/P_0$ ) กราฟที่ได้คือ ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ในโตรเจน ดังรูปที่ 4.1(a), 4.1(b), 4.1(c), 4.2(b), 4.2(c) พบว่ามีลักษณะไอโซเทอมเป็น Type IV ตามการจำแนกของ IUPAC ซึ่งบ่งบอกว่ามีรูพรุนภายในโครงสร้างของวัสดุ ดังกล่าวเป็นแบบมีโซ [K.S.W. Sing et.al., 1982] ยกเว้นที่ค่า  $C/W$  เท่ากับ 80 โมลต่อลูกบาศก์เมตร ซึ่งมีค่า  $R/C$  เป็น 50 โมลต่อโมล จะมีลักษณะไอโซเทอมที่ไม่สามารถตรวจสอบสมบัติรูพรุนได้ ดังรูปที่ 4.3(a)

จากผลดังกล่าวสามารถคำนวณลักษณะสมบัติรูพรุนซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 4.1 ซึ่งประกอบไปด้วยค่าต่างๆ ดังนี้

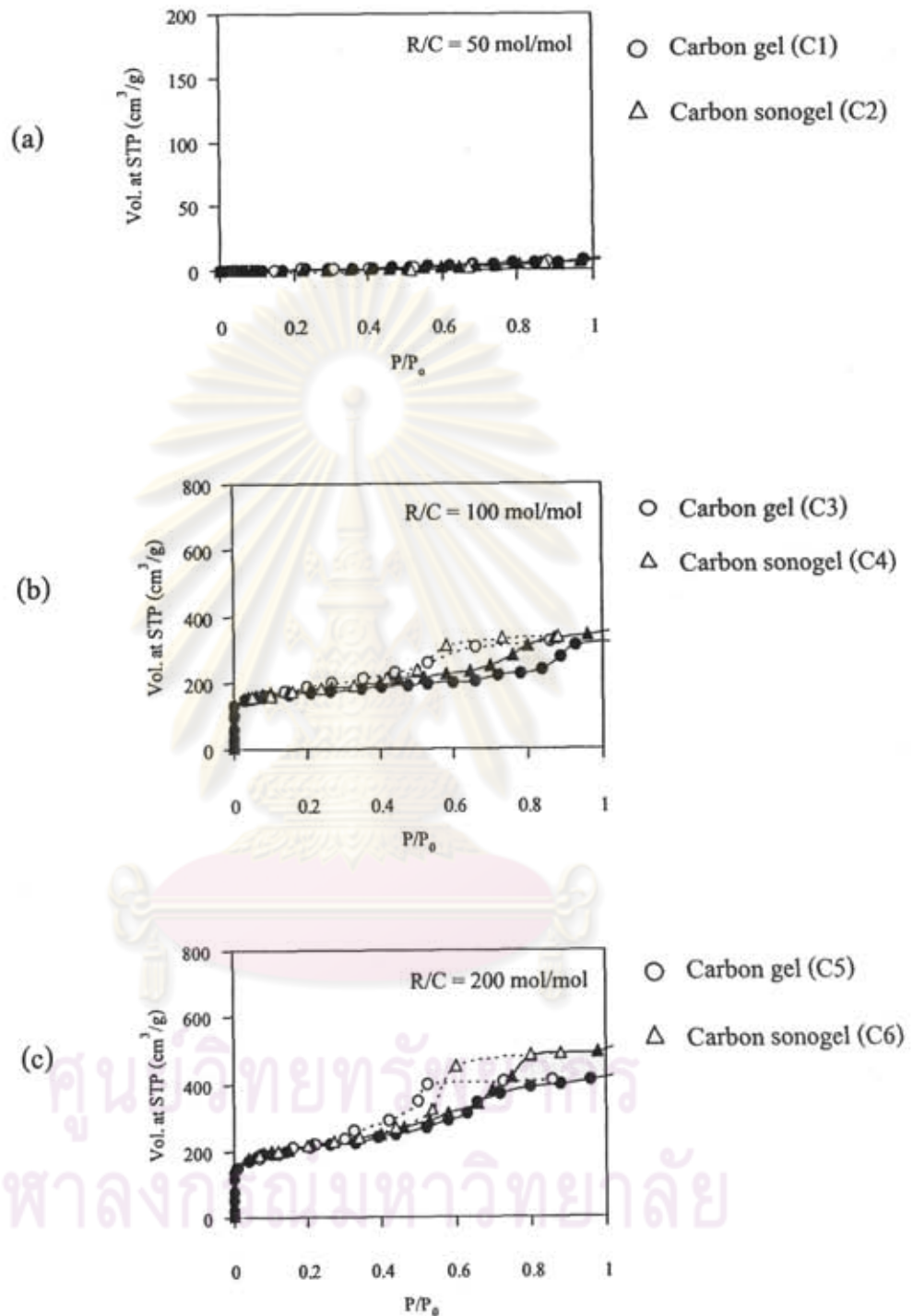
- ปริมาตรรูพรุนแบบไมโคร (Micropore volume;  $V_{mic}$ )
- ปริมาตรรูพรุนแบบมีโซ (Mesopore volume;  $V_{mes}$ )
- รัศมีสูงสุดของการกระจายขนาดรัศมีรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ (Peak Radius of Mesopore Size Distribution;  $R_p$ )
- พื้นที่ผิว BET (BET Surface Area;  $S_{BET}$ )

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ Carbon gel และ Carbon sonogel ที่ผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟเมื่อ  $R/C = 200 \text{ mol/mol}$  และมีค่า  $C/W$  เป็น (a)  $20 \text{ mol/m}^3$  (b)  $40 \text{ mol/m}^3$  และ (c)  $80 \text{ mol/m}^3$





รูปที่ 4.3 ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ Carbon gel และ Carbon sonogel ที่ผ่านการอบแห้งด้วยคลื่น ไมโครเวฟเมื่อ  $C/W = 80 \text{ mol/m}^3$  และมีค่า  $R/C$  เป็น (a)  $50 \text{ mol/mol}$  (b)  $100 \text{ mol/mol}$  และ (c)  $200 \text{ mol/mol}$

ตารางที่ 4.1 ค่าลักษณะสมบัติรูพรุนของ Carbon Sonogel และ Carbon Gel ที่สภาวะต่างๆ

Sample	C/W (mol/m <sup>3</sup> )	R/C (mol/mol)	R/W (g/cm <sup>3</sup> )	P <sub>ultrasonic</sub> (watt)	Pore Vol. (cm <sup>3</sup> /g)		R <sub>p</sub> (nm)	S <sub>BET</sub> (cm <sup>2</sup> /g)
					V <sub>mic</sub>	V <sub>mes</sub>		
A1	20	200	0.44	0	0.13	0.65	2.97	610
A2	20	200	0.44	22	0.12	0.99	5	570
B1	40	200	0.89	0	0.16	0.49	2.5	522
B2	40	200	0.89	22	0.15	0.68	2.8	665
C1	80	200	1.76	0	0.10	0.45	1.9	731
C2	80	200	1.76	22	0.10	0.59	2.3	755
C3	80	100	0.89	0	0.18	0.29	1.8	616
C4	80	100	0.89	22	0.16	0.33	2.2	642
C5	80	50	0.44	0	N/D	0.01	N/D	6
C6	80	50	0.44	22	N/D	0.02	N/D	5

จากตารางที่ 4.1 เมื่อพิจารณาการปรับเปลี่ยนค่า C/W ที่ใช้ในการเตรียม Carbon gel และ Carbon sonogel พบว่าเมื่อค่า C/W เท่ากับ 20 โมลต่อลูกบาศก์เมตรสมบัติรูพรุนของ Carbon gel และ Carbon sonogel ที่ผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ จะมีสูงกว่าที่ C/W เท่ากับ 40 และ 80 โมลต่อลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ แต่เมื่อใช้คลื่นเหนือเสียงระหว่างชั้นคอนโซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน ของ ริโซซินอล กับ ฟอรั่มลดีไซด์ จะเห็นว่าสมบัติรูพรุนมีค่าสูงขึ้นที่สภาวะในการเตรียมเหมือนกัน

จากผลข้างต้นมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อค่า C/W สูงขึ้นทำให้ปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีฤทธิ์เป็นด่างในขบวนการโซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน มีมากขึ้น การเกิด ริโซซินอล แอนไอออน (Resorcinol anion) จึงมากขึ้นด้วย ทำให้จำนวนอนุพันธ์ของ Hydroxymethyl (-CH<sub>2</sub>OH) ที่ได้จากปฏิกิริยาการเติมมีจำนวนมากจึงเกิดการรวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคแรกเริ่มจำนวนมาก เมื่อเวลาผ่านไปอนุพันธ์ของ Hydroxymethyl ซึ่งได้ต่อมามีจำนวนน้อย จะเข้าร่วมตัวกับอนุภาคแรกเริ่มที่มีจำนวนมากในตอนแรกด้วยปฏิกิริยาโพลีคอนเดนเซชัน ผลดังกล่าวทำให้อนุภาคปฐมภูมิมีขนาดเล็ก [T. Yamamoto et.al., 2002, T. Yamamoto et.al., 2003] ทำให้สมบัติรูพรุนลดลง และจากที่ Carbon sonogel มีสมบัติรูพรุนสูงกว่า Carbon gel นั้นเป็นไปได้ว่าคลื่นเหนือเสียงจะช่วยเร่งการรวมกลุ่มของสารตั้งต้น การรวมตัว และการยึดเกาะกันของอนุภาคปฐมภูมิจนเป็น โครงร่างตาข่าย 3 มิติที่มีขนาดใหญ่ขึ้น[N. Tonanon et.al., 2004] ทำให้สมบัติรูพรุนมีค่าสูงขึ้น

จากตารางที่ 4.1 เมื่อพิจารณาการปรับเปลี่ยนค่า R/C ที่ใช้ในการเตรียม Carbon gel และ Carbon sonogel พบว่าเมื่อค่า R/C เท่ากับ 50 โมลต่อโมล ไม่สามารถคำนวณหาลักษณะรูพรุนได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลของไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน ดังรูปที่ 4.3 (a) แต่เมื่อเพิ่มค่า R/C ที่ใช้ในการเตรียม Carbon gel และ Carbon sonogel เป็น 100 โมลต่อโมล พบว่าสามารถรักษาสมบัติรูพรุนไว้ได้ และจะเห็นว่าสมบัติรูพรุน มีค่าใกล้เคียงกัน ต่อมาเมื่อเพิ่มค่า R/C เป็น 200 โมลต่อโมล พบว่าสมบัติรูพรุนมีค่าสูงขึ้น และจะเห็นว่าสมบัติรูพรุนของ Carbon sonogel นั้นสูง กว่า Carbon gel ทำให้ทราบว่า การเตรียม Carbon sonogel โดยใช้คลื่นไมโครเวฟในขั้นตอนการอบแห้ง นั้น เมื่อใช้คลื่นเหนือเสียงระหว่างขั้นตอน โซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน ของ ริโซซินอล กับ ฟอรั่มัลดีไฮด์ จะช่วยในการปรับปรุงสมบัติรูพรุนของ Carbon sonogel ให้ดีขึ้น แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับค่า R/C ที่ใช้ในการเตรียมด้วย

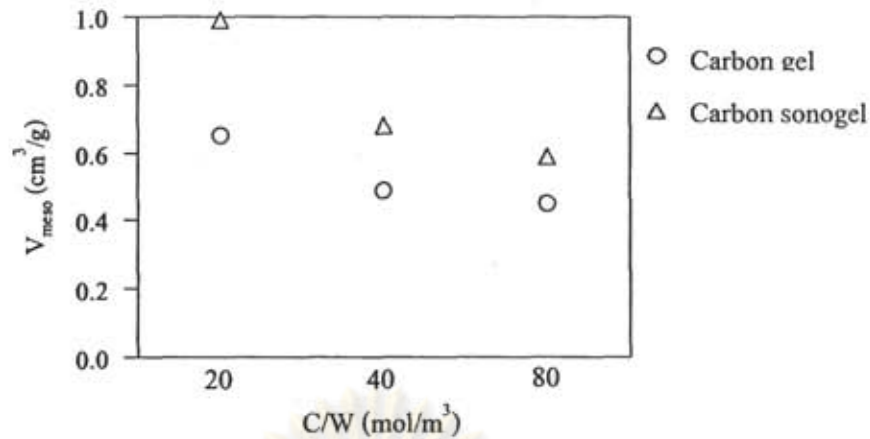
#### ลักษณะสมบัติรูพรุนแบบมีโซ

ในส่วนนี้จะอภิปรายผลการทดลอง โดยการปรับเปลี่ยนตัวแปรที่มีผลต่อลักษณะรูพรุนแบบมีโซของริโซซินอล-ฟอรั่มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจลที่เตรียมโดยใช้คลื่นเหนือเสียง โดยผ่านขั้นตอนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ ดังนี้

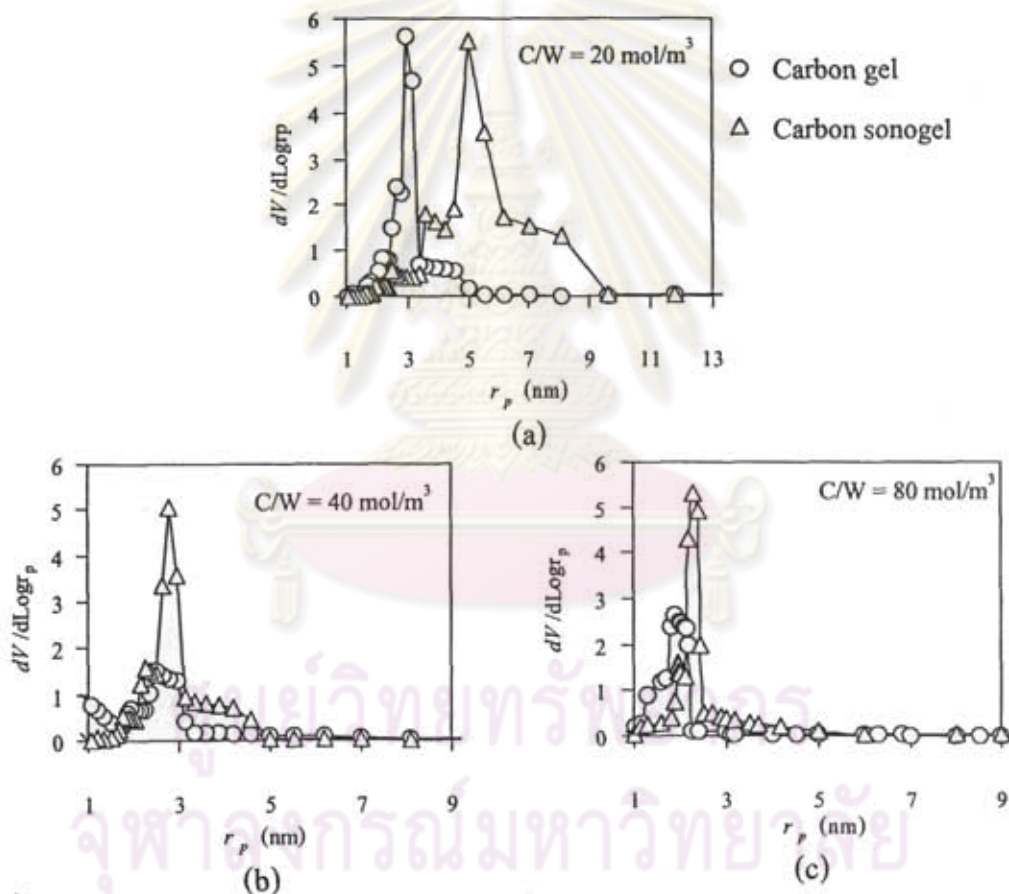
#### 1) การปรับเปลี่ยนค่า C/W ที่ใช้ในการเตรียมริโซซินอล-ฟอรั่มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจลซึ่งผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ

จากกราฟรูปที่ 4.4 จะเห็นว่าปริมาณรูพรุนแบบมีโซของ Carbon gel และ Carbon sonogel ที่ผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟเมื่อค่า C/W เท่ากับ 20 โมลต่อลูกบาศก์เมตรนั้นมากกว่าที่ค่า C/W เท่ากับ 40 และ 80 โมลต่อลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ แต่ Carbon sonogel จะมีปริมาณรูพรุนแบบมีโซมากกว่า Carbon gel และเมื่อดูการกระจายขนาดรัศมีรูพรุนแบบมีโซจากรูปที่ 4.5 พบว่า Carbon sonogel จะมีปริมาณรูพรุนแบบมีโซในช่วงที่ใหญ่กว่า Carbon gel เมื่อสภาวะที่ใช้ในการเตรียมเหมือนกัน ดังที่กล่าวไว้ข้างต้นซึ่งเป็นไปได้ว่าคลื่นเหนือเสียงนั้นช่วยในการรวมกลุ่ม และการเติบโตของอนุภาคแรกเริ่มทำให้อนุภาคปฐมภูมิมีขนาดใหญ่ขึ้น ปริมาตรรูพรุนแบบมีโซของ Carbon sonogel จึงมากกว่า Carbon gel โดยการกระจายขนาดรัศมีรูพรุนแบบมีโซของ Carbon sonogel เมื่อค่า C/W เท่ากับ 80 โมลต่อลูกบาศก์เมตรนั้นจะแคบกว่าเมื่อค่า C/W เท่ากับ 20 และ 40 โมลต่อลูกบาศก์เมตร เมื่อค่า C/W สูงจึงทำให้เกิดอนุภาคแรกเริ่มจำนวนมากในปฏิกิริยาโซล-เจล-โพลีคอนเดนเซชัน ของ ริโซซินอล กับ ฟอรั่มัลดีไฮด์ ดังนั้นขนาดของอนุภาคปฐมภูมิที่เกิดในขั้นสุดท้ายน่าจะมีขนาดใกล้เคียงกัน ทำให้การกระจายขนาดรัศมีรูพรุนแบบมีโซแคบกว่าที่ค่า C/W ต่ำ





รูปที่ 4.4 ค่าปริมาตรรูพรุนแบบมีโซที่ค่า  $C/W$  ต่างๆ ของ Carbon gel และ Carbon sonogel เมื่อค่า  $R/C$  เท่ากันคือ 200 mol/mol



รูปที่ 4.5 การกระจายขนาดรัศมีรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ ( $r_p$ ) ของ Carbon gel และ Carbon sonogel เมื่อ  $R/C = 200 \text{ mol/mol}$  และมีค่า  $C/W$  เป็น (a)  $20 \text{ mol/m}^3$ , (b)  $40 \text{ mol/m}^3$  และ (c)  $80 \text{ mol/m}^3$

อย่างไรก็ตามจากผลข้างต้นจะเห็นว่าเมื่อค่า  $C/W$  สูงขึ้น ทั้ง Carbon gel และ Carbon sonogel จะมีสมบัติรูพรุนค่อนข้างต่ำ แต่เวลาที่ใช้ในเตรียมนั้นเร็วมากเมื่อเปรียบเทียบกับที่ค่า  $C/W$  ต่ำ ดังนั้นในหัวข้อต่อไปจะศึกษาถึงการปรับเปลี่ยนค่า  $R/C$  ที่สภาวะเริ่มแรกในการเตรียม Carbon gel และ Carbon sonogel เพื่อปรับปรุงสมบัติรูพรุนของวัสดุดังกล่าวให้ดีขึ้น

2) การปรับเปลี่ยนค่า R/C ที่ใช้ในการเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจลซึ่งผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ

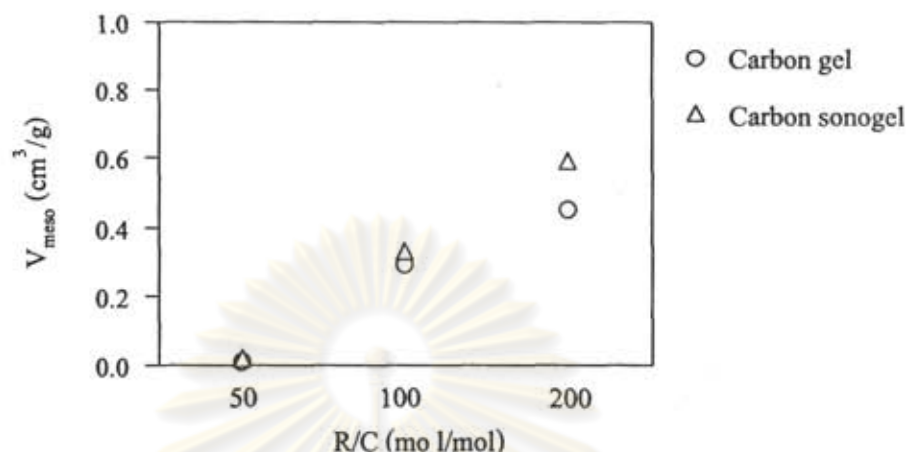
จากกราฟรูปที่ 4.6 Carbon gel และ Carbon sonogel ที่เตรียมได้ในสถานะค่า C/W เท่ากับ 80 โมลต่อลูกบาศก์เมตร โดยใช้คลื่นไมโครเวฟในขั้นตอนการอบแห้ง พบว่าเมื่อค่า R/C สูงขึ้น จะมีปริมาตรรูพรุนแบบมีโซมากขึ้น โดยที่ค่า R/C เท่ากับ 50 โมลต่อโมล จะไม่มีปริมาตรรูพรุนแบบมีโซของ Carbon gel และ Carbon sonogel

จากข้างต้นเป็นไปได้ว่าที่ค่า R/C นี้ปริมาณของรีโซซินอลมีจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีฤทธิ์เป็นด่างจึงมีความเป็นไปได้ว่าทำให้เกิดเรโซซินอล แอนไอออน (Resorcinol Anion) ได้มากเป็นผลให้จำนวนอนุพันธ์ของ Hydroxymethyl ( $-CH_2OH$ ) จากปฏิกิริยาการเติมของเรโซซินอล แอนไอออน กับฟอร์มัลดีไฮด์ มีจำนวนมาก อนุภาคแรกเริ่มจึงมีจำนวนมาก ทำให้อนุพันธ์ของ Hydroxymethyl ที่ได้ต่อมาซึ่งมีจำนวนน้อย เข้าร่วมตัวกับอนุภาคแรกเริ่มที่มีจำนวนมากในตอนแรกจึงทำให้อนุภาคปฐมภูมิมีขนาดเล็กมาก หลังจากผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟและการเผาให้เป็นคาร์บอนจึงไม่มีปริมาตรรูพรุนเหลืออยู่ แต่เนื่องจากการทดลองนี้ศึกษาเพียงลักษณะรูพรุนของ Carbon gel และ Carbon sonogel โดยไม่ได้ศึกษาลักษณะรูพรุนของ RF gel และ RF sonogel ที่ได้หลังจากการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟจึงยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าการไม่พบลักษณะรูพรุนใน Carbon gel และ Carbon sonogel นั้นเกิดจากขั้นตอนของการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟหรือหลังจากการเผาให้เป็นคาร์บอน

ต่อมาเมื่อเพิ่มค่า R/C เท่ากับ 100 mol/mol นั้นสามารถรักษาปริมาตรรูพรุนแบบมีโซไว้ได้ ซึ่งจากเหตุผลข้างต้นเป็นไปได้ว่าเมื่อค่า R/C สูงขึ้นปริมาณของรีโซซินอลมีจำนวนมากขึ้นเมื่อเทียบกับปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีฤทธิ์เป็นด่างจึงเกิดรีโซซินอล แอนไอออนได้น้อยลงเป็นผลให้อนุภาคปฐมภูมิมีขนาดใหญ่ขึ้น จึงทนต่อการยุบตัวหลังจากผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟและการเผาให้เป็นคาร์บอน โดยปริมาตรรูพรุนแบบมีโซของ Carbon gel นั้นจะใกล้เคียงกับ Carbon sonogel แต่เมื่อค่า R/C เพิ่มขึ้นเป็น 200 โมล/โมล พบว่าปริมาตรรูพรุนแบบมีโซของ Carbon sonogel จะมากกว่า Carbon gel

เมื่อพิจารณารูปที่ 4.7 การกระจายขนาดรัศมีของรูพรุนของ Carbon gel และ Carbon sonogel ที่ใช้คลื่นไมโครเวฟในขั้นตอนการอบแห้งพบว่าเมื่อค่า R/C สูงขึ้นมีผลทำให้ปริมาตรรูพรุนแบบมีโซของ Carbon sonogel และ Carbon gel สูงขึ้นด้วย โดยที่ค่า R/C เท่ากับ 50 โมล/โมล นั้นไม่สามารถสังเกตเห็นการกระจายขนาดรัศมีรูพรุนของ Carbon gel และ Carbon sonogel ซึ่งสอดคล้องกับรูป SEM แต่ที่ค่า R/C เท่ากับ 100 โมล/โมล ถึงแม้ว่าปริมาตรรูพรุนแบบมีโซของ Carbon gel และ Carbon sonogel จะใกล้เคียงกันแต่การกระจายขนาดรัศมีรูพรุนของ Carbon

sonogel นั้นคิดว่า Carbon gel และที่ค่า R/C เท่ากับ 200 โมล/โมล การกระจายขนาดครีมีรูพรุนของ Carbon sonogel จะอยู่ในช่วงที่ใหญ่กว่า Carbon gel เล็กน้อย

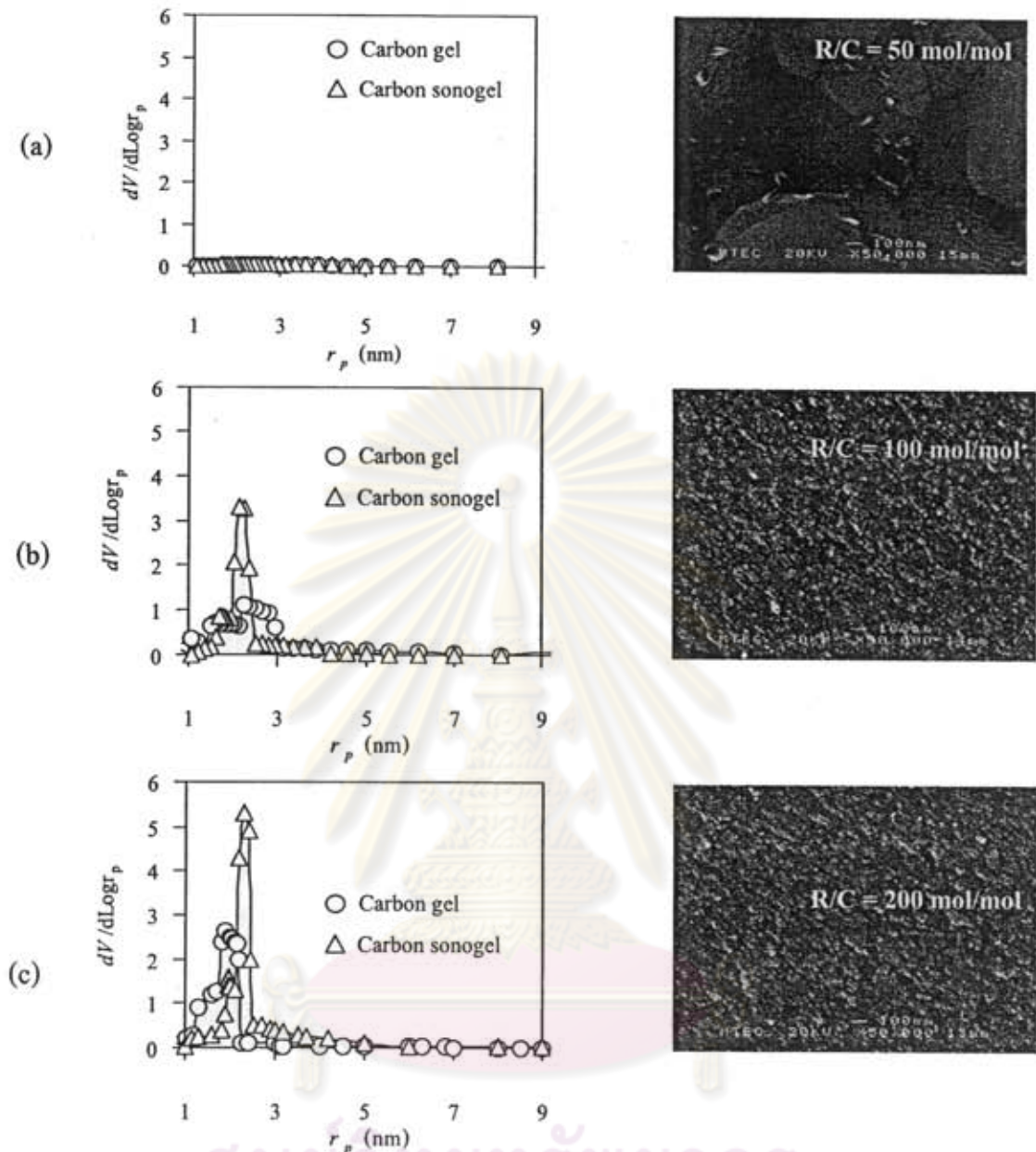


รูปที่ 4.6 ค่าปริมาตรรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ที่ค่า R/C ต่างๆ ของ Carbon gel และ Carbon sonogel เมื่อค่า C/W เท่ากันคือ 80 mol/m<sup>3</sup>

จากการทดลองในส่วนนี้จะเห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้คลื่นไมโครเวฟในขั้นตอนการอบแห้ง ซึ่งยังสามารถรักษาสมบัติรูพรุนของ Carbon gel และ Carbon sonogel ไว้ได้ และพบว่าการปรับเปลี่ยนค่า C/W และค่า R/C ที่สภาวะเริ่มแรกโดยการใช้คลื่นเหนือเสียงในการเตรียมสามารถปรับปรุงสมบัติรูพรุนของ Carbon gel และ Carbon sonogel ได้

นอกจากนี้ยังพบว่าที่ค่า C/W สูง (80 mol/m<sup>3</sup>) Carbon gel และ Carbon sonogel ที่ใช้คลื่นไมโครเวฟในขั้นตอนของการอบแห้งสามารถรักษาสมบัติรูพรุนไว้ได้ ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเมื่อค่า C/W มีค่าสูงในการเตรียม Carbon gel โดยใช้คลื่นไมโครเวฟในขั้นตอนของการอบแห้ง หลังจากผ่านการเผาให้เป็นคาร์บอนแล้ว Carbon gel ไม่สามารถรักษาสมบัติรูพรุนไว้ได้ [H. Tamon et.al., 2003] แต่งานวิจัยนี้พบว่าการเพิ่มค่า R/C ที่สภาวะเริ่มแรก และการใช้คลื่นเหนือเสียงเพื่อช่วยเร่งการรวมกลุ่ม และการยึดเกาะกันของอนุภาคปฐมภูมิจนเป็นโครงร่างตาข่าย 3 มิติ ทำให้อนุภาคปฐมภูมิที่ยึดเกาะกันมีขนาดใหญ่ขึ้น จึงทนต่อการยุบตัวหลังจากการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟและการเผาให้เป็นคาร์บอน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้วิธีการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟในขั้นตอนของการอบแห้ง RF gel และ RF sonogel ก่อนการเผาให้เป็นคาร์บอนได้ ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายที่ใช้ในขั้นตอนของการอบแห้งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอบแห้งแบบเย็นเยือก





รูปที่ 4.7 การกระจายขนาดรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ ( $r_p$ ) ของ Carbon gel และ Carbon sonogel และภาพถ่าย SEM ของ Carbon sonogel เมื่อค่า  $C/W = 80 \text{ mol/m}^3$  และ ค่า  $R/C$  เป็น (a) 50 mol/mol, (b) 100 mol/mol และ (c) 200 mol/mol

#### 4.1.3 รีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจลที่ผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟเปรียบเทียบกับ การอบแห้งแบบเย็นเยือก

##### ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ในโตรเจนและลักษณะสมบัติรูพรุนแบบมีโซ

จากการนำ Carbon gel และ Carbon sonogel ไปตรวจสอบคุณสมบัติการดูดซับ-คายซับ ก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน แล้วนำข้อมูลมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรของ ไหลที่ถูกดูดซับ (Vol. at STP) กับความดันสัมพัทธ์ (Relative Pressure,  $P/P_0$ ) กราฟที่ได้คือ ไอ

ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ก๊าซไนโตรเจน ดังรูปที่ 4.8 จะเห็นว่า มีลักษณะเป็น Type IV จากลักษณะของไอโซเทอมนี้ทำให้ทราบว่า Carbon gel และ Carbon sonogel มีโครงสร้างของรูพรุนแบบมีโซ

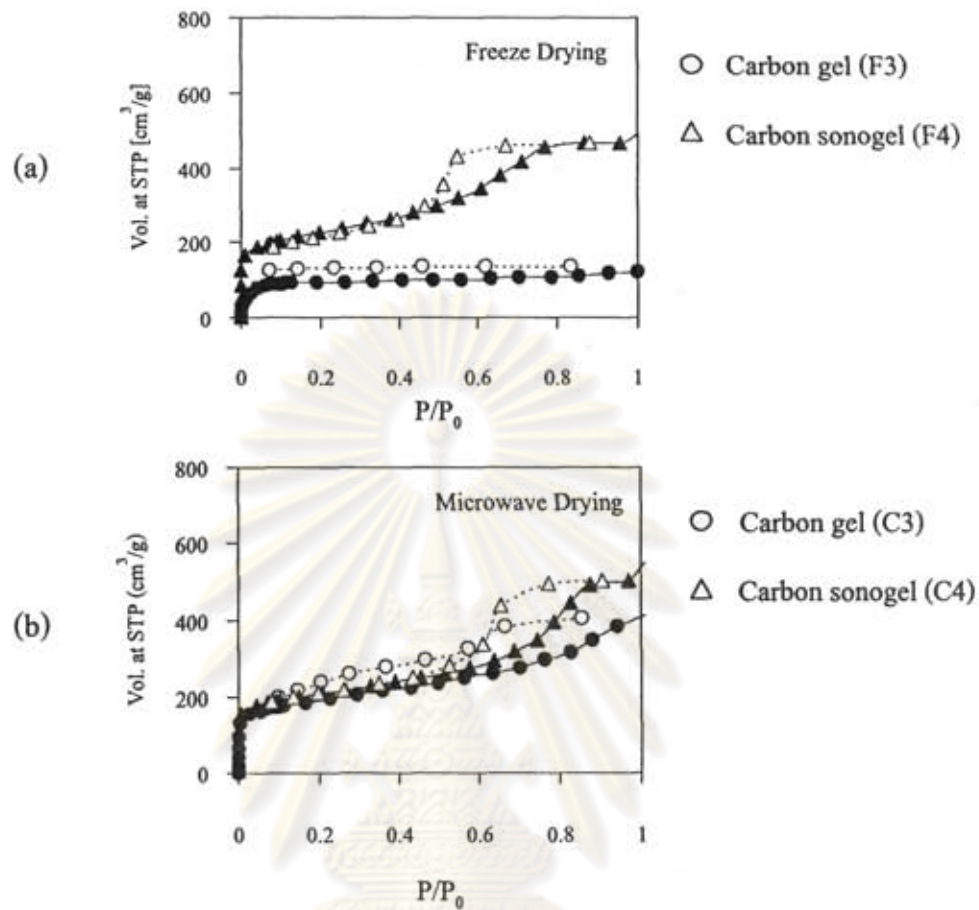
ข้อมูลที่ได้จากการดูดซับ-คายซับก๊าซไนโตรเจนสามารถนำมาคำนวณหาสมบัติของรูพรุนต่างๆ ได้ดังตารางที่ 4.2 นี้

ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบค่าลักษณะสมบัติรูพรุนของ Carbon gel และ Carbon sonogel ที่ผ่านขั้นตอนการอบแห้งแบบเย็นเยือกและการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟเมื่อสภาวะในการเตรียมเหมือนกัน

Drying Method	Sample	C/W (mol/m <sup>3</sup> )	R/C (mol/mol)	R/W (g/cm <sup>3</sup> )	P <sub>ultrasonic</sub> (watt)	Pore Vol. (cm <sup>3</sup> /g)		R <sub>p</sub> (nm)	S <sub>BET</sub> (cm <sup>2</sup> /g)
						V <sub>mic</sub>	V <sub>mes</sub>		
Freeze Drying	F1	40	200	0.89	0	0.17	0.61	3	750
	F2	40	200	0.89	22	0.17	0.75	3	740
	F3	80	100	0.89	0	0.12	0.08	ND	360
	F4	80	100	0.89	22	0.11	0.65	2	740
Microwave Drying	B1	40	200	0.89	0	0.16	0.49	2.5	522
	B2	40	200	0.89	22	0.15	0.68	2.8	665
	C3	80	100	0.89	0	0.18	0.29	1.8	616
	C4	80	100	0.89	22	0.16	0.33	2.2	642

\* ข้อมูลของการอบแห้งแบบเย็นเยือกมาจากงานวิจัยของ Tonanon และคณะปี 2004

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

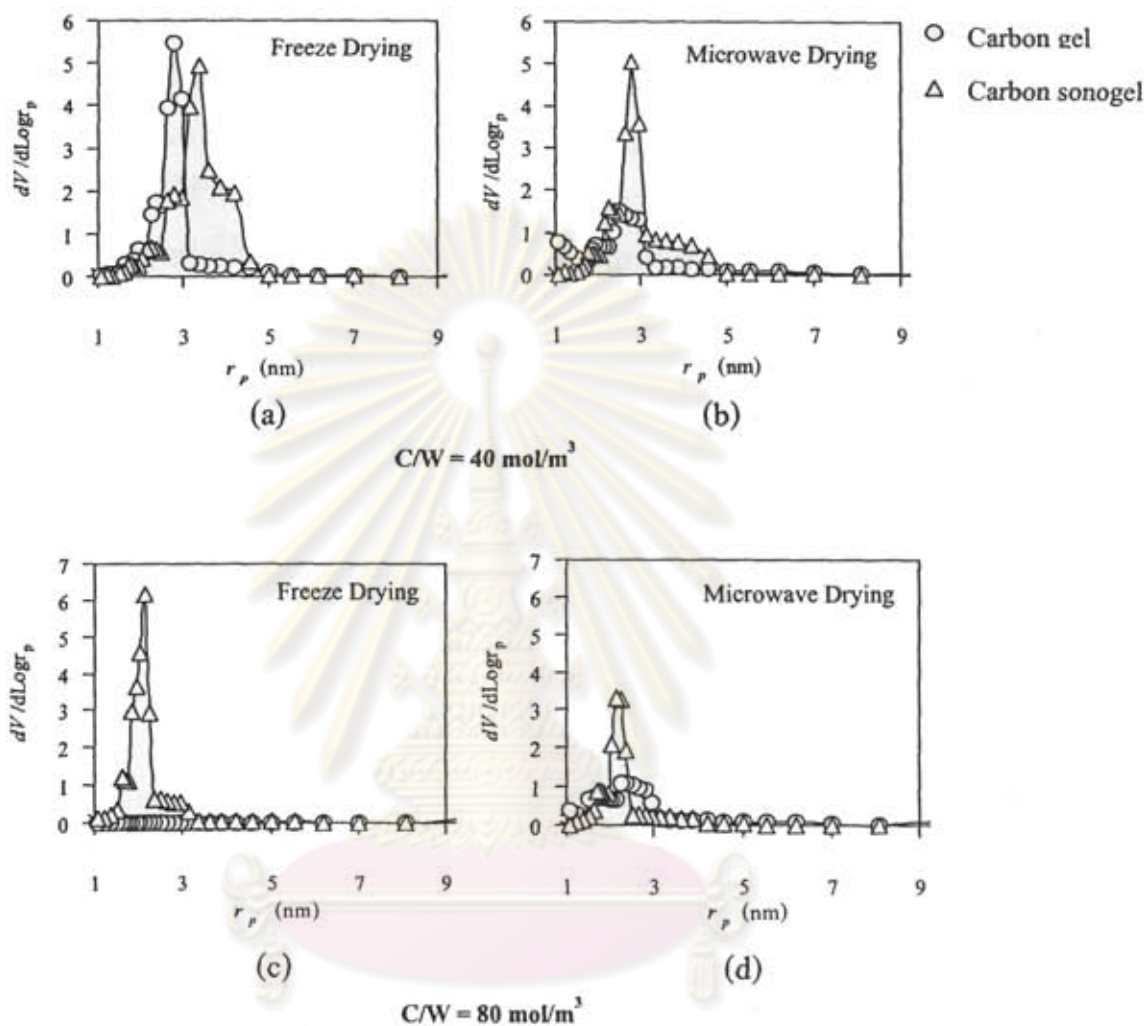


รูปที่ 4.8 ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ในโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ Carbon gel และ Carbon sonogel เมื่อ  $C/W = 80 \text{ mol/m}^3$  และมีค่า  $R/C = 100 \text{ mol/mol}$  โดยที่ (a) Freeze drying (b) Microwave drying

เมื่อพิจารณาถึงวิธีที่ใช้ในการอบแห้งซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งในการเตรียม Carbon gel และ Carbon sonogel จากตารางที่ 4.2 จะเห็นว่า Carbon gel และ Carbon sonogel ที่ใช้วิธีการอบแห้งแบบเย็นเยือก (F1, F2, F4) จะรักษาปริมาณรูพรุนแบบมีโซได้ดีกว่าวิธีการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ (B1, B2, C4) แต่จากรูปที่ 4.8(a) จะเห็นว่าตัวอย่าง F3 ซึ่งเป็น Carbon gel ที่ผ่านการอบแห้งแบบเย็นเยือกจะมีสมบัติรูพรุนต่ำกว่าตัวอย่าง C3 ซึ่งเป็น Carbon gel ที่ผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ โดยผลในส่วนนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ เนื่องจากที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นว่าการทดลองนี้ศึกษาเพียงลักษณะรูพรุนของ Carbon gel และ Carbon sonogel ซึ่งผ่านการเผาให้เป็นคาร์บอนจึงยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ชัดเจนว่าการอบแห้งแบบเย็นเยือกสามารถรักษาสมบัติรูพรุนได้ดีกว่าการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ แต่สามารถบอกได้ว่ามีความเป็นไปได้สำหรับการใช้คลื่นไมโครเวฟ



ในขั้นตอนของการอบแห้ง Carbon gel และ Carbon sonogel ซึ่งทำให้ยังคงรักษาสสมบัติรูพรุนแบบมีโซเอาไว้ได้



รูปที่ 4.9 การกระจายขนาดรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ ( $r_p$ ) ของ Carbon gel และ Carbon sonogel เมื่อค่า  $C/W$  เท่ากับ  $40 \text{ mol/m}^3$  และ  $80 \text{ mol/m}^3$  โดยผ่านขั้นตอน (a), (c) การอบแห้งแบบเย็นเยือก และ (b), (d) การอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ

จากกราฟรูปที่ 4.9 จะเห็นว่า การกระจายขนาดรูพรุนแบบมีโซของ Carbon sonogel นั้นดีกว่า Carbon gel ทั้งที่ผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟและการอบแห้งแบบเย็นเยือก โดย Carbon sonogel ที่ผ่านอบแห้งแบบเย็นเยือกจะมีการกระจายขนาดรูพรุนแบบมีโซใหญ่กว่า Carbon gel ที่ผ่านการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ

เมื่อคู่อัตราของคลื่นเหนือเสียงต่อการอบแห้งจากตารางที่ 4.2 และกราฟรูปที่ 4.9(a), 4.9(b) จะพบว่า Carbon gel ที่ใช้วิธีการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟมีปริมาณรูพรุนแบบมีโซคิดเป็น 80% ของ Carbon gel ที่ใช้วิธีการอบแห้งแบบเย็นเยือก แต่เมื่อใช้คลื่นเหนือเสียงในการ

สังเคราะห์ Carbon sonogel ทำให้ปริมาตรรูพรุนแบบมีโซของ Carbon sonogel ที่ใช้วิธีการอบแห้งด้วยคลื่น ไมโครเวฟ คิดเป็น 90 % ของ ปริมาตรรูพรุน Carbon gel ที่ใช้วิธีการอบแห้งแบบเย็นเยือก

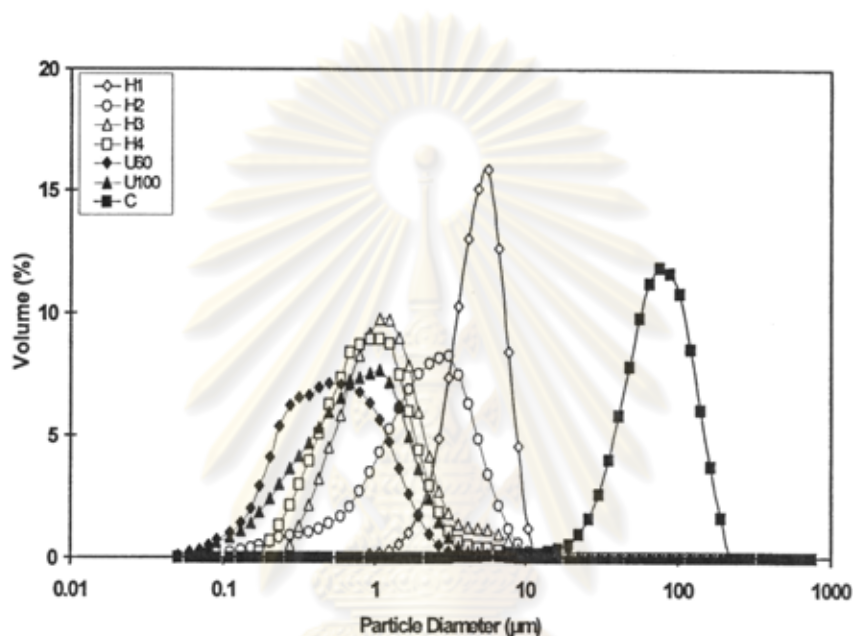
จะเห็นว่าคลื่นเหนือเสียงช่วยให้วิธีการอบแห้งด้วยคลื่น ไมโครเวฟมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้อบแห้ง RF sonogel โดยทำให้สมบัติความเป็นรูพรุนของ Carbon sonogel นั้นดีออกกว่าการใช้วิธีการอบแห้งแบบเย็นเยือกเพียงเล็กน้อย และเมื่อคุณลักษณะการกระจายขนาดรัศมีรูพรุนของ Carbon sonogel ที่ใช้วิธีการอบแห้งด้วยคลื่น ไมโครเวฟพบว่าเล็กกว่าการกระจายขนาดรัศมีรูพรุนของ Carbon sonogel ที่ใช้วิธีการอบแห้งแบบเย็นเยือก ซึ่งสนับสนุนเหตุผลข้างต้นถึงความเป็นไปได้ในการใช้วิธีการอบแห้งด้วยคลื่น ไมโครเวฟในขั้นตอนการสังเคราะห์ Carbon sonogel



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.2 ผลการศึกษาและการอภิปรายผลเรื่องความเป็นไปได้ในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเล็กมาก (Ultramicrosphere) ด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ Inverse emulsion

การทดลองส่วนนี้ใช้อุปกรณ์ต่างๆ ประกอบด้วย ไบกวน โซโมจิไนซ์เซอร์ และคลื่นเหนือเสียง ที่สภาวะต่างๆ ในการเตรียมอิมัลชันของรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล ในวัฏภาคน้ำมัน ดังแสดงในตารางที่ หยคอนุภาคของรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล ที่ได้ นำไปคาร์บอนที่อุณหภูมิสูงดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จะได้อนุภาคคาร์บอนไมโครสเฟียร์ (Carbon Microsphere)



รูปที่ 4.10 การกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วยไบกวน (C) โซโมจิไนซ์เซอร์ (H1, H2, H3, H4) และคลื่นเหนือเสียง (B60, B100)

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยแบบต่างๆและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีต่างๆ

ตัวอย่าง	Median diameter [ $\mu\text{m}$ ]	Mean diameter [ $\mu\text{m}$ ]	Mode diameter [ $\mu\text{m}$ ]	Standard deviation [ $\mu\text{m}$ ]
C	80.5	80.6	76.3	38.1
H1	5.3	5.1	5.7	1.9
H2	2.3	2.6	3.1	2.0
H3	1.2	1.5	1.1	1.3
H4	1.0	1.1	0.9	0.9
U100	0.8	0.9	1.1	0.7
U60	0.6	0.7	0.5	0.6

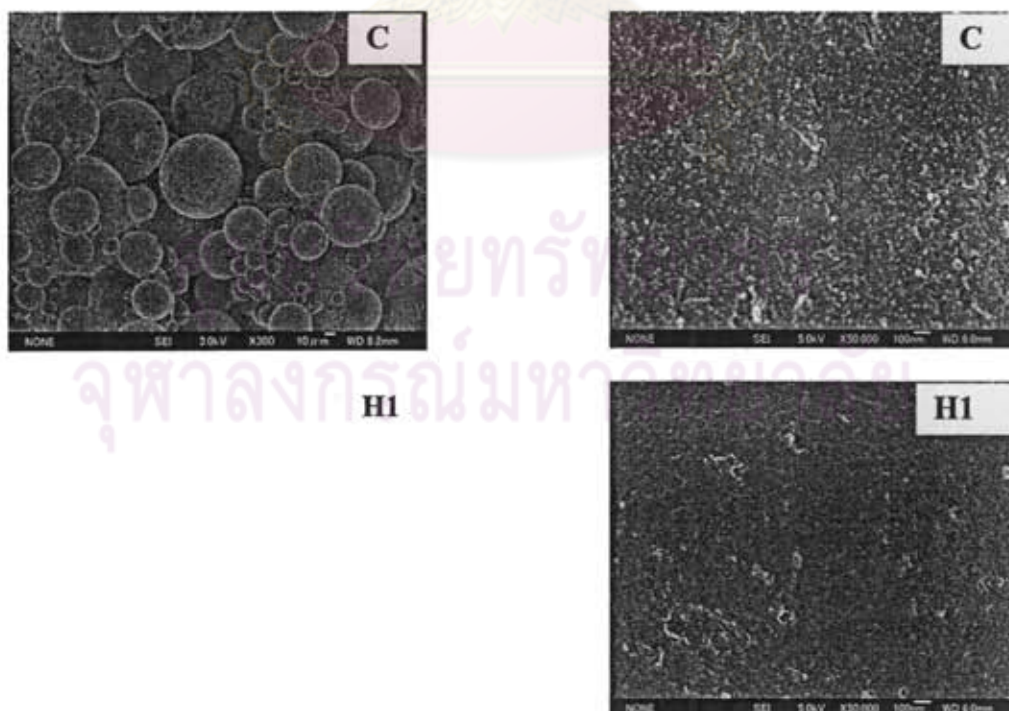


จากตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.10 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคคาร์บอนไมโครสเฟียร์และค่าการกระจายขนาดอนุภาค ซึ่งวัดได้จาก Laser Scattering และรูปที่ 4.11 แสดงภาพถ่าย SEM ของอนุภาคดังกล่าว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในกรณีที่ใช้โบกวน ขนาดของอนุภาคคาร์บอนไมโครสเฟียร์มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีการกระจายขนาดของอนุภาคแคบ

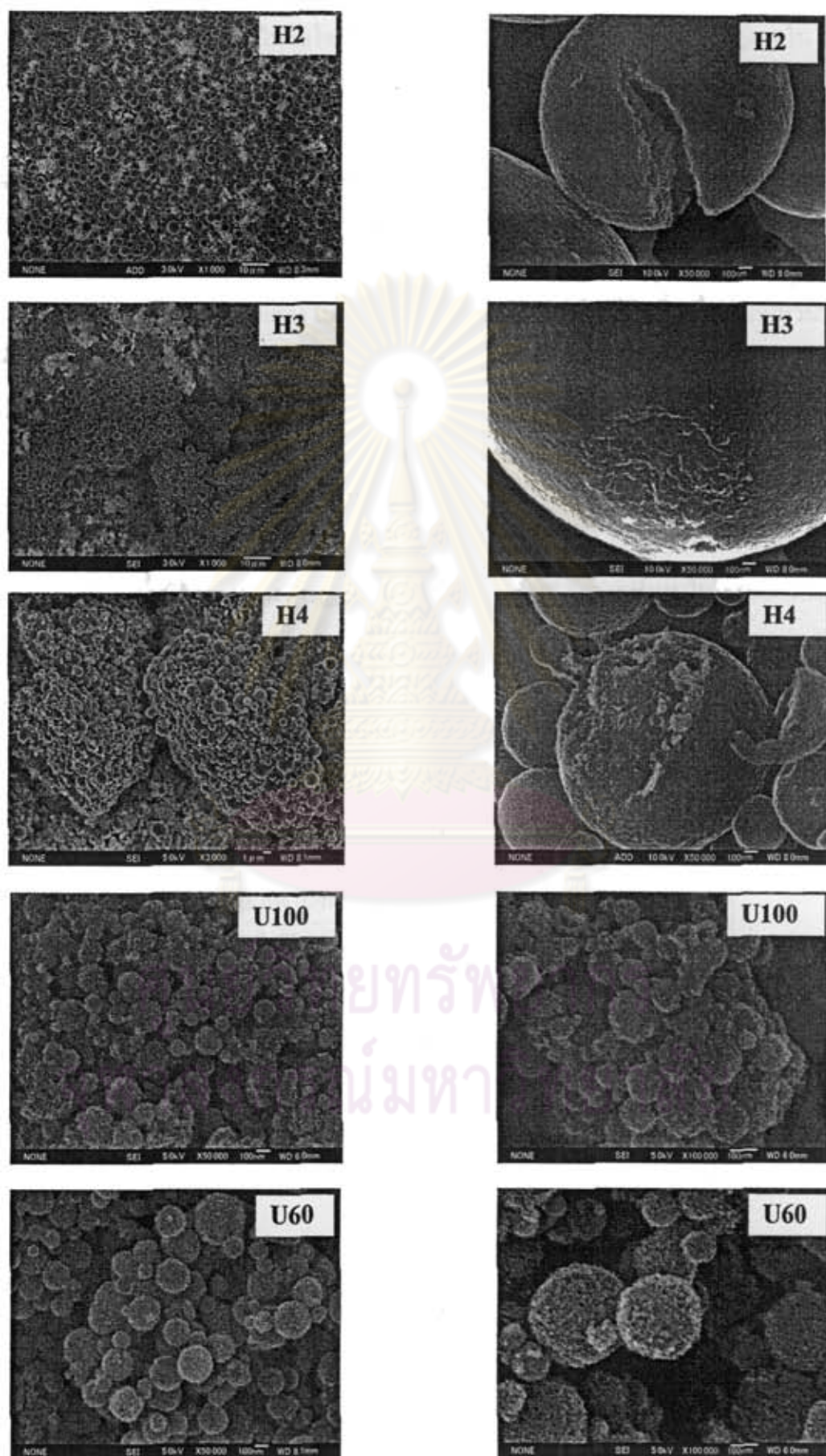
สำหรับกรณีที่ใช้โซโมจิไนซ์เซอร์ ขนาดของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนรอบที่ใช้ โดยขนาดของอนุภาคจะลดลงเมื่อจำนวนรอบที่ใช้มีค่าเพิ่มขึ้น

นอกจากนั้นอนุภาคคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่มีขนาดเล็กกว่า 1 ไมโครเมตร หรือที่เรียกว่า Submicron Carbon Sphere สามารถเตรียมได้ด้วย โซโมจิไนเซอร์ ภายใต้รอบสูงๆ (20,500 rpm)

ในกรณีที่ใช้คลื่นเหนือเสียงในการเตรียม พบว่าสามารถใช้คลื่นเหนือเสียงเตรียมคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเล็กกว่า 1 ไมโครเมตรได้ จากการวัดขนาดอนุภาคด้วย Laser Scattering เมื่อเพิ่มความเข้มของคลื่นเหนือเสียง จะได้ขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากภาพถ่าย SEM ดังรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่าขนาดอนุภาคจะมีขนาดเล็กเมื่อเพิ่มความเข้มของคลื่นเหนือเสียง ซึ่งผลดังกล่าวขัดแย้งกับผลที่ได้จากเครื่อง Laser Scattering สาเหตุดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากอนุภาคขนาดเล็กเกาะกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ (Agglomeration) ทำให้ผลที่ได้จาก Laser Scattering แสดงขนาดที่ใหญ่กว่าที่ควรจะเป็น



รูปที่ 4.11 รูปถ่าย SEM ของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วย โบกวน (C) โซโมจิไนซ์เซอร์ (H1, H2, H3, H4) และคลื่นเหนือเสียง (B60, B100)



รูปที่ 4.11 รูปถ่าย SEM ของคาร์บอนไมโครไฟเบอร์ที่เตรียมด้วย โบกวน (C) โซโมจินซ์เซอร์ (H1, H2, H3, H4) และคลื่นเหนือเสียง (B60, B100)



พิจารณาผลการตรวจวัดการดูดซับ-คายซับไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน รูปที่ 4.12 แสดงให้เห็นว่าทุกตัวอย่างการทดลองให้ไอโซเทอมเป็น Type IV ซึ่งบ่งบอกว่ามีมีโซพอร์อยู่ภายในโครงสร้างของอนุภาคคาร์บอนที่เตรียมได้

ผลจากไอโซเทอมคำนวณหาปริมาณมีโซพอร์ พื้นที่ผิวบีเอที ได้ดังตารางที่ 4.4 และหาการกระจายขนาดรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ได้ดังรูปที่

ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ปริมาณมีโซพอร์ ของอนุภาคคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วยโซโม่จิไนซ์เซอร์และคลื่นเหนือเสียงมีค่ามากกว่าการเตรียมด้วยการใช้ไบกวน

ในกรณีที่ใช้โซโม่จิไนซ์เซอร์ในการเตรียม ปริมาณมีโซพอร์จะมีค่าเพิ่มเมื่อเพิ่มจำนวนรอบที่ใช้ อย่างไรก็ตามในกรณีที่ใช้คลื่นเหนือเสียง ความเข้มของคลื่นเหนือเสียงไม่ส่งผลต่อปริมาณมีโซพอร์

สำหรับค่าพื้นที่ผิวจำเพาะบีเอที มีค่าความแตกต่างกันมากนัยทั้งคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่ได้จากการใช้ไบกวน โซโม่จิไนซ์เซอร์ และ คลื่นเหนือเสียง

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าพื้นที่ผิวจำเพาะบีเอที ( $S_{BET}$ ) และปริมาณมีโซพอร์ ( $V_{mes}$ ) ของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วยวิธีต่างๆ

สถานะ	เครื่องมือที่ใช้ทำมัลชัน	$S_{BET}$ (m <sup>2</sup> /g)	$V_{mes}$ (cm <sup>3</sup> /g)
C	ใบพัดปั่นกวน (800 rpm)	610	0.57
H1	โซโม่จิไนซ์เซอร์ (8000 rpm)	590	0.67
H2	โซโม่จิไนซ์เซอร์ (9500 rpm)	640	0.76
H3	โซโม่จิไนซ์เซอร์ (13500 rpm)	640	0.76
H4	โซโม่จิไนซ์เซอร์ (20500 rpm)	650	0.82
U100	คลื่นเหนือเสียง (60 W/cm <sup>2</sup> )	510	0.86
U60	คลื่นเหนือเสียง (32 W/cm <sup>2</sup> )	610	0.86

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



พิจารณาผลการตรวจวัดการดูดซับ-คายซับไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน รูปที่ 4.12 แสดงให้เห็นว่าทุกตัวอย่างการทดลองให้ไอโซเทอมเป็น Type IV ซึ่งบ่งบอกว่ามีมีโซพอร์อยู่ภายในโครงสร้างของอนุภาคคาร์บอนที่เตรียมได้

ผลจากไอโซเทอมคำนวณหาปริมาณมีโซพอร์ พื้นที่ผิวบีเอที ได้ดังตารางที่ 4.4 และหาการกระจายขนาดรูพรุนในช่วงมีโซพอร์ได้ดังรูปที่

ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ปริมาณมีโซพอร์ ของอนุภาคคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วยโซโม่จินซ์เซอร์และคลื่นเหนือเสียงมีค่ามากกว่าการเตรียมด้วยการใช้ไบกวน

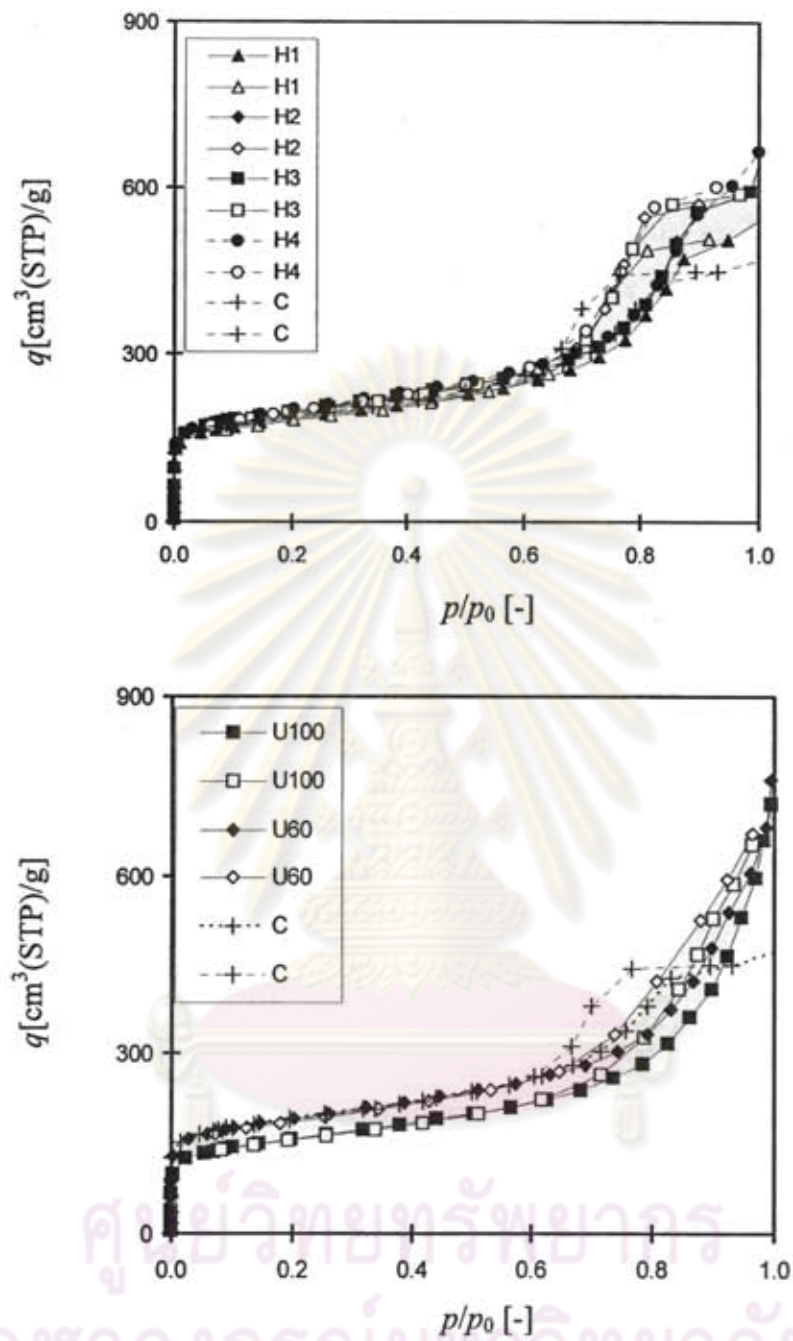
ในกรณีที่ใช้โซโม่จินซ์เซอร์ในการเตรียม ปริมาณมีโซพอร์จะมีค่าเพิ่มเมื่อเพิ่มจำนวนรอบที่ใช้ อย่างไรก็ดีในกรณีที่ใช้คลื่นเหนือเสียง ความเข้มของคลื่นเหนือเสียงไม่ส่งผลต่อปริมาณมีโซพอร์

สำหรับค่าพื้นที่ผิวจำเพาะบีเอที มีค่าความแตกต่างกันมากนัยทั้งคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่ได้จากการใช้ไบกวน โซโม่จินซ์เซอร์ และ คลื่นเหนือเสียง

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าพื้นที่ผิวจำเพาะบีเอที ( $S_{BET}$ ) และปริมาณมีโซพอร์ ( $V_{mes}$ ) ของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วยวิธีต่างๆ

สถานะ	เครื่องมือที่ใช้ทำมัลชัน	$S_{BET}$ (m <sup>2</sup> /g)	$V_{mes}$ (cm <sup>3</sup> /g)
C	ใบพัดปั่นกวน (800 rpm)	610	0.57
H1	โซโม่จินซ์เซอร์ (8000 rpm)	590	0.67
H2	โซโม่จินซ์เซอร์ (9500 rpm)	640	0.76
H3	โซโม่จินซ์เซอร์ (13500 rpm)	640	0.76
H4	โซโม่จินซ์เซอร์ (20500 rpm)	650	0.82
U100	คลื่นเหนือเสียง (60 W/cm <sup>2</sup> )	510	0.86
U60	คลื่นเหนือเสียง (32 W/cm <sup>2</sup> )	610	0.86

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ของคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วย ไบโกลิน (C) โซโมจินซ์เซอร์ (H1, H2, H3, H4) และคลื่นเหนือเสียง (B60, B100)

### 4.3 ผลการศึกษาและการอภิปรายผลเรื่องการทำ RF Gel/Carbon gel ไปใช้งานด้าน Biochemical Engineering

ในหัวข้อนี้จะกล่าวถึงผลและวิเคราะห์ผลการทดลองอันประกอบไปด้วย 2 หัวข้อหลักคือ ผลการเตรียมอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล ผลการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปส โดยในส่วนของผลการเตรียมอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลนั้น จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำมาใช้ประกอบในการวิเคราะห์ผลความสามารถในการตรึง การเร่งปฏิกิริยา รวมไปถึงเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงในลำดับต่อไป

#### 4.3.1 ผลการเตรียมอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล

ดังที่กล่าวไว้ในส่วนของวิธีการทดลองว่า อาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมนั้นจะเตรียมมาจากกรรมวิธีที่แตกต่างกัน 2 วิธีคือ อาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอิกอนิก คือ Trimethylstearylammmonium Chloride ในขั้นการทำให้อนุภาคเกิดการกระจายตัว โดยอาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมโดยวิธีนี้จะใช้สัญลักษณ์แทนว่า RF-CS คาร์บอนเจล สำหรับอาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมอีกวิธีที่แตกต่างกันคือ จะไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวเข้าร่วมในกระบวนการเตรียม โดยอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลที่เตรียมโดยวิธีนี้จะใช้สัญลักษณ์แทนว่า RF-NS เจลและคาร์บอนเจล โดย RF-NS เจลจะมีความแตกต่างจาก RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอน ตรงที่วิธีการทำให้แห้งซึ่งจะใช้วิธีการทำให้แห้งแบบเย็นเยือก (freeze drying) ขณะที่กรณีอื่นๆจะใช้วิธีการทำให้แห้งโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave drying) ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล สำหรับปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่ออาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลทั้งสองชนิดนี้จะถูกควบคุมให้มีค่าเท่ากัน อาทิอุณหภูมิในการเกิดเจล (gelation temperature) อุณหภูมิและเวลาในการบ่ม (aging temperature and aging time) และเงื่อนไขในการเผา (pyrolysis) เป็นต้น

อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลทั้งสองชนิดจะถูกตรวจสอบสมบัติความเป็นรูพรุน ได้แก่ ปริมาตรรูพรุนในช่วงเมโซพอร์ การกระจายขนาดรัศมีรูพรุนในช่วงเมโซพอร์ และค่าพื้นที่ผิว BET จากผลของ ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ในโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน และตรวจสอบรูปสัณฐานโดยการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope ,SEM) ผลการตรวจสอบลักษณะต่างๆแสดงและอธิบายได้ดังนี้

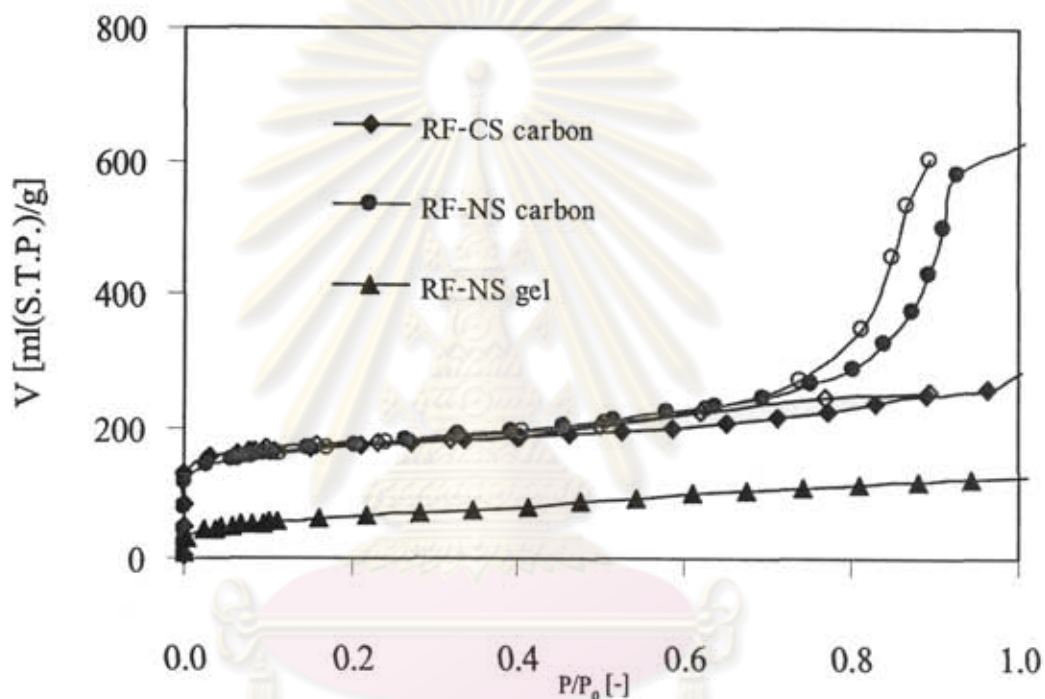
##### 4.3.1.1 ผลการตรวจสอบสมบัติความเป็นรูพรุนของ อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล

การตรวจสอบสมบัติความเป็นรูพรุนนั้นจะทำการตรวจสอบเฉพาะอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลที่ถูกนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์เท่านั้น โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้ทั้ง RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอนในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ แต่สำหรับการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล จะใช้เฉพาะ RF-NS เจลในการตรึง เพราะเป็นการเตรียมเจลที่ง่าย และไม่



มีสารลดแรงตึงผิว ซึ่งอาจมีผลในการทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ อีกทั้งการเตรียม RF-CS เจลยังต้องใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในขั้นของการกระจาย ซึ่งจะทำให้สารละลายเอนไซม์ที่เติมลงไปมีความเจือจางเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะเลือกใช้ในการทดลองการตรึงเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธีห่อหุ้ม

#### 4.3.1.1.1 ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน (Nitrogen Adsorption-Desorption Isotherm)



รูปที่ 4.13 แสดงไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF-CS carbon RF-NS carbon และ RF-NS gel โดยที่เครื่องหมายทึบคือการดูดซับและเครื่องหมายโปร่งคือการคายซับ

ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ของไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอนแสดงดังรูปที่ 4.13 เมื่อพิจารณาลักษณะของไอโซเทอมจะเห็นความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะในช่วงที่ค่าความดันสัมพัทธ์ ( $P/P_0$ ) มีค่าสูงกว่า 0.6 ปริมาณการดูดซับไนโตรเจนของ RF-NS คาร์บอนจะมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ปริมาณการดูดซับไนโตรเจนของ RF-CS คาร์บอนมีค่าค่อนข้างคงที่ รูปร่างลักษณะไอโซเทอมของอาร์เอฟคาร์บอนทั้งสองนี้เมื่อจำแนกตาม IUPAC จะจำแนกไอโซเทอมอยู่ใน Type IV กล่าวคือ โครงสร้างของ RF-NS คาร์บอนและ RF-CS คาร์บอน นั้นมีรูพรุนระดับมีโซพอร์

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะไอโซเทอมของ RF-CS คาร์บอน กับลักษณะไอโซเทอมของ คาร์บอนไครโอเจล ที่ทำการเตรียมด้วยการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอิออนิก (C18) และใช้น้ำ เป็นตัวทำละลายเช่นเดียวกัน ของ Tonanon และคณะ [11] จะพบว่ามิลักษณะที่ใกล้เคียงกัน

สำหรับกรณีของ RF-NS เจลนั้นพบว่าลักษณะไอโซเทอมที่ได้มีลักษณะเดียวกันกับ RF-CS คาร์บอน แต่จะมีปริมาตรการดูดซับไนโตรเจนน้อยกว่าในทุกๆค่าความดันสัมพัทธ์ จึงอาจบอกได้ว่า RF-NS เจลมีปริมาตรรูพรุนที่น้อยกว่าทั้ง RF-CS คาร์บอนและ RF-NS คาร์บอน และรูพรุนของ RF-NS เจลนั้นจะอยู่ในช่วงไมโครพอร์

#### 4.3.1.1.2 ปริมาตรรูพรุนระดับเมโซพอร์ (Mesopore volume)

การคำนวณหาปริมาตรรูพรุนในช่วงเมโซพอร์ สามารถคำนวณได้ด้วยระเบียบวิธี Dollimore และ Heal จากค่าไอโซเทอมการคายซับของไนโตรเจน เมื่อพิจารณาปริมาตรรูพรุนระดับเมโซพอร์ ( $V_{meso}$ ) ของ RF-CS คาร์บอน RF-NS คาร์บอน และ RF-NS เจล แสดงดังตารางที่ 4.5 จะเห็นว่า RF-NS คาร์บอนมีปริมาตรรูพรุนระดับเมโซพอร์สูงกว่าอาร์เอฟตัวอื่นๆอย่างชัดเจน โดยมีค่า  $V_{meso}$  เป็น  $0.81 \text{ cm}^3/\text{g}$  ขณะที่ RF-CS คาร์บอน และ RF-NS เจลมีค่าเป็น  $0.21 \text{ cm}^3/\text{g}$  และ  $0.15 \text{ cm}^3/\text{g}$  ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF-CS carbon RF-NS carbon และ RF-NS gel

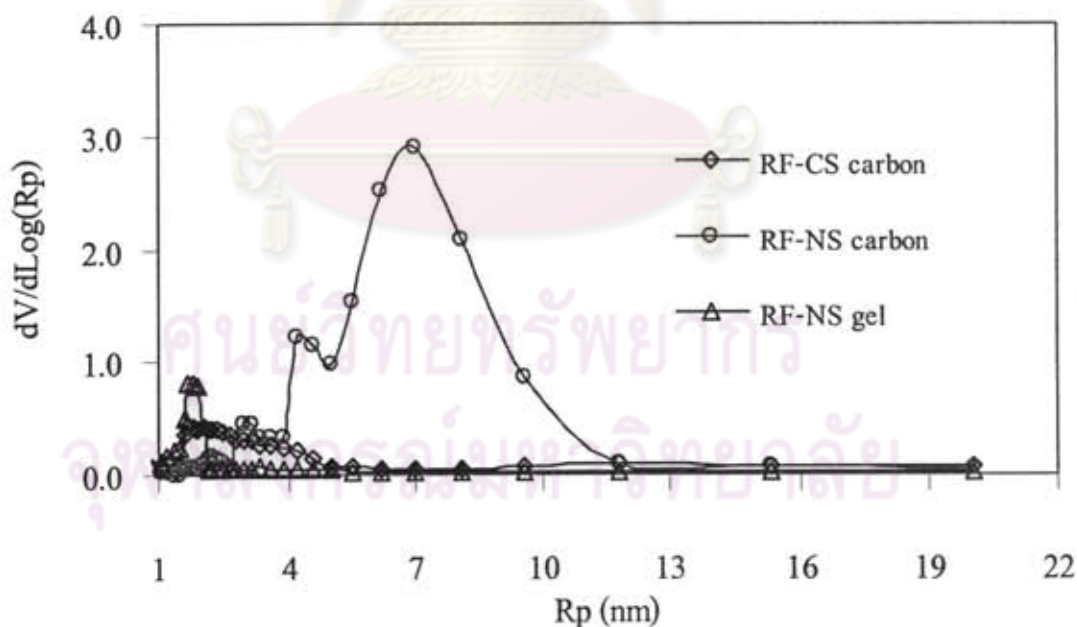
Sample	Mesopore volume ( $V_{mes}, \text{cm}^3/\text{g}$ )	Surface area ( $S_{BET}, \text{m}^2/\text{g}$ )	Rp (nm)
RF-CS carbon	0.21	518	2.0
RF-NS carbon	0.81	550	7.2
RF-NS gel	0.15	214	1.7

#### 4.3.1.1.3 การกระจายขนาดรูพรุนในช่วงเมโซพอร์ (Mesopore Size Distribution)

ผลการวิเคราะห์การกระจายขนาดรูพรุนในช่วงเมโซพอร์แสดงดังรูปที่ 5.2 จะเห็นว่า RF-NS คาร์บอน มีการกระจายขนาดรูพรุนในช่วงเมโซพอร์เป็นช่วงกว้าง โดยมีค่ารัศมีรูพรุนส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 4 ถึง 10 nm ในขณะที่ RF-CS คาร์บอน มีการกระจายขนาดรูพรุนในช่วงเมโซพอร์เป็นช่วงแคบกว่า และค่าสูงสุดของการกระจายขนาดรูพรุน (Rp) มีค่าน้อยมากโดยน้อยกว่า RF-NS คาร์บอน ประมาณ 4 เท่า ซึ่งผลของการกระจายขนาดรูพรุนนี้แสดงให้เห็นว่า RF-NS คาร์บอนมีรูพรุนระดับเมโซพอร์เป็นส่วนใหญ่ และขนาดของรูพรุนส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่มากกว่าขนาดรูพรุนของ RF-CS คาร์บอน และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบ RF-CS คาร์บอนกับ คาร์บอน

ไครโอเจลที่เตรียมโดย Tonanon และคณะ [N. Tonanon et.al., 2003] จะพบว่าค่า  $R_p$  ของ RF-CS คาร์บอน จะมีค่าน้อยกว่าค่า  $R_p$  ของคาร์บอนไครโอเจลที่มีค่าเป็น 6 nm ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากวิธีการทำให้ RF-CS เจลให้แห้งที่มีความแตกต่างกัน กล่าวคือคาร์บอนไครโอเจลนั้นผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเย็นเยือก ในขณะที่ RF-CS คาร์บอนผ่านกระบวนการทำให้แห้งโดยคลื่นไมโครเวฟ โอกาสการยุบตัว (shrinkage) ของโครงสร้างรูพรุนของ RF-CS เจลมีมากกว่าไครโอเจล ดังนั้นภายหลังจากเผาที่อุณหภูมิสูง (pyrolysis) RF-CS คาร์บอนที่เตรียมได้จึงมีขนาดรูพรุนระดับเมโซพอร์ที่ต่ำกว่าคาร์บอนไครโอเจล นอกจากวิธีการทำให้แห้งที่จะส่งผลต่อ RF คาร์บอนที่เตรียมได้แล้ว อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่ม ยังเป็นปัจจัยที่อาจส่งผลให้โครงสร้างรูพรุนที่เตรียมได้ มีความแตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาการกระจายขนาดรัศมีรูพรุนของ RF-NS เจล ดังรูปที่ 4.14 จะพบว่า การกระจายขนาดรัศมีรูพรุนจะอยู่ในช่วงที่แคบ และมีค่า  $R_p$  ต่ำอยู่ที่ 1.7 nm ทั้งนี้การที่ปริมาตรการดูดซับในโตรเจนของ RF-NS เจลมีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับอาร์เอฟตัวอื่นๆ เนื่องจาก RF-NS เจล ยังไม่ผ่านกระบวนการเผาเพื่อกำจัดสารอินทรีย์ และตัวทำละลายต่างๆออกจากโครงสร้าง ลักษณะความพรุนของ RF-NS เจลจึงมีน้อยกว่า RF-NS คาร์บอน



รูปที่ 4.14 แสดงการกระจายขนาดรัศมีรูพรุนในช่วงเมโซพอร์ ของ RF-CS carbon RF-NS carbon และ RF-NS gel

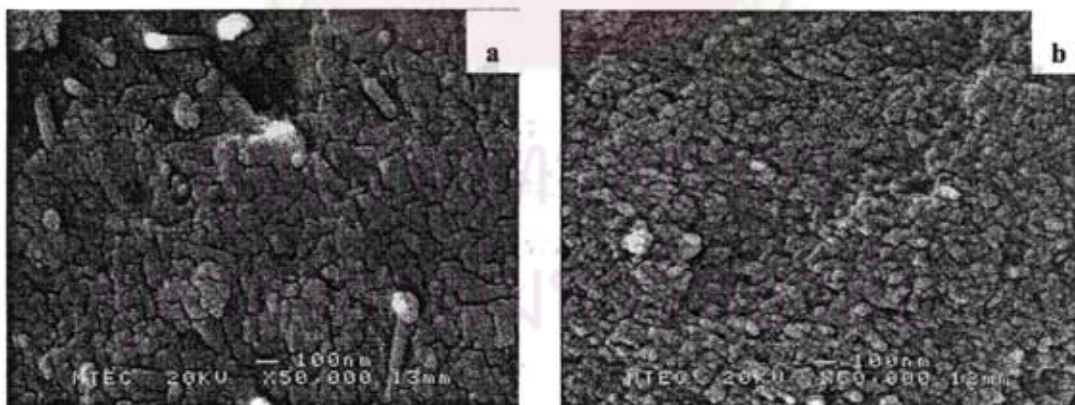


#### 4.3.1.1.4 พื้นที่ผิว BET (BET Surface Area)

ขนาดพื้นที่ผิว BET ของ RF-CS คาร์บอน RF-NS คาร์บอน และ RF-NS เจล แสดงดังตารางที่ 4.5 โดยพบว่าพื้นที่ผิว BET ของ RF-NS คาร์บอนมีค่าสูงกว่า RF-CS คาร์บอนเล็กน้อย โดยมีค่าเป็น  $550 \text{ m}^2/\text{g}$  และ  $518 \text{ m}^2/\text{g}$  ตามลำดับ ในขณะที่ RF-NS เจล มีค่าต่ำกว่า RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอน โดยมีค่าเป็น  $214 \text{ m}^2/\text{g}$  ทั้งนี้เป็นเพราะกระบวนการเผาจะทำให้ลักษณะพื้นที่ผิวเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งโดยทั่วไปจะทำให้มีพื้นที่ผิวสูงขึ้น

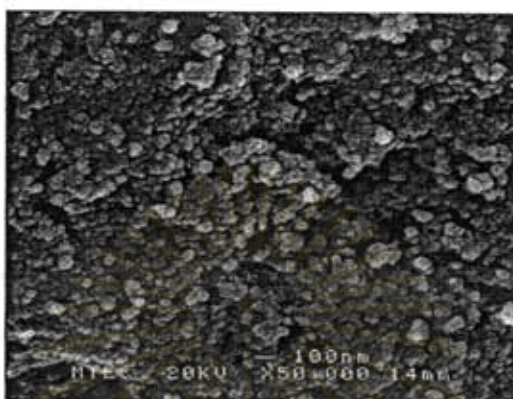
#### 4.3.1.2 ผลการตรวจสอบรูปร่างของ อาร์เอฟเจด และคาร์บอนเจด

ลักษณะพื้นผิวของ RF-CS คาร์บอน RF-NS คาร์บอน และ RF-NS เจล สามารถตรวจสอบได้จากภาพถ่าย SEM ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า จากรูปที่ 4.15 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวของ RF-CS คาร์บอน (รูป a) กับ RF-NS คาร์บอน (รูป b) พบว่าทั้ง RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอนมีลักษณะพื้นผิวที่เป็นรูพรุนอยู่ทั่ว และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวของ RF-CS คาร์บอน กับ คาร์บอนไครโอเจลจากงานวิจัยของ Tonanon และคณะ [N. Tonanon et.al., 2003] จะพบว่ามีความแตกต่างกัน โดยคาร์บอนไครโอเจลจะพบโพรงที่มีขนาดใหญ่ในระดับไมครอนในขณะที่ RF-CS คาร์บอนไม่สามารถตรวจพบ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในกระบวนการเผาเพื่อให้ได้ RF-CS คาร์บอนเกิดการยุบตัวของโครงสร้างรูพรุนมากกว่าจึงทำให้ช่องว่างขนาดใหญ่ที่อาจเกิดขึ้นยุบตัวลง สาเหตุของการยุบตัวนั้นเนื่องมาจากกระบวนการทำให้แห้งที่ใช้คลื่นไมโครเวฟดังอธิบายไว้ในตอนต้น



รูปที่ 4.15 แสดงภาพถ่าย SEM ของ RF carbon a) RF-CS carbon และ b) RF-NS carbon ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า

ลักษณะพื้นผิวของ RF-NS เจลแสดงดังรูปที่ 4.16 ซึ่งจะพบว่าพื้นผิวมีความพรุนอยู่บ้าง โดยมีพื้นผิวบางส่วนที่มีการอัดแน่นของอนุภาคคาร์บอน ซึ่งอาจส่งผลต่อปริมาณรูพรุน ขนาดรูพรุนและพื้นที่ผิวของ RF-NS เจล



รูปที่ 4.16 แสดงภาพถ่าย SEM ของ RF-NS gel ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า

คุณสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF-CS คาร์บอน RF-NS คาร์บอน และ RF-NS เจล สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.4 เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอน ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ มีความเป็นไปได้ว่า RF-NS คาร์บอนจะสามารถตรึงเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่า RF-CS คาร์บอนเนื่องจาก RF-NS คาร์บอนมีขนาดรูพรุนระดับเมโซพอร์ ปริมาตรรูพรุนระดับเมโซพอร์ และพื้นที่ผิว BET สูงกว่า อย่างไรก็ตามก็ขึ้นอยู่กับลักษณะการยึดตัวของโครงรูปเอนไซม์แต่ละชนิดด้วย ว่ามีความเหมาะสมกับพื้นผิวนั้นๆหรือไม่ เช่นเดียวกับกรณีของ RF-NS เจลที่ถึงแม้จะมีขนาดรูพรุนระดับเมโซพอร์ ปริมาตร รูพรุนระดับเมโซพอร์ และพื้นที่ผิว BET ต่ำกว่าอาร์เอฟคาร์บอน แต่ด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์ที่แตกต่างกันก็อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์แตกต่างกันได้ โดยผลการตรึงเอนไซม์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูป จะแสดงในลำดับต่อไป

#### 4.3.2 ผลการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปส

ในส่วนของการตรึงเอนไซม์นั้น จะแบ่งผลการทดลองออกเป็นสองส่วนใหญ่ๆ คือการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption) และการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล (Gel entrapment) โดยเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จากการตรึงทั้งสองวิธีนี้ จะผ่านการทดสอบความสามารถในการตรึงเอนไซม์ ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา รวมถึงเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูป โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้



#### 4.3.2.1 ผลการตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ

##### 4.3.2.1.1 ผลการทดสอบปริมาณโปรตีนที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอนเจล

ผลปริมาณโปรตีน จากการนำเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสมาตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอนเจล ทั้งชนิดที่เตรียมมาจากการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอไอออนิก (RF-CS) และอาร์เอฟคาร์บอนเจล ชนิดที่เตรียมโดยไม่ใช้สารลดแรงตึงผิว (RF-NS) โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส 10% โดยปริมาตรของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น แสดงดังรูปที่ 4.17 โดยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ใช้วิธีของลอร์รี่ (Lowry Assay) จากรูปจะเห็นได้ว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสสามารถตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอนทั้งสองชนิดได้แตกต่างกันคือ RF-NS คาร์บอนมีปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงมากกว่า RF-CS คาร์บอน โดยที่ชั่วโมงที่ 10 ของการตรึงเอนไซม์ มีปริมาณโปรตีนที่เกาะอยู่บน RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอน เป็น 431.42  $\mu\text{g protien/ g support}$  และ 73.59  $\mu\text{g protien/ g support}$  ตามลำดับ (น้ำหนักอาร์เอฟคาร์บอนที่ใช้ในการตรึงเป็น 3 g) ซึ่งคิดเป็น 76.25% และ 13.01% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้นตามลำดับ โดยระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์ที่เหมาะสมเป็น 5 ชั่วโมง จากผลการตรึงนี้พบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน มีเปอร์เซ็นต์การตรึงสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Abdel-Naby และคณะ [A Mohamed. et.al., 1998] ที่ศึกษาการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสบนไลโคซาน ที่สามารถตรึงได้ 18.8% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น

สำหรับเอนไซม์ไลเปส ผลปริมาณโปรตีนจากการนำเอนไซม์ไลเปส 0.5 g มาตรึงบน RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอน แสดงดังรูปที่ 4.18

จากรูปพบว่า เมื่อที่เวลาผ่านไปปริมาณโปรตีนที่ตรึงติดทั้งบน RF-NS คาร์บอนและ RF-CS คาร์บอน มีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเวลาการตรึงมากกว่า 5 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอนลดน้อยลง ดังนั้นเวลาที่ดีที่สุดในการตรึงเอนไซม์ ไลเปสบน RF-NS คาร์บอนคือประมาณ 5 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสบน RF-NS คาร์บอนและ RF-CS คาร์บอน พบว่าปริมาณโปรตีนที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอนมีมากกว่า ที่ตรึงติดบน RF-CS คาร์บอน โดยที่ ชั่วโมงที่ 5 ปริมาณโปรตีนที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอนเป็น 13.12 mg protein คิดเป็น 56.21% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น ในขณะที่บน RF-CS คาร์บอนเป็น 7.11 mg protein คิดเป็น 30.46% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น จากผลของปริมาณโปรตีนนี้แสดงให้เห็นว่า RF-NS คาร์บอน สามารถตรึงเอนไซม์ไลเปสได้ดีกว่า RF-CS คาร์บอน

จากผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสบน RF-NS คาร์บอนนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Oliveira และคณะ [Pedro C. et.al., 2000] ที่ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* บน STYDVB copolymer ที่ตรึงเอนไซม์ได้ 91.6% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น พบว่ายังสามารถตรึงเอนไซม์ได้น้อยกว่า แต่สามารถตรึงได้มากกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Murray และคณะ [K. Yokoseki et.al.,

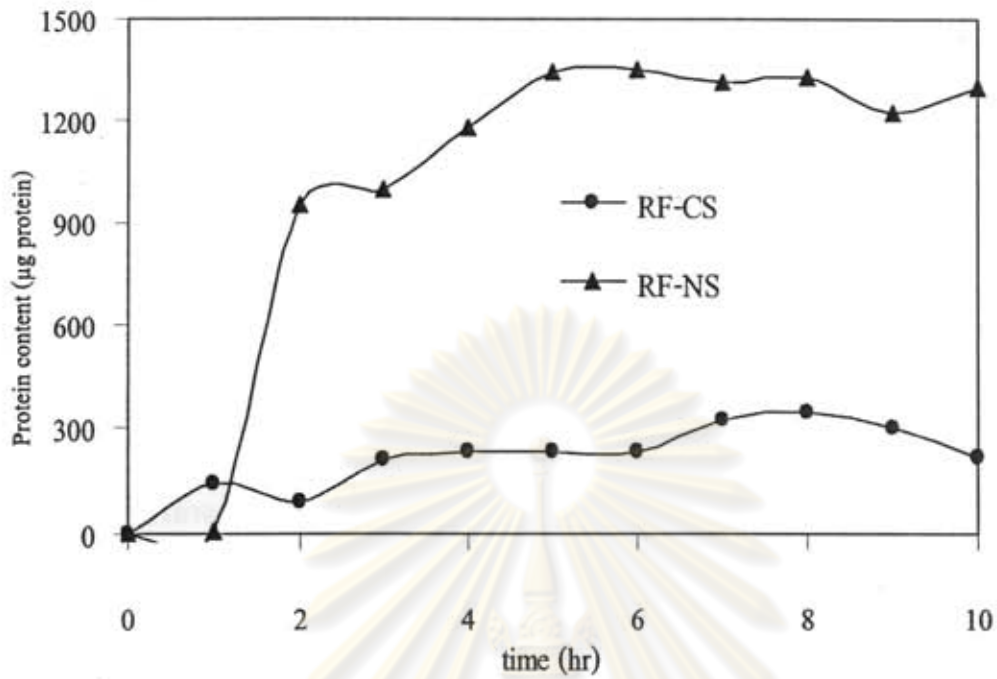


1982] ที่ตรึงเอนไซม์ชนิดเดียวกันนี้บน Polystyrene latex particle ที่ 0.6% w/v สามารถตรึงเอนไซม์ได้ 43% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น

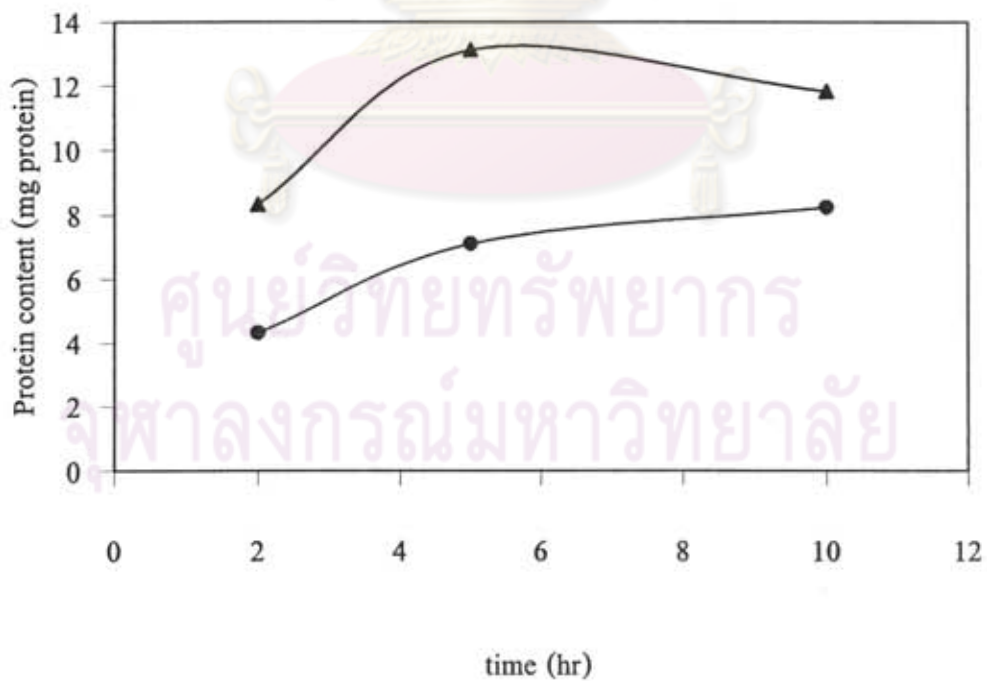
การที่ทั้งเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปส สามารถตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอนทั้งสองชนิดได้แตกต่างกันเป็นเพราะคุณสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF-NS คาร์บอนและ RF-CS คาร์บอนที่ต่างกัน จากผลการทดสอบคุณสมบัติความเป็นรูพรุนของอาร์เอฟคาร์บอนทั้งสองชนิด ดังแสดงในหัวข้อ 4.3.1.1 จะเห็นได้ว่า RF-NS คาร์บอนมีปริมาตรรูพรุนในระดับเมโซและพื้นที่ผิวสูงกว่า RF-CS คาร์บอน อีกทั้งเมื่อพิจารณาลักษณะการกระจายตัวของรูพรุนเปรียบเทียบกันยังพบว่า RF-NS คาร์บอน จะมีขนาดรูพรุนส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 5-8 nm ในขณะที่ RF-CS คาร์บอน มีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 2-3 nm เท่านั้น เมื่อพิจารณาจากขนาดของเอนไซม์ซึ่งพบว่า เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 nm ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสมีขนาดเป็น  $6.82 \times 6.86 \times 5.21$  nm จึงส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนของ RF-CS คาร์บอนได้เต็มที่ จากข้อมูลดังกล่าวจึงอาจบอกได้ว่าเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน น่าจะตรึงได้ทั้งในรูพรุนของคาร์บอน และที่พื้นผิวด้านนอกของคาร์บอน ในขณะที่เอนไซม์ที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน น่าจะตรึงที่พื้นผิวด้านนอกของคาร์บอน ไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนที่มีขนาดเล็กได้

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ บน RF-NS คาร์บอนเหมือนกัน พบว่า RF-NS คาร์บอนสามารถตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปส อาจเนื่องมาจากสภาพของเอนไซม์ที่ต่างกัน เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสมีลักษณะเป็นสารละลาย ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสอยู่ในรูปสารแขวนลอยในเฮปแทน การถ่ายเทมวลของเอนไซม์เข้าไปตรึงบน RF-NS คาร์บอนนั้น ต้องมีการถ่ายเทมวลข้ามเฟส จึงมีข้อจำกัดมากกว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.17 แสดงปริมาณโปรตีน(แอลคาไลน์โปรตีน) ที่ถูกตรึงบน RF-CS และ RF-NS carbon 3 กรัม ที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 4.18 แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส) ที่ถูกตรึงบน RF-NS carbon และ RF-CS carbon 2 กรัมที่เวลาต่างๆ

การวิจัยได้ทำการทดสอบปริมาณเอนไซม์ที่หลุดภายหลังจากทำการครั้งที่ชั่วโมงที่ 10 โดยการนำเอนไซม์ครึ่งไปล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้งสำหรับเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสเฟส และล้างด้วยเฮปแทน 3 ครั้ง สำหรับเอนไซม์ไลเปส ซึ่งพบการหลุดของเอนไซม์เป็นปริมาณไม่มากนัก โดยเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนจะมีการหลุดของเอนไซม์จากการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มากกว่าการตรึงบน RF-NS คาร์บอนเล็กน้อย โดยผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.6 และ 4.7

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณโปรตีน(แอลคาไลน์ฟอสเฟส)ที่หลุดจาก RF-CS carbon และ RF-NS carbon จากการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง

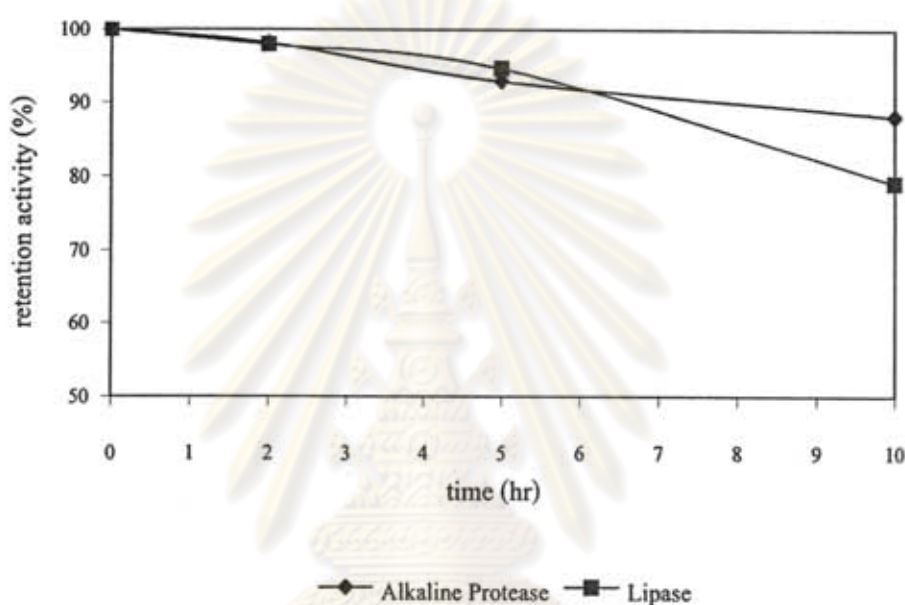
การล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (จำนวนครั้ง)	ปริมาณโปรตีนที่หลุดจาก RF-CS คาร์บอน ( $\mu\text{g protein/g support}$ )	ปริมาณโปรตีนที่หลุดจาก RF-NS คาร์บอน ( $\mu\text{g protein/g support}$ )
1	20.66	13.74
2	9.18	11.51
3	5.77	7.38
รวม	35.61	32.63

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส) ที่หลุดจาก RF-CS carbon และ RF-NS carbon จากการล้างด้วยเฮปแทน 3 ครั้ง

การล้างด้วยเฮปแทน (จำนวนครั้ง)	ปริมาณโปรตีนที่หลุดจาก RF-CS คาร์บอน ( $\text{mg protein/g support}$ )	ปริมาณโปรตีนที่หลุดจาก RF-NS คาร์บอน ( $\text{mg protein/g support}$ )
1	0.59	0.44
2	0.23	0.31
3	0.20	0.18
รวม	1.02	0.93



สิ่งสำคัญประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง ในการตรึงเอนไซม์นั้นคือผลของวิธีการตรึงที่มีต่อ กิจกรรมของเอนไซม์ในระหว่างตรึงเอนไซม์ ซึ่งอาจอยู่ในรูปของแรงเฉือน (shear force) อันเป็น ผลจากการที่เอนไซม์โดนแรงสั่นสะเทือนเป็นเวลานาน หรือผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการตรึง เอนไซม์ งานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบผลกระทบดังกล่าว โดยทำการแช่เอนไซม์ที่ความเร็วรอบ อุณหภูมิ และเวลาเช่นเดียวกันกับการตรึงเอนไซม์ และนำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ทุกๆ ชั่วโมงได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.19

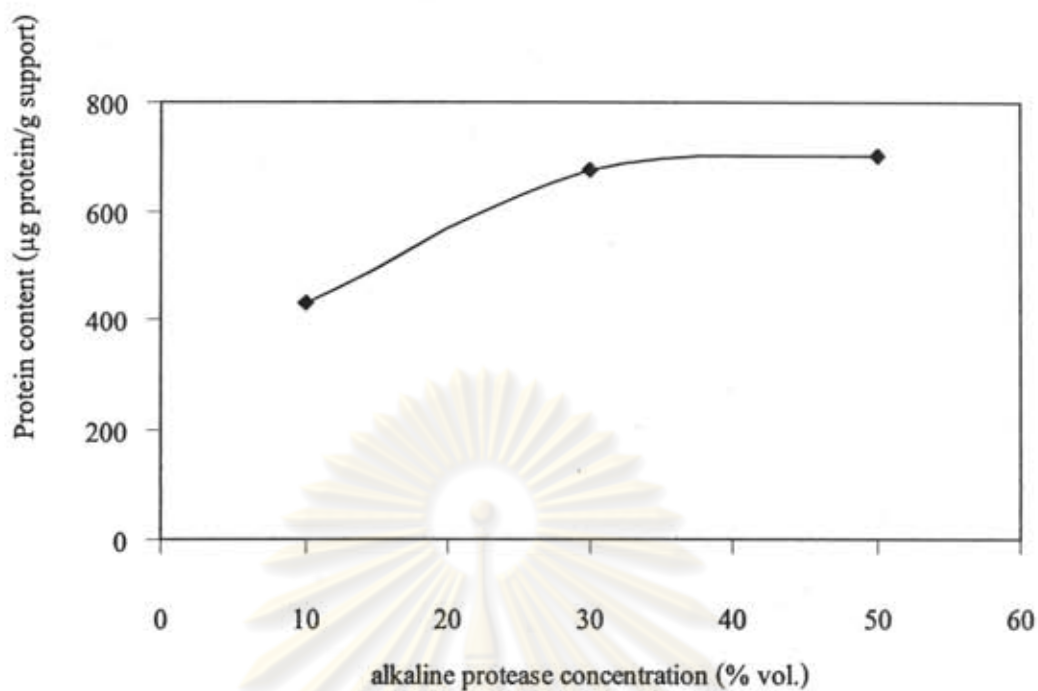


รูปที่ 4.19 แสดงผลของวิธีการตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส อีสระ และเอนไซม์ไลเปสอีสระ

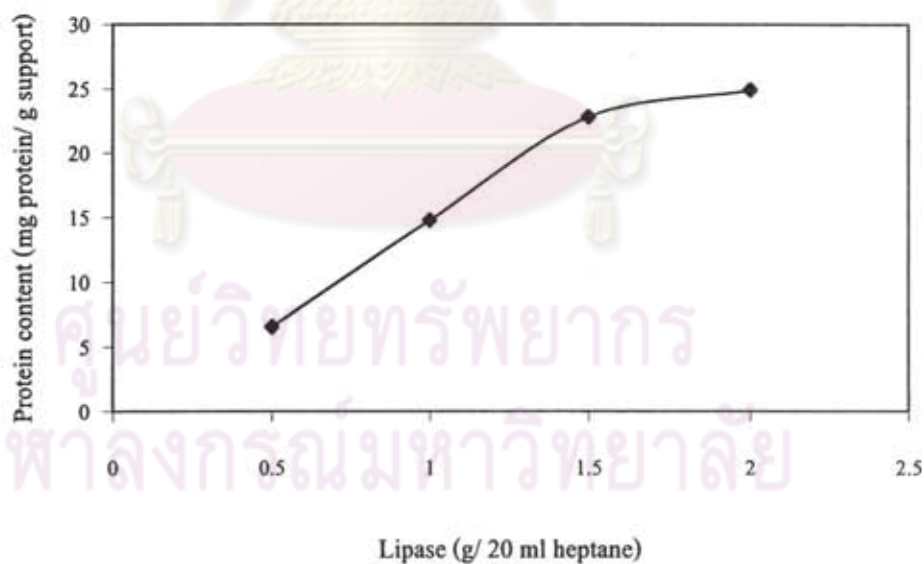
จากรูป 4.19 จะเห็นได้ว่าวิธีการตรึงที่ทำการตรึงเอนไซม์นั้นส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ไม่มากนัก โดยเอนไซม์ไลเปสมีการสูญเสียกิจกรรมมากกว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสเล็กน้อย ภายหลังจากทดสอบ 10 ชั่วโมง

#### 4.3.2.1.2 ผลการทดสอบความสามารถในการจุเอนไซม์ของอาร์เอฟคาร์บอนเจล

จากผลการตรึงเอนไซม์ในหัวข้อ 4.3.2.1 จึงสนใจเลือกเฉพาะการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปสบน RF-NS คาร์บอนมาทดสอบความสามารถในการจุเอนไซม์ โดยทำการทดสอบการตรึงที่ความเข้มข้นหรือปริมาณของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ผลการทดสอบ แสดงดังรูปที่ 4.20 และ 4.21



รูปที่ 4.20 แสดงปริมาณ โปรตีน(แอลคาไลน์โปรติเอส) ที่ถูกตรึงบน RF-NS carbon 2 กรัม ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรติเอสค่าต่างๆ



รูปที่ 4.21 แสดงปริมาณ โปรตีน(ไลเปส) ที่ถูกตรึงบน RF-NS carbon 2 กรัม ที่ปริมาณเอนไซม์ ไลเปสค่าต่างๆ

จากรูปที่ 4.20 และ 4.21 จะเห็นว่า RF-NS คาร์บอน สามารถตรึงเอนไซม์ ได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นหรือปริมาณของเอนไซม์สูงขึ้นจนกระทั่งถึงค่าที่เป็นขีดจำกัดความจุของ RF-NS

คาร์บอน โดย RF-NS คาร์บอนสามารถดึงเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสสูงสุดที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 50% ของความเข้มข้นเอนไซม์เริ่มต้น และมีปริมาณโปรตีนที่ตรงได้ 702.90  $\mu\text{g protein/g support}$  และสามารถดึงเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดที่ 2 กรัมไลเปส โดยมีปริมาณโปรตีน ที่ตรงได้ 24.91  $\text{mg protein/g support}$

#### 4.3.2.1.3 ผลการทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น

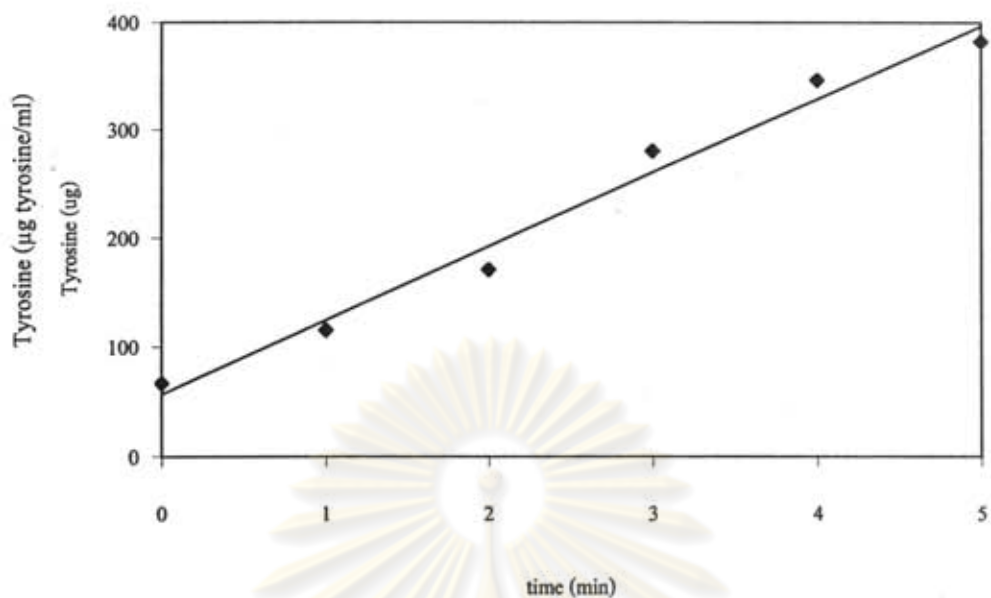
การทดสอบความสามารถของเอนไซม์ครึ่งรูปประการแรก คือการทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์ครึ่งรูป เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ โดยการทดสอบในกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอส สามารถทดสอบจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารละลายเคซีน โดยใช้เอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสอิสระ หรือเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสครึ่งรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะการเร่งปฏิกิริยาคือ อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 20 นาที และทำการเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแพร่ของโมเลกุลของสับสเตรตไปยังเอนไซม์ โดยเฉพาะในกรณีของเอนไซม์ครึ่งรูป ปริมาณผลิตภัณฑ์คือไทโรซีนสามารถวิเคราะห์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง ที่ความยาวคลื่น 280 nm เปรียบเทียบค่ากับกราฟมาตรฐานของไทโรซีนดังแสดงในภาคผนวก ก

การทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส เป็นการเร่งปฏิกิริยาในระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ จะแตกต่างจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่ทำปฏิกิริยาในสถานะที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย ถ้าเอนไซม์ไลเปสครึ่งรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดี นั้นหมายถึงความเป็นไปได้ในการนำอาร์เอฟคาร์บอน ไปใช้ในการดึงเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาในระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งจะสามารถประยุกต์ใช้อาร์เอฟคาร์บอนในขอบเขตที่กว้างขึ้นได้

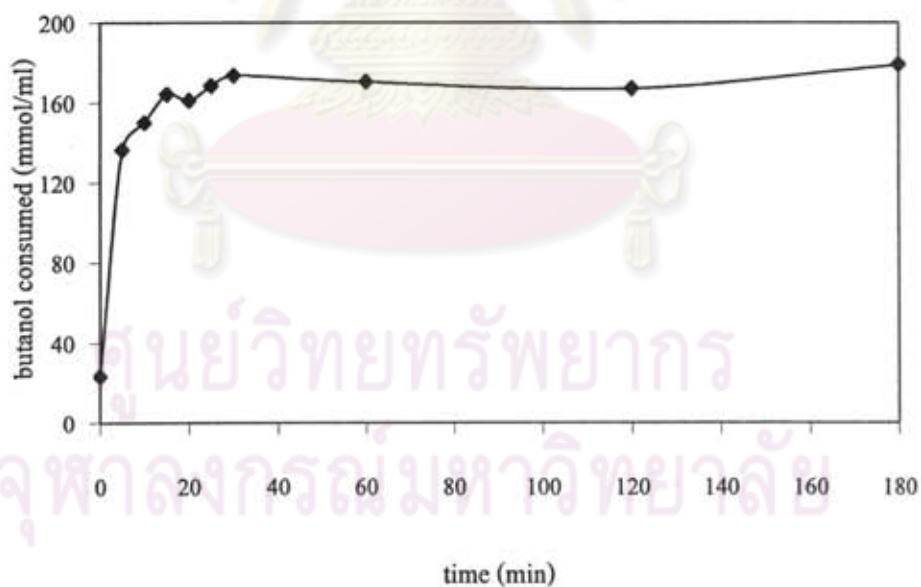
ในงานวิจัยนี้ทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันระหว่างบิวทานอล และกรดบิวทาริก โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมีเฮปแทนเป็นตัวทำละลาย ภายใต้สภาวะการทำปฏิกิริยาคือเขย่าในแนวระดับด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาความเข้มข้นของบิวทานอลที่คงเหลืออยู่ในระบบโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี และใช้เฮกเซนอลเป็นสารมาตรฐานกราฟมาตรฐานของ บิวทานอลแสดงในภาคผนวก ข

จากการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสอิสระ แสดงดังรูปที่ 4.22 และ 4.23 จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาทั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเคซีน และปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน ดำเนินปฏิกิริยาได้เร็วมากในช่วงต้นของปฏิกิริยา คือช่วง 0 ถึง 20 นาที





รูปที่ 4.22 แสดงปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นในช่วงการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น จากการเร่งปฏิกิริยาของ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสอิสระที่  $45^{\circ}\text{C}$ , 5 นาที และ 150 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.23 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปในระหว่างการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นจากการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ วิธีเคชั่นของเอนไซม์ไลเปสอิสระ ที่  $37^{\circ}\text{C}$ , 180 นาที และ 150 รอบต่อนาที

สำหรับเอนไซม์ครึ่งรูป สามารถทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยวิธีเช่นเดียวกับเอนไซม์อิสระ กิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ในช่วงอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นนี้ แสดงดังตารางที่ 4.8 โดยนิยามของยูนิตแอกทิวิตี (unit activity) ของเอนไซม์แอลคาไลน์ โปรติเอสคือ ปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ในหน่วยไมโครกรัมในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และมีค่าพีเอชเป็น 10.5 ส่วนนิยามของยูนิตแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสคือปริมาณรีวทานอลที่ถูกใช้ไปในหน่วยมิลลิโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.8 แสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์ไลเปส

Condition	Specific activity of alkaline protease (units/ml-mg protein)	Specific activity of Lipase (units/ml-mg protein)
Natural enzyme	50.58	9.69
Adsorbed on RF-CS carbon	103.80	13.04
Adsorbed on RF-NS carbon	8.08	12.81

จากผลการทดสอบพบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้สูงกว่าทั้งเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน หรือแม้กระทั่งเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการยึดตัวระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสกับพื้นผิว RF-CS คาร์บอน ทำให้โครงรูป (conformation) ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสมีความเหมาะสมกับโมเลกุลของเคซีนมากขึ้น อีกทั้งจากข้อสันนิษฐานเบื้องต้นที่ว่า เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสน่าจะถูกตรึงไว้เฉพาะที่พื้นผิวด้านนอกของ RF-CS คาร์บอน แทนที่จะเข้าไปในรูพรุน จึงสามารถตัดประเด็นข้อจำกัดในการแพร่ของโมเลกุลของสับสเตรตเข้าไปยังโมเลกุลของเอนไซม์ออกไปได้

สำหรับกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนนั้น มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นน้อยกว่าทั้งสองกรณี อาจเป็นสาเหตุมาจากเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนนี้ ส่วนใหญ่น่าจะถูกตรึงอยู่ในรูพรุนของคาร์บอน ซึ่งอาจทำให้เกิดการเบียดบังกันเองของโมเลกุลเอนไซม์ ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จึงมีไม่เต็มที่

จากตารางที่ 4.8 พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอน มีกิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ไลเปสอิสระที่อยู่ในรูปสารแขวนลอยในเฮปแทนนั้น มีการกระจายตัวที่ไม่ดี ซึ่งต่างจากเอนไซม์ครึ่งรูป ดังนั้นอัตราเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ จึงน้อยกว่าเอนไซม์ครึ่งรูปในทุกกรณี

#### 4.3.2.1.4 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยา

คุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์ตรีงรูปประการหนึ่ง คือความสามารถในการรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ให้คงไว้ได้มากที่สุด เพื่อความสามารถในการนำเอนไซม์ตรีงรูปกลับไปใช้เร่งปฏิกิริยากับสับสเตรคใหม่ได้ การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรีงรูป จะมีวิธีการที่แตกต่างกันบ้างในแง่ของการใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยากับสับสเตรคใหม่ โดยในส่วนของเอนไซม์ตรีงรูปนั้น เมื่อทำการเร่งปฏิกิริยาในแต่ละรอบเสร็จสิ้น จะทำการแยกเอนไซม์ตรีงรูปออกจากสารผสม จากนั้นนำเอนไซม์ตรีงรูปไปล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่หลุดออกภายหลังการทำปฏิกิริยา แล้วจึงนำเอนไซม์ตรีงรูปไปเร่งปฏิกิริยากับสับสเตรคใหม่ แต่ในกรณีของเอนไซม์อิสระนั้น การแยกเอนไซม์ออกจากสารผสมเป็นไปได้ยาก ในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธีการเติมสับสเตรคเข้มข้นเพิ่มเข้าไปแทนสับสเตรคที่ถูกใช้ในการดำเนินปฏิกิริยา ภายใต้สมมติฐานที่ว่าสับสเตรคถูกใช้หมดไปภายหลังจากการเร่งปฏิกิริยาเป็นระยะเวลายาวนานในแต่ละรอบปฏิกิริยา สาเหตุที่ต้องใช้สับสเตรคเข้มข้นนั้นก็เพื่อควบคุมปริมาตรของระบบให้คงที่มากที่สุด ซึ่งจะไม่ส่งผล หรือส่งผลน้อยต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ สำหรับรอบการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสนี้คือ 6 ชั่วโมงต่อหนึ่งรอบ

สำหรับการทดสอบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ สามารถทำได้ง่ายกว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ทั้งนี้เพราะเอนไซม์มีลักษณะเป็นสารแขวนลอย ไม่ละลายในตัวทำละลาย จึงสามารถกรองแยกออกมาได้ง่าย และนำไปใช้เร่งปฏิกิริยาใหม่ได้ ทำให้สามารถควบคุมปัจจัยในการเร่งปฏิกิริยาแต่ละครั้งได้เหมือนกัน โดยการทดสอบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสนี้จะใช้รอบการเร่งปฏิกิริยา คือ 24 ชั่วโมงต่อ 1 รอบ แต่ช่วงเวลาที่สนใจคือช่วงเวลา 0-20 นาทีซึ่งเป็นช่วงการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น

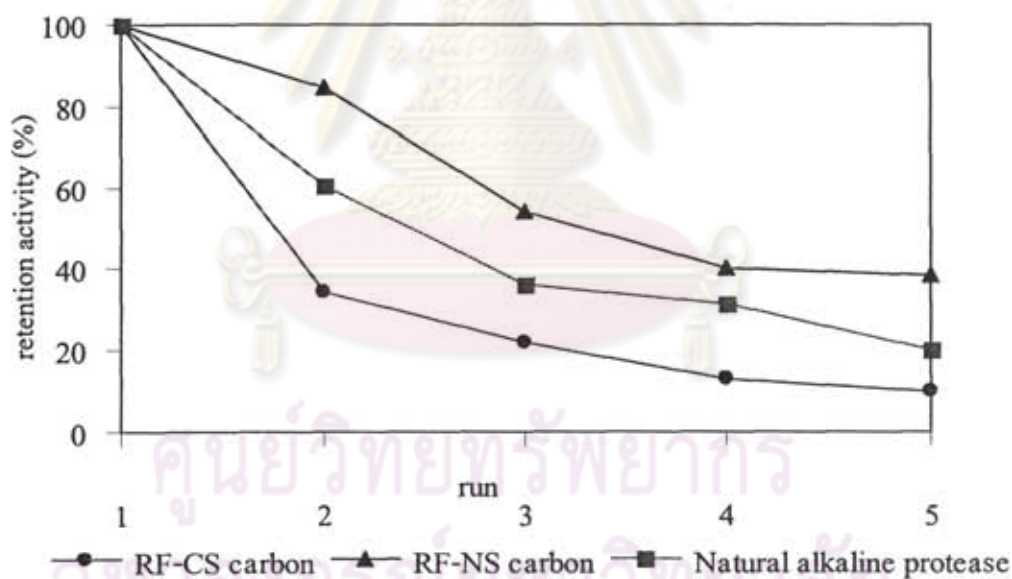
ผลการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ แอลคาไลน์โปรติเอสตรีงรูป เอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรีงรูป แสดงอยู่ในภาคผนวกที่ ๑.5 ถึง ๑.7 และ ๑.5 ถึง ๑.7 ตามลำดับ โดยในช่วงเวลาการดำเนินปฏิกิริยา 0 ถึง 5 นาที ปฏิกิริยาจะดำเนินไปอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในการเร่งปฏิกิริยาแรก

การเปรียบเทียบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยา ของเอนไซม์อิสระกับเอนไซม์ตรีงสามารถทำได้โดยการนำค่าอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น ในแต่ละรอบการเร่งปฏิกิริยาของแต่ละเอนไซม์มาเปรียบเทียบในแง่ของกิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) โดยให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของรอบแรกของการเร่งปฏิกิริยาเป็น 100% ดังนั้นกิจกรรมสัมพัทธ์ในรอบถัดๆมาจะมีค่าลดลง ในส่วนของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ผลของกิจกรรมสัมพัทธ์แสดงดังรูปที่ 4.24 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรีงบน RF-NS คาร์บอนจะมีการลดลงของ กิจกรรมสัมพัทธ์น้อยกว่าในกรณีอื่นๆ โดยเมื่อเร่งปฏิกิริยาไป 5 รอบปฏิกิริยาพบว่ายังคงกิจกรรมไว้ได้ 38.20% ของ

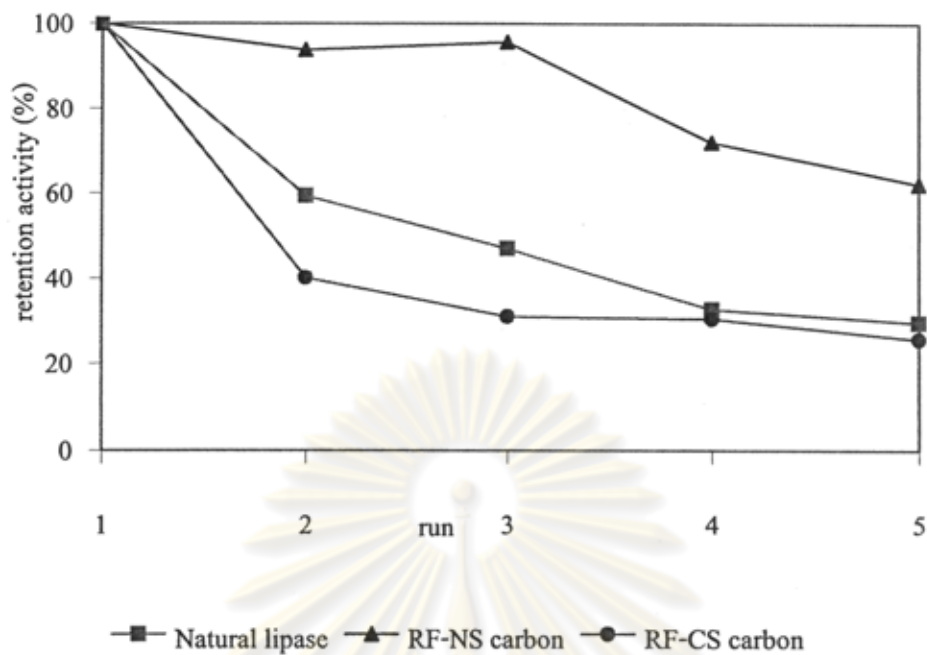


กิจกรรมเริ่มต้น ในขณะที่เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ เหลือกิจกรรมเพียง 19.99% ของกิจกรรมเริ่มต้น ผลการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนสามารถรักษากิจกรรมไว้ได้ดีที่สุดเมื่อทำการเร่งปฏิกิริยาซ้ำหลายรอบปฏิกิริยา โดยเมื่อผ่านไป 5 รอบปฏิกิริยาเอนไซม์ตรึงรูปนี้ยังมีกิจกรรมเป็น 62.23% ของกิจกรรมเริ่มต้น ในขณะที่เอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนมีกิจกรรมเพียง 29.69% และ 25.76% ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ ผลกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสแสดงคังรูปที่ 4.25

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่มี RF-NS คาร์บอนเป็นตัวรองรับ มีความเสถียรในการเร่งปฏิกิริยามากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะกับเอนไซม์อิสระ อาจเป็นเพราะเอนไซม์เข้าไปยึดติดในรูพรุนของ RF-NS คาร์บอนซึ่งจะช่วยป้องกันเอนไซม์จากสิ่งแวดล้อม ภายนอกซึ่งอาจก่อให้เกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ได้ โดยเฉพาะกับการบ่มเอนไซม์ไว้เป็นระยะเวลาานาน



รูปที่ 4.24 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ



รูปที่ 4.25 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน และเอนไซม์ไลเปสอิสระ

เมื่อพิจารณาถึงผลการตรวจสอบการหลุดของเอนไซม์จากตัวรองรับ ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และ 4.10 จะเห็นว่า ปริมาณโปรตีนที่ตรวจสอบได้ในน้ำล้าง หลังการเร่งปฏิกิริยาในรอบแรก ของเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนมีค่าสูงกว่าเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน การหลุดของเอนไซม์นี้อาจเป็นสาเหตุสำคัญของการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปนี้ สำหรับสาเหตุอื่นๆอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเสื่อมสภาพของเอนไซม์จากสภาวะการเร่งปฏิกิริยาซ้ำ อันเนื่องมาจากการขีดเกาะของเอนไซม์ที่อยู่บริเวณพื้นผิวด้านนอกของ RF-CS คาร์บอน

ตารางที่ 4.9 แสดงปริมาณโปรตีน(เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส)ที่หลุดจากอาร์เอฟคาร์บอน ในน้ำล้างภายหลังการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ

Enzyme	Protein content in washed buffer solution ( $\mu\text{g}$ protein)					
	after run1	after run2	after run3	after run4	after run5	Total
Adsorbed on RF-CS carbon	72.51	37.41	29.62	19.34	3.44	162.31
Adsorbed on RF-NS carbon	37.41	52.33	37.10	15.46	9.28	151.59

ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณโปรตีน(เอนไซม์ไลเปส)ที่หลุดจากอาร์เอฟคาร์บอนที่มากับน้ำล้าง ภายหลังจากเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ

Enzyme	Protein content in washed hepta(neg protein)					
	after run1	after run2	after run3	after run4	after run5	Total
Adsorbed on RFCS carbon	1.23	0.75	0.23	0.31	0.11	2.63
Adsorbed on RNS carbon	0.77	0.52	0.11	0.17	0.15	1.72

#### 4.3.2.1.5 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษา

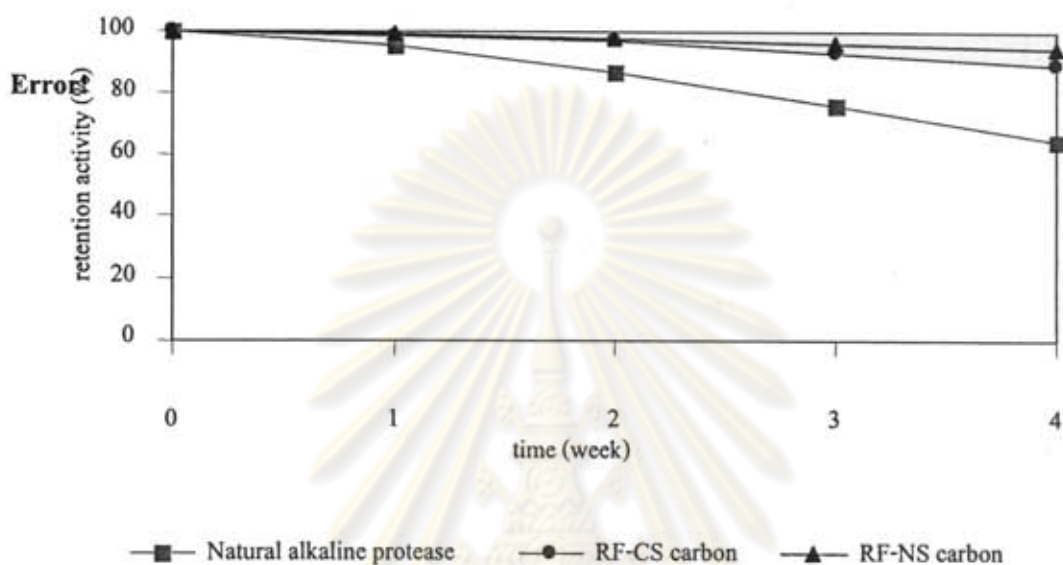
เสถียรภาพของเอนไซม์อีกประเภทหนึ่ง คือเสถียรภาพในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่ อุณหภูมิต่างๆ โดยเสถียรภาพประเภทนี้มีความสำคัญมากสำหรับเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ใช้เร่งปฏิกิริยา ในทันทีหลังการเตรียมเอนไซม์ โดยทั่วไปเอนไซม์จะสามารถรักษาเสถียรภาพไว้ได้เมื่อเก็บรักษา ที่อุณหภูมิต่ำ หากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์อิสระจะมีค่าลดลงตามเวลาการเก็บรักษา ดังนั้นการใช้เอนไซม์ครึ่งรูปเข้ามาช่วยจะสามารถลดปัญหาดังกล่าวลงได้

การทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษาเอนไซม์ในงานวิจัยนี้ ทำการทดสอบโดยการเก็บ เอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ครึ่งรูปไว้ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 °C สำหรับการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °C) ถึงแม้ในการใช้งานจริงไม่นิยมเก็บรักษาที่อุณหภูมินี้ แต่ในงานวิจัยนี้ ต้องการทดลองเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ครึ่งรูป กับ เอนไซม์อิสระให้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยผลการทดสอบเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ ไลเปสแสดงดังรูปที่ 4.26, 4.27, 4.28 และ 4.29

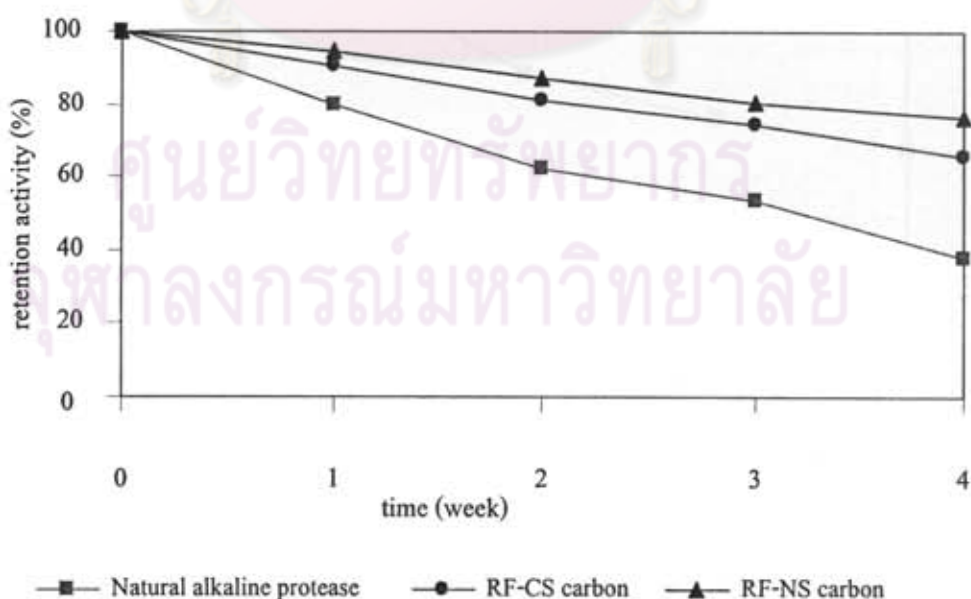
จากรูปพบว่าเมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และอุณหภูมิห้องนาน 4 สัปดาห์ ทั้ง เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระและเอนไซม์ไลเปสอิสระ จะมีกิจกรรมลดลงมากกว่าเอนไซม์ ครึ่งรูป โดยในส่วนของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระจะมี กิจกรรมลดลงเหลือ 64.08% และ 38.05% ของกิจกรรมเริ่มต้น เมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และอุณหภูมิห้องตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ครึ่งบน RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอน ยังคงกิจกรรมไว้ได้ 89.27% และ 94.32% ของกิจกรรมเริ่มต้น ตามลำดับที่ อุณหภูมิ 4 °C และ 65.24% และ 76.56% ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับ เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์ไลเปสอิสระจะมีกิจกรรมลดลงเหลือ 70.67% และ 33.01% ของกิจกรรม เริ่มต้น เมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และอุณหภูมิห้องตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์ ไลเปสที่ครึ่งบน RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอน ยังคงกิจกรรมไว้ได้ 85.42% และ 93.02% ตามลำดับที่อุณหภูมิ 4 °C และ 67.74% และ 86.54% ที่อุณหภูมิห้อง



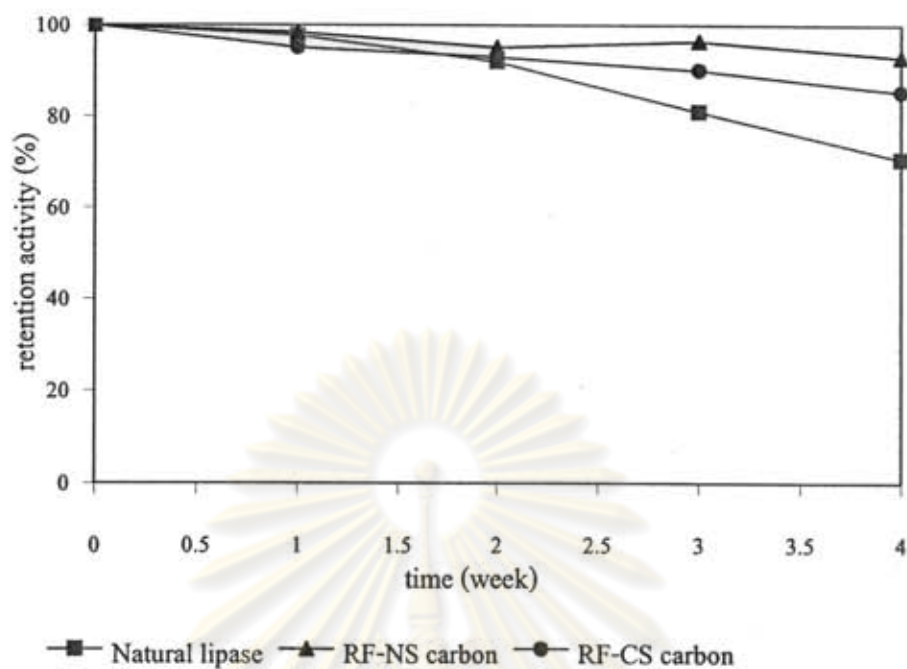
การที่เอนไซม์ตรีงรูปสามารถรักษาเสถียรภาพได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระนี้ อาจเป็นผลมาจากความสามารถของอาร์เอฟคาร์บอน ในการเป็นเกราะป้องกันการสูญเสียสภาพของเอนไซม์เนื่องจากการย่อยตัวเอง (autodigestion) ปกป้องเอนไซม์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อเอนไซม์ได้อีกทั้งด้วยคุณสมบัติของตัวคาร์บอนที่ทนต่อการนำความร้อน จึงช่วยป้องกันเอนไซม์จากอุณหภูมิสูงได้ดีอีกด้วย



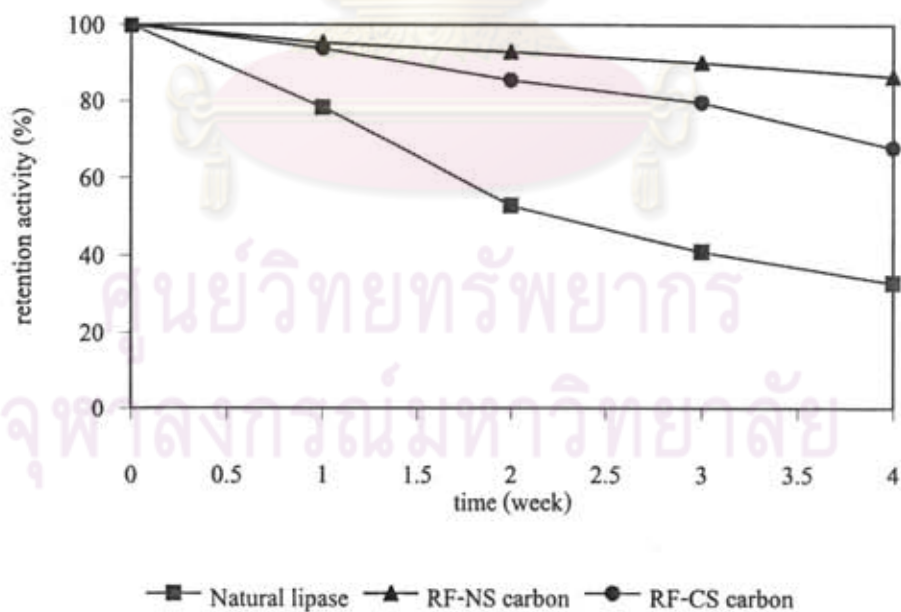
รูปที่ 4.26 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์แอลคาไลน์ โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน



รูปที่ 4.27 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ของเอนไซม์ แอลคาไลน์ โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน



รูปที่ 4.28 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน



รูปที่ 4.29 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ของเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน

จากงานวิจัยของ Wu และ Chiou [50] ที่ทำการศึกษาเสถียรภาพในการเก็บรักษาของเอนไซม์ไลเปส *Candida rugosa* ที่ตรึงบนโกลโดซานที่ถูกกระตุ้นด้วยหมู่ไฮดรอกซิล พบว่าเมื่อเก็บรักษาแบบแห้งที่อุณหภูมิไว้เป็นระยะเวลา 30 วัน เอนไซม์ตรึงจะยังคงรักษากิจกรรมไว้ได้ประมาณ 50% ของกิจกรรมเริ่มต้น

#### 4.3.2.2 ผลการตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล

##### 4.3.2.2.1 ผลการทดสอบปริมาณโปรตีนที่ตรึงในอาร์เอฟเจล

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้มไว้ในโพรงพอลิเมอร์ของอาร์เอฟเจลนั้น เป็นงานที่ศึกษาต่อเนื่องมาจากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพดังรายงานผลไว้ในหัวข้อ 4.3.2.1 ซึ่งจากผลการตรึงเอนไซม์โดยใช้ RF-CS คาร์บอนนั้นไม่ดีเท่าที่ควร ทั้งในแง่ของความสามารถในการตรึงเอนไซม์ ความเสถียรในการเร่งปฏิกิริยา ประกอบการเตรียม RF-CS เจลนี้ จะมีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวชนิดแคตไอออนิก ซึ่งอาจมีผลในการทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ รวมไปถึงการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายปริมาณมากในขั้นของการกระจายตัว จะทำให้สารละลายเอนไซม์ที่เติมลงไปในกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสมีความเจือจางเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะเลือกใช้ในการทดลองการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้ม การทดลองในส่วนนี้จึงทดสอบเฉพาะกับ RF-NS เจลเท่านั้น

ในการทดลองนี้ยังมีหลายๆปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง อันได้แก่ปริมาณน้ำโดยรวมของสารละลายอาร์เอฟ ก่อนและหลังการเติมสารละลายเอนไซม์ที่ต้องควบคุมเพื่อให้ได้อัตราส่วนของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อน้ำ (C/W) คงที่เท่ากับ 5.67 เช่นเดียวกับกรณีการเตรียม RF-NS คาร์บอนเพื่อควบคุมความต้องการในการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบกับวิธีการตรึงบน RF-NS คาร์บอน ในกรณีของเอนไซม์ไลเปสซึ่งอยู่ในรูปของแข็ง การเติมเอนไซม์ลงไปในสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้น ไม่ส่งผลต่อปริมาณน้ำ ในขณะที่การเติมเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ซึ่งอยู่ในรูปสารละลาย ต้องมีการควบคุมปริมาณน้ำของสารละลายอาร์เอฟกับสารละลายเอนไซม์ โดยการควบคุมปริมาณน้ำสามารถทำได้ โดยการเติมสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่มีความเข้มข้นสูงคือ 100% โดยปริมาตร เพื่อให้มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำน้อยที่สุด อีกทั้งยังลดปริมาณการเติมน้ำในขั้นตอนการเตรียมสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่เติมลงไป โดยสัดส่วนของปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่เติมลงไปในสารละลายอาร์เอฟต่อปริมาตรของระบบโดยรวมเป็น 1:20

เวลาในการเติมสารละลายเอนไซม์ลงไปในสารละลายอาร์เอฟเป็นสิ่งที่สำคัญ โดยเวลาที่น่าจะเหมาะสมที่สุดในการเติมสารละลายเอนไซม์ คือเวลาที่สารละลายอาร์เอฟใกล้สูญเสียวความเป็นของไหล ทั้งนี้เพื่อลดผลกระทบที่อาจเกิดจากสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้น อาทิ ริโซซินอล และฟอร์มาลดีไฮด์ ที่จะมีต่อโครงสร้างของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ในช่วงที่สารละลายอาร์เอฟใกล้สูญเสียวความเป็นของไหลนั้น ได้ผ่านช่วงของการทำปฏิกิริยาใน



การสร้างอนุภาคคอลลอยด์ไปแล้ว คงเหลือแต่เพียงช่วงการสร้างโครงสร้างโครงข่าย (network forming) ซึ่งเหมาะแก่การเติมสารละลายเอนไซม์ลงไปเพื่อให้เข้าไปอยู่ในโครงสร้างโครงข่ายดังกล่าวก่อนที่โครงสร้างเจลจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จากการทดลองวิธีการเรียงที่เหมาสมพบว่า หลังจากนำสารละลายอาร์เอฟไปแช่ที่อ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 10 นาที ควรนำสารละลายอาร์เอฟมาแช่อ่างน้ำเย็นเพื่อลดอุณหภูมิในทันที เมื่ออุณหภูมิของสารละลายอาร์เอฟมีค่าประมาณอุณหภูมิห้อง จึงทำการเติมสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ลงไป จากนั้นกวนเบาๆจนเข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วปล่อยให้แห้งทิ้งให้เป็นเจลที่อุณหภูมิห้อง โดยระยะเวลาของการเกิดเจลในกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส จะเกิดเจลหลังจากตั้งทิ้งไว้อยู่ในช่วง 15-20 นาที ซึ่งจะสังเกตเห็นสีของเจลเปลี่ยนไปจากสีส้มกลายเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเป็นสีของสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ในขณะที่กรณีของเอนไซม์ไลเปส ระยะเวลาการเกิดเจลเร็วกว่า โดยอยู่ในช่วง 3-5 นาที

ถึงแม้ค่าความเป็นกรดเบส จะเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่ง ที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ แต่การทดลองในงานวิจัยนี้จะไม่ทำการปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้น ทั้งนี้จากการศึกษาของงานวิจัยของ Job และคณะ [6] ที่ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดเบสในสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้นที่มีต่ออาร์เอฟเซโรเจลที่เตรียมได้ พบว่าที่ค่าความเป็นกรดเบสมีค่าสูง จะทำให้เกิดการยุบตัวของโครงสร้างเจลภายหลังการทำให้แห้งมาก ซึ่งจะทำให้เจลมีพื้นที่ผิว และปริมาตรรูพรุนน้อยมาก จนอาจเป็นวัสดุที่ไม่มีรูพรุนได้ โดยในการทดลองนี้ได้มีการตรวจสอบค่าพีเอชของสารละลาย RF-NS ในช่วงก่อนเติมสารละลายเอนไซม์พบว่ามีค่าประมาณ 6.50 และหลังเติมสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสมีค่าประมาณ 7.20

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ RF-NS เจลสามารถตรึงไว้ได้นั้น ทำได้โดยการล้าง RF-NS เจลที่มีเอนไซม์ครึ่ง ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์หรือเฮปแทน ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในโครงเจลจึงคำนวณได้จากการทำสมดุลมวลสารของโปรตีนที่เติมเข้าไปในตอนต้น กับโปรตีนที่หลุดออกมาจากน้ำล้าง จากการวิเคราะห์พบว่า RF-NS เจลสามารถตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสคิดเป็นปริมาณโปรตีนคือ 1770.09  $\mu\text{g protein} / \text{g support}$  หรือ 86.30% ของปริมาณโปรตีนที่เติมลงไปตอนต้น และสามารถตรึงเอนไซม์ไลเปสคิดเป็นปริมาณโปรตีนคือ 19.69 mg protein หรือ 84.36% ของปริมาณโปรตีนที่เติมลงไปตอนต้น เมื่อเปรียบเทียบผลปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้ด้วยวิธีนี้กับที่ตรึงโดยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF-CS คาร์บอนและ RF-NS คาร์บอน พบว่าเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีห่อหุ้มนี้มีความสามารถในการตรึงเอนไซม์สูงกว่าทั้งสองกรณี ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่เติมสารละลายเอนไซม์ไปโดยตรงในระหว่างการทำฟอรั่มตัวของเจลนั้น จะช่วยให้การแพร่และการกระจายตัวของสารละลายเอนไซม์เข้าไปในเนื้อของตัวรองรับเป็นไปได้สูง และเมื่ออนุภาคของอาร์เอฟจัดเรียงตัวกันจนเกิดเป็นโครงข่ายนั้น จะโอบเอาโมเลกุลของเอนไซม์เข้าไปในโพรงระหว่างอนุภาค จึงส่งผลให้เอนไซม์หลุดออกมาจากโครงสร้างเจลได้ยาก และเมื่อเปรียบเทียบ

ความสามารถในการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสของ RF-NS เจลนี้กับการตรึงใน 5% (w/v) acrylamide ที่เติม crosslinker 2% ที่ศึกษาโดย Abdel-Naby และคณะ [Mohamed A et.al., 1998] พบว่าสามารถตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์ โปรติเอสได้มากกว่าเล็กน้อย โดย acrylamide สามารถตรึงเอนไซม์ไว้ได้ 76% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น

จากผลการทดลอง เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Neau และ Betigeri [Shao-Hua Chiou et.al, 2004] ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ด้วย Alginate gel beads และ Chitosan gel beads ด้วยวิธีห่อหุ้ม และทำให้แห้งด้วยกระบวนการ Freeze dried พบว่าสามารถตรึงเอนไซม์ได้ 44-50% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น ขณะที่ Bryjak และคณะ [Scema S. et.al, 2002] ทำการตรึงเอนไซม์ชนิดเดียวกันใน acrylic copolymers ตรึงเอนไซม์ได้สูงสุด 78.1% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น

สำหรับการทดสอบความสามารถในการจุเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสในส่วนของ RF-NS เจลนั้น เนื่องจากการตรึงได้ทดสอบที่ 100% สารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสแล้ว ดังนั้นจึงไม่ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นสารละลายเอนไซม์ที่ต่ำกว่าค่านี้อีก ทั้งนี้เพื่อลดปัญหาในเรื่องของปริมาณน้ำที่มีต่อโครงสร้างของ RF-NS เจลที่เตรียมได้ ในส่วนของเอนไซม์ไลเปส ทำการทดสอบที่อัตราส่วนของปริมาณเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายอาร์เอฟแตกต่างกันคือ 0.5, 1, 1.5 และ 2 g ในสารละลาย อาร์เอฟ 20 ml พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่เติมลงไป ใน RF-NS เจลกับปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้แปรผันตามกัน แต่ในกรณีการเติมเอนไซม์ 1.5 g/ 20 ml และ 2 g/ 20ml การกระจายของเอนไซม์ไม่ดีพอ และ RF-NS เจลที่ได้จะจับตัวเป็นก้อนไม่เป็นเนื้อเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ ในการทดลองลำดับต่อไปจะเลือกใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ทำการตรึงที่อัตราส่วน 0.5 g/ 20 ml ตลอดการทดลอง

#### 4.3.2.2.2 ผลการทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น

การทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์ที่ตรึงอยู่ใน RF-NS เจลสามารถทดสอบโดยใช้กระบวนการเช่นเดียวกับการทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์ที่ตรึงอยู่ใน RF-CS คาร์บอนและ RF-NS คาร์บอน โดย RF-NS เจลที่ตรึงเอนไซม์แล้วนั้น จะต้องหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ในที่นี้คือเป็นรูปทรงลูกบาศก์ขนาด 2x2x2 มิลลิเมตร เพื่อลดข้อจำกัดในการแพร่ของซับสเตรตไปสู่เอนไซม์ให้น้อยที่สุด

จากการคำนวณหากิจกรรมจำเพาะ (specific rate) ในช่วง 5 นาทีแรกพบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงใน RF-NS เจลมีค่ากิจกรรมจำเพาะเป็น 2.82 units/ml-mg protein ซึ่งมีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ และการตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอน ซึ่งมีค่าเป็น 50.58, 103.80 และ 8.08 units/ml-mg protein ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ กล่าวคือถ้าพิจารณาในแง่ของการข้อจำกัดในการแพร่



ของโมเลกุลของสับสเตรตเข้าไปภายในเจล รวมไปถึงขนาดของเจลที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคคาร์บอนแล้วยังมีขนาดใหญ่กว่ามาก นอกเหนือจากข้อจำกัดในการแพร่แล้วสาเหตุที่น่าจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง อาจเป็นเพราะเอนไซม์อยู่ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดเบสไม่เหมาะสม โดยค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสจะอยู่ที่พีเอช 10.5 ดังนั้นการที่เอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสถูกเติมลงไปในสารละลายอาร์เอฟที่มีค่าพีเอชประมาณ 6.5 ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เหมาะสมต่อเอนไซม์ อาจส่งผลต่อค่าประจุที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ไม่เหมาะสม อาจทำให้การเร่งปฏิกิริยาลดลง นอกจากสองปัจจัยดังกล่าวข้างต้นแล้วนั้น อาจเป็นผลเนื่องมาจากการทำลายโครงสร้างของเอนไซม์โดยสารเคมีที่เป็นสารตั้งต้นของสารละลายอาร์เอฟ ที่อาจเหลืออยู่หลังการเกิดปฏิกิริยา จึงส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่อยู่ภายในเจล

การทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น ของเอนไซม์ไลเปส ที่ตรึงอยู่ใน RF-NS เจล สามารถทดสอบได้โดยใช้กระบวนการเดียวกันกับการทดสอบของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน จากการคำนวณหากิจกรรมจำเพาะ (specific rate) ในช่วง 5 นาทีแรก พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงใน RF-NS เจลมีค่ากิจกรรมจำเพาะเป็น 23.352 unit/ml สูงกว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ ผลการทดลองนี้มีทิศทางที่ตรงข้ามกับในกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอส ทั้งนี้อาจเป็นเพราะลักษณะทางกายภาพของเอนไซม์ที่ต่างกัน และชนิดของเอนไซม์ต่างชนิดกัน อิทธิพลของสภาวะแวดล้อมในสารละลายที่มีต่อความสามารถของเอนไซม์จึงมีความแตกต่างกัน และการที่เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วยวิธีนี้มี กิจกรรมจำเพาะสูงกว่าในกรณีอื่นๆ อาจเป็นเพราะการวางตัวของเอนไซม์ที่อยู่ในคอนฟอร์เมชันที่เหมาะสมต่อการเข้าจับของสับสเตรต จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูงกว่าในกรณีอื่นๆ

#### 4.3.2.2.3 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยา

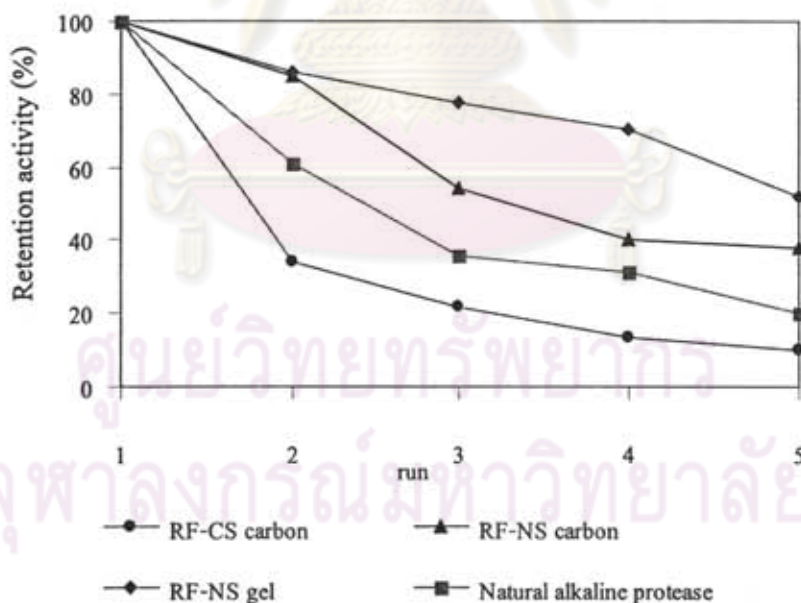
การทดสอบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ตรึงใน RF-NS เจล สามารถทำได้เช่นเดียวกันกับการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ โดยผลการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสตรึงรูป และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ที่เวลาและรอบการดำเนินปฏิกิริยาต่างๆแสดงในภาคผนวกที่ จ.8 และ ฉ.8

เมื่อนำค่าอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น ในแต่ละรอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มาเปรียบเทียบกับในแง่ของกิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) แสดงดังรูปที่ 4.30 และ 4.31 เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ที่คงเหลือในแต่ละรอบ เปรียบเทียบกับเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF-CS และ RF-NS คาร์บอน จะพบว่า เอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่ตรึงด้วยวิธีห่อหุ้ม จะสามารถคงกิจกรรมไว้

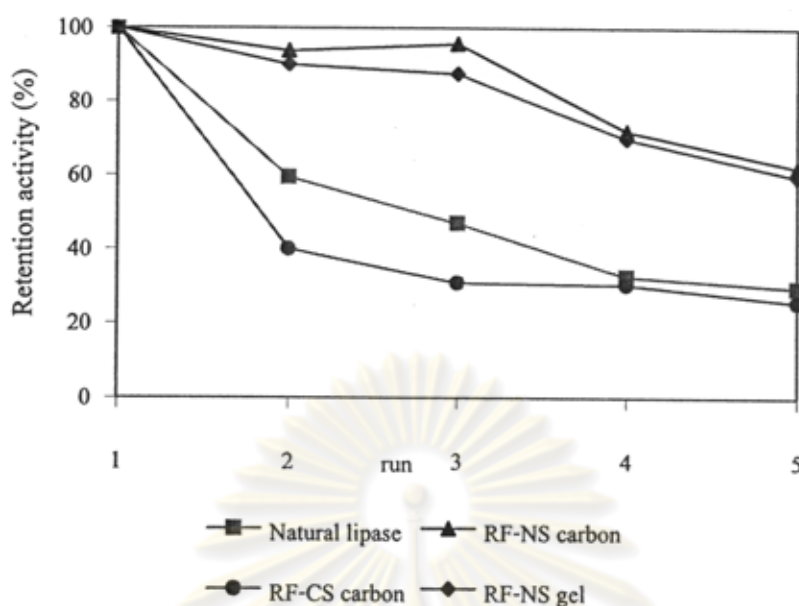


ได้สูงกว่ากรณีอื่นๆ เมื่อทำการเร่งปฏิกิริยาซ้ำในแต่ละรอบ โดยพบว่าที่รอบการเร่งปฏิกิริยารอบที่ 5 เอนไซม์ยังคงกิจกรรมไว้ได้ถึง 64.89% ซึ่งมากกว่าเอนไซม์อิสระถึง 3 เท่า และเมื่อพิจารณาการหลุดของเอนไซม์ออกจากเมทริกซ์ของเจลโดยการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ดังแสดงในตารางที่ 5.7 จะมีการหลุดของเอนไซม์น้อยกว่ากรณีอื่นๆ การที่เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มนี้มีความเสถียรมากกว่าเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ เป็นเพราะเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสจะได้รับการป้องกันอยู่ภายในช่องตาข่ายพอลิเมอร์ การหลุดของเอนไซม์ออกมาภายนอกตัวรองรับจึงเป็นไปได้ยาก อีกทั้งเอนไซม์จะไม่มีอาการจับยึด หรือเกิดพันธะใดๆกับพอลิเมอร์ จึงทำให้โอกาสการเสื่อมสภาพของเอนไซม์มีน้อย

จากรูปที่ 4.31 พบว่าค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF-NS คาร์บอนและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงใน RF-NS เจล มีการลดลงของกิจกรรมสัมพัทธ์น้อยกว่าในกรณีอื่นๆ โดยที่การเร่งปฏิกิริยาผ่านไป 5 รอบ เอนไซม์ตรึงทั้งสองนี้ยังคงแสดงกิจกรรมไว้ได้ 62.23% และ 59.64% ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 29.69% และ 25.76% ตามลำดับ



รูปที่ 4.30 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงในอาร์เอฟเจล เปรียบเทียบกับเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ



รูปที่ 4.31 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงในอาร์เอฟเจล เปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงใน RF-NS เจลที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆ

ผลการทดสอบการหลุดของเอนไซม์จาก RF-NS เจล แสดงดังตารางที่ 4.11 และ 4.12 ซึ่งจะพบว่าเอนไซม์หลุดออกมาจาก RF-NS เจลบ้างในแต่ละรอบปฏิกิริยา

ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณ โปรตีน(แอลคาไลน์โปรติเอส) ที่หลุดมาจาก RF-NS gel มากับน้ำล้าง ภายหลังจากเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ

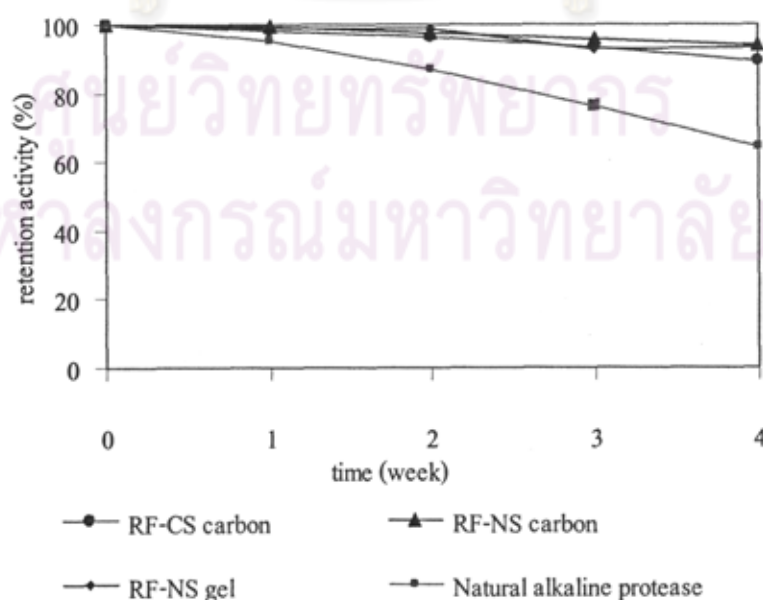
Enzyme	Protein content in washed buffer solution (๓๒ protein)				
	after run1	after run2	after run3	after run4	after run5
RF-NS gel	38.407	34.232	14.962	13.927	17.066

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณ โปรตีน(ไลเปส) ที่หลุดมาจาก RF-NS gel มากับน้ำล้างภายหลังจากเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ

Enzyme	Protein content in washed heptane (mg protein)				
	after run1	after run2	after run3	after run4	after run5
RF-NS gel	0.421	0.211	0.278	0.345	0.292

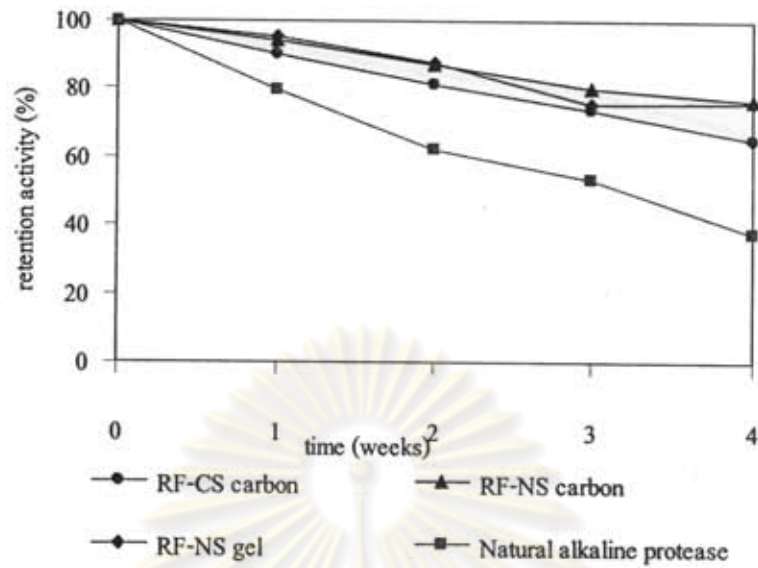
#### 4.3.2.2.4 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษา

ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษาเอนไซม์คิงรูป ที่ตรึงในพอลิเมอร์ของ RF-NS เจล เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ แสดงดังรูปที่ 4.32, 4.33, 4.34 และ 4.35 จากรูปจะเห็นได้ว่า เอนไซม์ที่ตรึงอยู่ใน RF-NS เจล มีเสถียรภาพในการเก็บรักษาทั้งที่อุณหภูมิ 4 °C และอุณหภูมิห้องใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน และสูงกว่าเอนไซม์อิสระ โดยภายหลังการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 °C เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปสคิงรูป มีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 93.24% และ 95.04% ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปสคิงรูป มีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 76.20% และ 78.01% ตามลำดับ การที่เอนไซม์มีความเสถียรในการเก็บรักษาเช่นนี้ สามารถอธิบายได้เช่นเดียวกับกรณีที่เอนไซม์มีความเสถียรในการเร่งปฏิกิริยาผลของความเสถียรในการเก็บรักษานี้มีลักษณะเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Abdel-Naby และคณะ [Mohamed A et.al., 1998] ที่เอนไซม์คิงสามารถรักษากิจกรรมไว้ได้ 87.9% เมื่อเก็บรักษาไว้นานถึง 5 เดือน

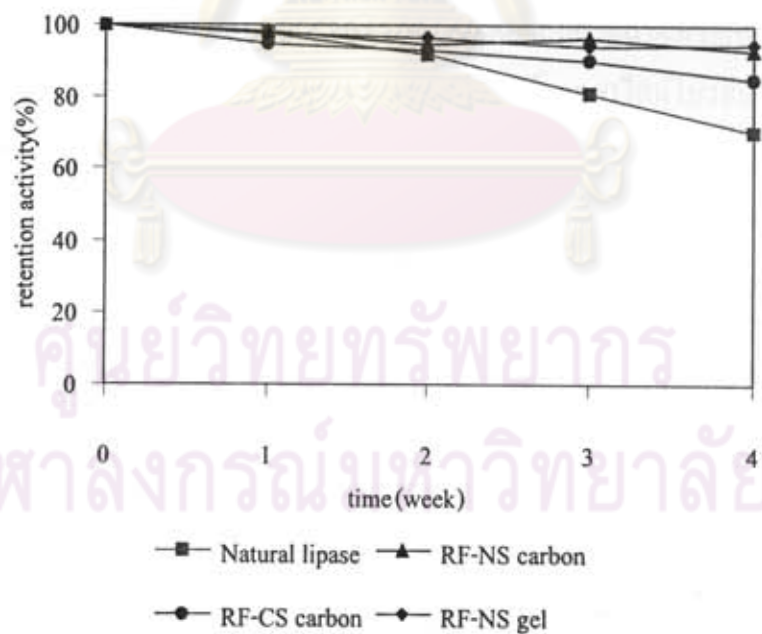


รูปที่ 4.32 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสคิงรูป

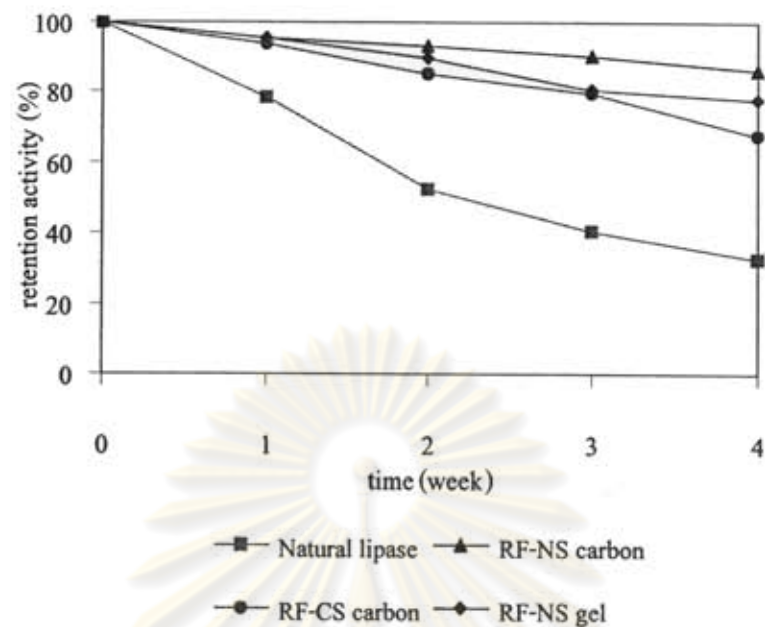




รูปที่ 4.33 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้องของเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรังรูป



รูปที่ 4.34 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรังรูป



รูปที่ 4.35 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

จากผลการทดลองการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปส สามารถสรุปคุณสมบัติของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป ได้ดังตารางที่ 4.13 และ 4.14 ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบในแง่ของความสามารถในการตรึงเอนไซม์ จะพบว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้มนั้น สามารถตรึงเอนไซม์คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าวิธีอื่นๆ ในขณะที่ถ้าพิจารณาอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นในรอบการใช้งานแรก ในส่วนของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนสามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดแต่สำหรับเอนไซม์ไลเปส เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มจะมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดในขณะที่เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนและ RF-NS คาร์บอน มีกิจกรรมจำเพาะใกล้เคียงกัน และมากกว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระ เมื่อพิจารณาถึงความเสถียรในการเร่งปฏิกิริยา และความเสถียรในการเก็บรักษา จะเห็นว่าเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS ไม่ว่าจะด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพหรือวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล จะมีเสถียรภาพสูงกว่าในกรณีอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 4.13 ตารางสรุปคุณสมบัติของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป

Enzyme Alkaline Protease	Enzyme Loading (% of initial enzyme)	Specific rate (unit/ml-mg protein)	Retention activity after 5 cycles (% of initial activity)	Retention activity after 4 weeks	
				4°C (% of initial activity)	Room (% of initial activity)
RF-CS carbon	13.01	103.8	10.06	89.27	65.24
RF-NS carbon	76.25	8.08	38.20	94.32	76.56
RF-NS gel	86.30	2.82	64.89	93.24	76.20
Natural alkaline protease	-	50.58	19.99	64.08	38.05

ตารางที่ 4.14 ตารางสรุปคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

Enzyme Lipase	Enzyme Loading (% of initial enzyme)	Specific rate (unit/ml-mg protein)	Retention activity after 5 cycles (% of initial activity)	Retention activity after 4 weeks	
				4°C (% of initial activity)	Room (% of initial activity)
RF-CS carbon	35.28	13.04	25.76	85.42	67.74
RF-NS carbon	50.62	12.81	62.23	93.02	86.54
RF-NS gel	84.36	23.35	59.64	95.04	78.01
Natural lipase	-	9.69	29.69	70.67	33.01

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 5

### สรุป

#### 5.1 สรุป

5.1.1 ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้กระบวนการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave drying) เพื่อใช้ในการอบแห้ง RF gel ที่เตรียมด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ โซล-เจล พอลิ คอนเดนเซชัน (Sol-gel polycondensation)

โดยทั่วไปแล้วการเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจล นิยมใช้วิธีการอบแห้งด้วยสภาวะเหนือวิกฤตและวิธีการอบแห้งแบบเย็นเยือกในขั้นตอนของการทำเจลให้แห้ง แต่ 2 วิธีนี้ใช้ต้นทุนสำหรับการอบแห้งค่อนข้างสูง ในงานวิจัยนี้ได้นำวิธีการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟมาใช้ในขั้นตอนการอบแห้งซึ่งมีแนวโน้มว่าถูกกว่าการอบแห้งด้วย 2 วิธีแรก โดยพบว่าภายใต้สภาวะการเตรียมที่มีปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีฤทธิ์เป็นด่าง หรือ ค่า C/W มากกว่า 40 โมลต่อลูกบาศก์เมตร รีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจล ที่ได้ภายหลังจากการเผาให้เป็นคาร์บอนนั้นไม่สามารถรักษาสสมบัติรูพรุนแบบมีโซ (Mesopore) ไว้ได้ ดังนั้นจึงนำคลื่นเหนือเสียงมาใช้ระหว่างขั้นตอน โซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน ซึ่งพบว่าภายใต้สภาวะการเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจลที่มีค่า C/W เท่ากับ 80 โมลต่อลูกบาศก์เมตร พร้อมทั้งการปรับเปลี่ยนสัดส่วนเชิงโมลของรีโซซินอลกับตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีฤทธิ์เป็นด่างหรือค่า R/C ในช่วง 100 ถึง 200 โมลต่อโมล หลังจากการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟและการเผาให้เป็นคาร์บอนแล้ว รีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจล ที่ได้จะสามารถรักษาสสมบัติรูพรุนแบบมีโซไว้ได้

นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถใช้คลื่นไมโครเวฟในขั้นตอนการอบแห้งคาร์บอนที่มีสัณฐานของช่องว่างแบบแมคโครระหว่างอนุภาคคาร์บอนที่เชื่อมทะลุถึงกันทั่วทั้งเนื้อวัสดุ (3D-IMM) ได้เมื่อสภาวะการเตรียมที่มีค่า C/W เท่ากับ 10 โมลต่อลูกบาศก์เมตร และค่า R/C อยู่ในช่วง 400 ถึง 1200 โมลต่อโมล

สำหรับผลการศึกษาอื่นๆที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ดังนี้

1. การใช้คลื่นไมโครเวฟในการอบแห้งรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจลมีความเป็นไปได้เมื่อใช้คลื่นเหนือเสียงระหว่างขั้นตอน โซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน และการเพิ่มค่า R/C ที่สภาวะแรกเริ่มในการเตรียมอยู่ในช่วง 100 ถึง 200 โมลต่อโมล

2. การเพิ่มค่า R/C ที่สภาวะแรกเริ่มในการเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจลทำให้สมบัติรูพรุนแบบมีโซมีค่าสูงขึ้นซึ่งได้แก่ ปริมาตรรูพรุนแบบมีโซ ( $V_{mes}$ ) ค่ารัศมีสูงสุดของการกระจายขนาดคาร์ซีรูพรุนแบบมีโซ ( $R_p$ ) และค่าพื้นที่ผิวจำเพาะบีอีที ( $S_{BET}$ )

### 5.1.2 ศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเล็กมาก (Ultramicrosphere) ด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในกระบวนการ Inverse emulsion

การใช้คลื่นเหนือเสียงสำหรับการเตรียมอิมัลชันของรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล เป็นวิธีที่ดีและน่าสนใจในการเตรียมอนุภาคคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่มีขนาดเล็กมาก หรือ Submicron Carbon Sphere จากการศึกษาพบว่า การใช้คลื่นเหนือเสียงเตรียมอนุภาคคาร์บอนไมโครสเฟียร์ได้มีขนาดเล็กกว่าการใช้ ไบควม และไฮโมจิโนซเซอร์ ถึงแม้ว่าการใช้ไฮโมจิโนซเซอร์จะสามารถเตรียมอนุภาคคาร์บอนไมโครสเฟียร์ขนาดเล็กได้ก็ตามแต่ต้องใช้ความเร็วรอบที่สูงมาก ราวๆ 20,000 rpm ขึ้นไป

### 5.1.3 การนำ RF Gel/Carbon gel ไปใช้งานด้าน Biochemical Engineering เน้นที่การทำ Immobilization enzyme (เอนไซม์ตรึงรูป) โดยศึกษาถึงความเป็นไปในการนำ enzyme ไปตรึงอยู่บน RF Carb-on gel

การศึกษากการประยุกต์ใช้อาร์เอฟเจล และอาร์เอฟคาร์บอนเจล (RF เจล และ RF คาร์บอนเจล) เป็นตัวรองรับในการตรึงเอนไซม์ สามารถแบ่งการสรุปผลได้เป็นสองส่วนใหญ่ๆ

#### 5.1.3.1 ผลการเตรียม RF เจล และ RF คาร์บอนเจล

จากผลการทดสอบสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF เจล และ RF คาร์บอนเจล ที่เตรียมโดยใช้และไม่ใช้สารลดแรงตึงผิว ชนิดแคทอไออนิก (RF-CS และ RF-NS) พบว่าทั้ง RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอน มีรูพรุนอยู่ในช่วงเมโซพอร์ โดย RF-NS คาร์บอนมีพื้นที่ผิว ปริมาตรรูพรุนระดับเมโซ และค่าสูงสุดของการกระจายตัวของขนาดรูพรุน ( $R_p$ ) สูงกว่า RF-CS คาร์บอน และ RF-NS เจล ด้วยสมบัติความเป็นรูพรุนที่แตกต่างกันนี้ จะส่งผลต่อความสามารถในการตรึงเอนไซม์ และประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ตรึงได้

#### 5.1.3.2 ผลการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปส

สามารถสรุปตามการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ได้ดังนี้

##### ความสามารถในการตรึงเอนไซม์

เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส : RF-NS เจล โดยการตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล สามารถตรึงเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 86.30% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น และ RF-CS คาร์บอนตรึงได้น้อยที่สุดคือ 13.01% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น



เอนไซม์ไลเปส : RF-NS เจล สามารถตรึงเอนไซม์ได้สูงที่สุด และ RF-CS คาร์บอนตรึงได้น้อยที่สุดคือ 84.36% และ 35.28% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นตามลำดับ

#### ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์

เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส : เอนไซม์ที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนมีกิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด และเอนไซม์ที่ตรึงใน RF-NS เจลมีกิจกรรมจำเพาะต่ำที่สุด โดยมีกิจกรรมจำเพาะเป็น 103.80 และ 2.82 units/ml-mg protein ตามลำดับ

เอนไซม์ไลเปส : เอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนมีกิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด และไลเปสอิสระมีกิจกรรมจำเพาะต่ำที่สุด โดยมีกิจกรรมจำเพาะเป็น 23.35 และ 9.69 units/ml-mg protein ตามลำดับ

#### 5.1.3.3 เสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยา

เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส : เอนไซม์ที่ตรึงใน RF-NS เจลมีเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูงที่สุด และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระมีเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาค่ำที่สุด โดยมีกิจกรรมคงเหลือภายหลังการเร่งปฏิกิริยา 5 รอบ เป็น 64.89% และ 19.99% ของกิจกรรมเริ่มต้น ตามลำดับ

เอนไซม์ไลเปส : เอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนมีเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูงที่สุด และเอนไซม์ไลเปสอิสระมีเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาค่ำที่สุด โดยมีกิจกรรมคงเหลือภายหลังการเร่งปฏิกิริยา 5 รอบ เป็น 62.23% และ 29.69% ของกิจกรรมเริ่มต้น ตามลำดับ

#### 5.1.3.4 เสถียรภาพในการเก็บรักษา

เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส : เอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนมีเสถียรภาพในการเก็บรักษาทั้งที่อุณหภูมิ 4 °C และที่อุณหภูมิห้องสูงที่สุด และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระมีเสถียรภาพในการเก็บรักษาค่ำที่สุด โดยมีกิจกรรมคงเหลือภายหลังการเก็บรักษา 4 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็น 94.32% และ 64.08% ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ และที่อุณหภูมิห้องเป็น 76.56% และ 38.05% ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ

เอนไซม์ไลเปส : เอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนมีเสถียรภาพในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องสูงที่สุดเป็น 86.54% ของกิจกรรมเริ่มต้น ในขณะที่เอนไซม์ที่ตรึงใน RF-NS เจล มีเสถียรภาพในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C สูงที่สุดเป็น 95.04% ของกิจกรรมเริ่มต้น เอนไซม์ไลเปสอิสระยังคงมีเสถียรภาพในการเก็บรักษาค่ำที่สุดทั้งที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 °C โดยมีกิจกรรมคงเหลือภายหลังการเก็บรักษา 4 สัปดาห์เป็น 33.01% และ 70.67% ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ



จากข้อสรุปจะเห็นได้ว่าอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลเป็นวัสดุที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวรองรับในการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปสได้ โดยเอนไซม์ตรึงรูปนี้สามารถแสดงกิจกรรม และเสถียรภาพได้ดีเทียบเท่า และดีกว่าเอนไซม์อิสระ

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ เจล ด้วยการใช้คลื่นเหนือเสียงในการเตรียมมีข้อจำกัดคือสามารถเตรียมได้ในปริมาณน้อยไม่เกิน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. การใช้คลื่นเหนือเสียงและการเพิ่มค่า R/C ในสภาวะแรกเริ่มที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมรีโซซินอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนเจล ทำให้ได้โครงสร้างของเจลที่มีความแข็งแรงและทนต่อการหดตัวเชิงปริมาตร ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสามารถใช้วิธีการอบแห้งด้วยลมร้อน (Subcritical Drying) เพื่อค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการอบแห้ง
3. ในการวิจัยควรมีการทำการทดลองควบคุมเทียบเคียงกับการทดลองจริงเสมอ เพื่อสามารถอธิบายผลการทดลองได้ถูกต้องยิ่งขึ้น
4. สำหรับการวิจัยต่อยอด ควรลองศึกษาใช้อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลที่มีลักษณะโครงสร้างทางรูพรุนที่แตกต่างออกไปในการตรึงเอนไซม์ อาทิอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล ที่เตรียมโดยการใช้เทคนิคคลื่นเหนือเสียง หรืออาร์เอฟคาร์บอนเจล ที่เตรียมโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดอื่นๆ
5. ในส่วนของการศึกษาการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปสนี้ ในอนาคตถ้าทำการศึกษาถึงโมเดลของการจับเกาะของเอนไซม์บน RF คาร์บอน หรือที่ห่อหุ้มใน RF เจล ก็จะเป็นประโยชน์ในการทำนายความเป็นไปได้ในการตรึงเอนไซม์ชนิดอื่นๆต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

- วิเชียร ธิลาวัชรมาศ. การผลิตและการใช้ Immobilized Enzyme. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2521.
- A. Francony, C. Petrier. Sonochemical Degradation of Carbon Tetrachloride in Aqueous Solution at Two Frequencies. Ultrason. Sonochem. 3 (1996): S77-S82.
- A. Henglein, C. Kormann. Scavenging of OH Radicals Produced in the Sonolysis of Water. Int. J. Radiat. Biol. 48 (1985): 251-258.
- C.M. Sehgal, S.Y. Wang. Threshold Intensities and Kinetics of Sonoreaction of Thymine in Aqueous Solutions at Low Ultrasonic Intensities. J. Am. Chem. Soc. 103 (1981): 6606-6611.
- F. Contamine, F. Faid, A.M. Wilhelm, J. Berlan, H. Delmas. Chemical Reactions Under Ultrasound. Chem. Eng. Sci. 49 (1994): 5865-5873.
- G.O.H. Whillock, B.F. Harvey. Ultrasonically Enhanced Corrosion of 304L Stainless steel. Ultrason. Sonochem. 4 (1997): 33-38.
- H. Tamon, H. Ishizaka, T. Yamamoto, T. Suzuki. Influence of Freeze-Drying Conditions on the Mesoporosity of Organic Gels as Carbon Precursors. Carbon 38 (2000): 1099 - 1105.
- H. Tamon, H. Ishizaka, T. Yamamoto, T. Suzuki. Preparation of Mesoporous Carbon by Freeze Drying. Carbon 37 (1999): 2049 - 2055.
- H. Tamon, H. Ishizaka. Influence of Gelation Temperature and Catalyst on the Mesoporous Structure of Resorcinol-Formaldehyde Aerogels. J. of Colloid and Interface Sci. 223 (2000): 305-307.
- H. Tamon, S.R. Mukai, H. Nishihara, T. Yoshida, T. Yamamoto, . Microwave Drying for Preparation of Mesoporous Carbon . Adsorption Science and Technology. (2003): 99-103.
- H. Thompson, L. K. Doraiswamy. Sonochemistry: Science and Engineering. Ind. Eng. Chem. Res. 38 (1999): 1215-1249.
- H. Marsh, F.R. Reinoso. Science of Carbon Materials. 2000.
- Hiroto Nishihara, Shin R. Mukai and Hajime Tamon. Preparation of resorcinol-formaldehyde carbon cryogel microhoneycombs. Letter to the Editor / Carbon 42 (2004) : 899-901. J.A. Ritter , S.A. Al-Muhtasep. Preparation and Properties of

- Resorcinol-Formaldehyde Organic and Carbon Gels. Adv. Mater. 15, 2 (2003): 101-114.
- J.A. Ritter, C. Lin. Effect of Synthesis pH on the Structure of Carbon Xerogel. Carbon 35, 9 (1997): 1271-1278.
- J.L. Kasmitter, S.T. Mayer, R.W. Pekala. U.S. Patent 5 789 388, 1998.
- J.P. Lorimer, T.J. Mason. Sonochemistry: Part-1 The Physical Aspects. Chem. Soc. Rev. 16, 1 (1987): 239-274
- Kenzo Yokoseki, Shigeru Yamanaka, Koichi Takinami, Yoshio Hirose, Atsuo Tanaka, Kenji Sonomoto and Saburo Fukui. Application of immobilized lipase to regip-specific interesterification of triglyceride in organic solvent. Applied Microbiology and Biotechnology 14 (1982) : 1-5.
- K.J. Moulton, S. Koritara, E.N. Frankel. Ultrasonic Hydrogenation of Soybean Oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 60, 7 (1983): 1257-1258.
- K.J. Moulton, S. Koritara, K. Warner, E.N. Frankel. Continuous Ultrasonic Hydrogenation of Soybean Oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 64, 4 (1987): 542-547.
- K.S.W. Sing, S.J. Gregg. Adsorption Surface Area and Porosity. 2<sup>nd</sup> edition. New York: Academic Press, 1982.
- M. Gutierrez, A. Henglein, Chemical Action of Pulsed Ultrasound. J. Phys. Chem. 94, 9 (1990): 3625-3628.
- M.H. Entezari, P. Kruus, R. Otson. The Effect of Frequency on Sonochemical Reaction. Ultrason. Sonochem. 4 (1997): 49-54.
- Mohamed A. Abdel-Naby, A-M. S. Ismail, S. A. Ahmed and Ahmed F. Abdel Fattah. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus Mycoides*. Bioresource Technology 64 (1998) : 205-210.
- N. Ratoasinoro, F. Contamine, A.M. Wilhelm, J. Berlan, H. Delmas. Power Measurement in Sonochemistry. Ultrason. Sonochem. 2, 1 (1995): S43-S47.
- N. Tonanon, A. Siyasukh, W. Tanthapanichakoon, H. Nishihara, S.R. Mukai, H. Tamon. Improvement of Mesoporosity of Carbon Cryogels by Ultrasonic Irradiation. Carbon 43 (2005): 525-521.
- N. Tonanon, W. Tanthapanichakoon, T. Yamamoto, H. Nishimura, S.R. Mukai, H. Tamon. Influence of Surfactants on Porous Properties of Carbon Cryogels Prepared Sol-Gel Polycondensation of Resorcinol and Formaldehyde. Carbon 41 (2003): 2981-2990.



- N. Tonanon, W. Tanthapanichakoon, T. Yamamoto, H. Nishihara, S.R. Mukai and H. Tamon. Influence of surfactants on porous properties of carbon cryogels prepared by sol-gel polycondensation of resorcinol and formaldehyde. Carbon 41 (2003) : 2981-2990.
- N. Job, R. Pirard, J. Marien, J.P. Pirard. Porous Carbon Xerogels with Texture Tailored by pH Control during Sol-Gel Process. Carbon 42 (2004): 619-628.
- Pedro C. de Oliveira, Gizelda M. Alves and Heizir F. de Castro. Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. Biochemical Engineering Journal 5 (2000) : 63-71.
- R.W Pekala, J.C Faemer, C.T Alviso, T.D. Tran, S.T Mayer, J.M. Miller, B. Dunn. Carbon Aerogels for Electrochemical Applications. J. Non-Cryst. Solids. 225 (1998): 74-80.
- R.W. Pekala, C.T. Alviso, J.D. Lemay. In Chemical Processing of Advanced Materials. New York: John Wiley and Sons. 1992.
- R.W. Pekala. Organic Aerogels from the Polycondensation of Resorcinol with Formaldehyde. J. of Mat. Sci. 24 (1989): 3221-3227.
- R.W. Pekala. U.S. Patent 4 873 218. 1989.
- S. Bertho, O. Barbieri, F. Ehrbuger-Dolle, E. Geissler, P. Achard, F. Bley . J. Non-Cryst. Solids. 285 (2001): 154-162.
- S. Lowell, J.E. Shields. Powder Surface Area and Porosity. 2<sup>nd</sup> edition. New York: Chapman and Hall, 1984.
- Seema S. Betigeri and Steven H. Neau. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. Biomaterials 23 (2002) : 3627-3636.
- T. Yamamoto, S.R. Mukai, A. Endo, M. Nakaiwa and H. Tamon. Interpretation of Structure Formation during the Sol-gel Transition of a Resorcinol-Formaldehyde Solution by Population Balance. J. of Colloids Interface Sci. 264 (2003): 532-537.
- T. Yamamoto, T. Nishimura, T. Suzuki, H. Tamon. Control of Mesoporosity of Carbon Gels Prepared by Sol-gel Polycondensation and Freeze Drying. J. Non-Cryst Solids. 288 (2001): 46-55.
- T. Yamamoto, T. Yoshida, T. Suzuki, S.R Mukai, H. Tamon. Dynamic and Static Light Scattering on the Sol-gel Transition of Resorcinol-Formaldehyde Aqueous Solution. J. of Colloids Interface Sci. 245 (2002): 391-396.

T. Yamamoto, T. Sugimoto, T. Suzuki, S.R. Mukai and H. Tamon. Preparation and characterization of carbon cryogel microspheres. Carbon 40 (2002) : 1345-1351.

Takuji Yamamoto, Takashi Yoshida, Tetsuo Suzuki, Shin R. Mukai and Hajime Tamon.

Dynamic and static light scattering study on the sol-gel transition of resorcinol-formaldehyde aqueous solution. Journal of Colloid and Interface Science 245 (2002) : 391-396.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ก. ข้อมูลการทดลอง

ก.1 ผลไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ (Adsorption - Desorption Isotherm) ของไนโตรเจน ที่ 77 เคลวิน ของ RF carbon sonogel และ RF carbon gel

C/W =20 mol/m <sup>3</sup> , and R/C=200 mol/mol							
Power = 0				Power = 22			
Adsorption		Desorption		Adsorption		Desorption	
Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>
0.00	0.00	484.25	0.92	0.00	0.00	695.49	0.88
5.09	0.00	479.96	0.79	7.97	0.00	555.73	0.81
20.15	0.00	431.87	0.67	31.32	0.00	392.91	0.78
40.05	0.00	345.13	0.65	69.77	0.00	289.36	0.70
65.04	0.00	281.86	0.59	113.61	0.00	241.85	0.58
94.59	0.00	246.25	0.51	141.37	0.03	215.61	0.47
127.29	0.00	225.38	0.42	149.11	0.05	198.38	0.38
152.21	0.02	211.77	0.35	151.27	0.06	186.10	0.30
161.37	0.05	197.81	0.27	153.84	0.07	174.37	0.22
164.59	0.06	188.34	0.20	156.51	0.08	163.34	0.15
167.56	0.08	178.87	0.14	158.99	0.09	153.61	0.09
170.45	0.09	169.45	0.09	161.52	0.11		
171.91	0.10			169.36	0.15		
173.83	0.11			177.80	0.21		
180.97	0.15			187.24	0.27		
189.72	0.21			197.31	0.34		
198.77	0.26			207.68	0.40		
208.78	0.33			218.37	0.47		
218.73	0.39			230.08	0.53		
230.31	0.45			243.80	0.59		
243.00	0.52			260.31	0.66		
257.94	0.58			280.50	0.72		
275.63	0.64			305.14	0.77		
299.77	0.69			342.13	0.83		
มีต่อหน้าถัดไป							
C/W =20 mol/m <sup>3</sup> , R/C=200 mol/mol							
Power = 0				Power = 22			

Adsorption		Desorption		Adsorption		Desorption	
Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>
327.24	0.75			393.39	0.87		
368.00	0.79			464.58	0.90		
411.35	0.83			546.62	0.92		
463.00	0.87			650.22	0.94		
483.92	0.96			702.84	1.03		
508.17	1.03						

ตารางที่ ก.1 แสดงผลการการดูดซับ-คายซับ ใน โครเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF carbon sonogel และ RF carbon gel ที่มีค่า C/W เท่ากับ 20 mol/m<sup>3</sup>, R/C = 200 mol/mol

C/W = 40 mol/m <sup>3</sup> , R/C=200 mol/mol							
Power = 0				Power = 22			
Adsorption		Desorption		Adsorption		Desorption	
Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>
0.00	0.00	406.16	0.86	6.84	0.00	502.58	0.91
6.35	0.00	384.31	0.66	27.01	0.00	497.53	0.77
19.12	0.00	327.03	0.57	60.74	0.00	436.84	0.65
38.48	0.00	296.46	0.46	107.56	0.00	337.19	0.61
63.55	0.00	280.23	0.37	154.43	0.01	280.59	0.53
94.82	0.00	259.63	0.28	177.24	0.05	251.12	0.43
130.95	0.00	237.55	0.20	184.47	0.07	234.61	0.35
155.83	0.03	218.58	0.15	186.79	0.08	218.80	0.26
163.73	0.05	198.11	0.10	189.00	0.09	208.31	0.20
166.52	0.06			191.70	0.10	198.15	0.13
169.15	0.07			200.32	0.15	186.84	0.08
172.01	0.08			209.29	0.21		
175.28	0.10			218.41	0.27		
177.90	0.11			228.43	0.33		
มีค่อนน้ำถัดไป							
C/W = 40 mol/m <sup>3</sup> , R/C=200 mol/mol							
Power = 0				Power = 22			
Adsorption		Desorption		Adsorption		Desorption	
Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>

186.42	0.17			239.38	0.39		
195.98	0.23			249.93	0.45		
205.07	0.29			261.81	0.52		
215.63	0.36			276.60	0.58		
225.55	0.43			294.06	0.64		
236.15	0.50			319.12	0.69		
248.56	0.56			349.14	0.74		
262.20	0.63			395.80	0.79		
276.66	0.70			445.47	0.83		
296.28	0.76			490.83	0.87		
316.40	0.83			503.38	0.97		
348.08	0.88			549.45	1.01		
381.96	0.94						
413.91	1.01						

ตารางที่ ก.2 แสดงผลการการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF carbon sonogel และ RF carbon gel ที่มีค่า C/W เท่ากับ  $40 \text{ mol/m}^3$ , R/C = 200 mol/mol

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



C/W = 80 mol/m <sup>3</sup> , R/C = 200 mol/mol							
Power = 0				Power = 22			
Adsorption		Desorption		Adsorption		Desorption	
Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>
6.41	0.00	320.09	0.85	6.36	0.00	334.03	0.88
24.79	0.00	303.56	0.65	25.19	0.00	330.26	0.74
55.41	0.00	256.56	0.54	50.12	0.00	310.72	0.57
91.60	0.00	228.56	0.44	81.39	0.00	240.56	0.51
129.52	0.01	206.46	0.35	118.04	0.00	208.02	0.42
146.04	0.04	196.67	0.28	145.19	0.02	193.38	0.33
150.24	0.07	183.51	0.20	152.78	0.04	181.39	0.24
152.81	0.08	171.77	0.14	154.94	0.05	172.52	0.16
154.39	0.09	162.32	0.08	157.23	0.07	164.52	0.10
155.83	0.10			159.54	0.08	156.82	0.06
160.68	0.15			162.61	0.10		
165.25	0.21			163.75	0.11		
171.02	0.27			169.39	0.15		
175.49	0.34			176.01	0.21		
181.16	0.40			181.69	0.27		
185.25	0.47			188.97	0.33		
193.15	0.53			196.93	0.39		
198.47	0.59			203.94	0.46		
204.96	0.66			211.85	0.52		
214.99	0.72			222.60	0.58		
225.34	0.78			234.39	0.65		
241.49	0.83			251.02	0.70		
270.87	0.88			274.16	0.76		
303.76	0.93			304.71	0.81		
324.51	1.01			330.42	0.87		
				335.78	0.96		

ตารางที่ ก.3 แสดงผลการการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF carbon sonogel และ RF carbon gel ที่มีค่า C/W เท่ากับ 80 mol/m<sup>3</sup>, R/C = 200 mol/mol

C/W = 80 mol/m <sup>3</sup> , R/C = 100 mol/mol							
Power = 0				Power = 22			
Adsorption		Desorption		Adsorption		Desorption	
Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>
6.16	0.00	405.10	0.88	10.16	0.00	479.74	0.89
24.07	0.00	401.00	0.74	39.68	0.00	472.83	0.75
47.81	0.00	394.41	0.56	88.77	0.00	432.62	0.59
77.23	0.00	336.50	0.49	143.09	0.00	319.83	0.52
112.31	0.00	286.14	0.42	172.26	0.03	266.14	0.43
148.40	0.01	255.86	0.35	180.11	0.05	242.28	0.34
169.50	0.04	233.61	0.29	183.92	0.06	225.02	0.27
176.63	0.06	216.86	0.22	187.43	0.08	210.33	0.19
178.81	0.07	203.41	0.16	190.61	0.09	196.96	0.13
181.54	0.08	191.26	0.11	193.79	0.10	183.48	0.07
184.26	0.09	179.91	0.06	203.30	0.15		
195.39	0.15			226.23	0.27		
204.55	0.21			239.50	0.33		
214.53	0.26			252.56	0.40		
224.62	0.33			268.70	0.46		
236.98	0.39			285.50	0.52		
249.92	0.45			307.40	0.58		
265.89	0.51			334.24	0.64		
284.73	0.57			372.14	0.69		
307.41	0.62			416.37	0.75		
337.56	0.68			466.86	0.81		
365.07	0.74			481.53	0.90		
388.37	0.81			485.79	0.98		
397.95	0.89			546.06	1.01		
406.44	0.97						
433.38	1.01						

ตารางที่ ก.4 แสดงผลการการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF carbon sonogel และ RF carbon gel ที่มีค่า C/W เท่ากับ 80 mol/m<sup>3</sup>, R/C = 100 mol/mol

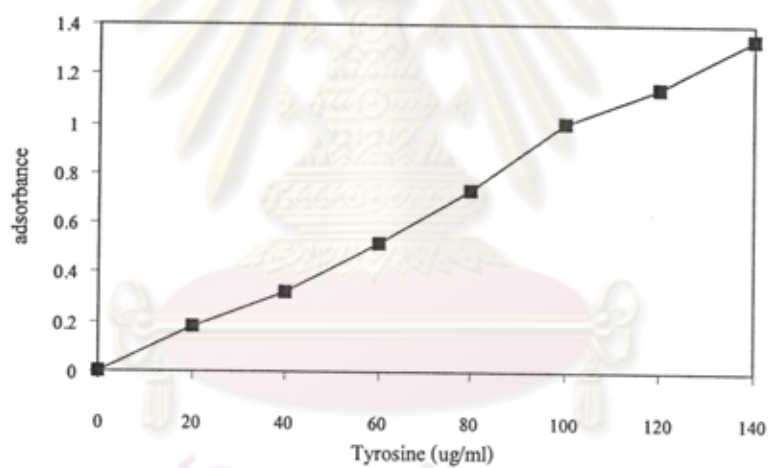
C/W = 80 mol/m <sup>3</sup> , R/C = 50 mol/mol							
Power = 0				Power = 22			
Adsorption		Desorption		Adsorption		Desorption	
Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>
0.00	0.00	6.47	0.88	0.00	0.00	5.30	0.87
0.15	0.01	3.69	0.68	0.16	0.01	2.34	0.67
0.11	0.02	2.08	0.52	0.10	0.02	0.49	0.52
0.10	0.03	1.17	0.40	0.05	0.03	-0.61	0.40
0.10	0.04	0.83	0.31	0.05	0.04	-1.14	0.30
0.11	0.06	0.58	0.22	0.04	0.06	-1.41	0.22
0.15	0.07	0.39	0.15	0.04	0.07	-1.59	0.14
0.22	0.08	0.27	0.08	0.05	0.08	-1.70	0.07
0.31	0.11			0.11	0.11		
0.39	0.17			0.09	0.17		
0.58	0.23			0.15	0.22		
0.78	0.29			0.36	0.29		
1.17	0.36			0.73	0.35		
1.47	0.41			0.84	0.41		
1.93	0.46			1.12	0.46		
2.57	0.51			1.41	0.50		
2.84	0.56			1.86	0.55		
3.14	0.62			2.35	0.60		
3.97	0.68			2.76	0.64		
4.66	0.74			3.00	0.69		
5.09	0.79			3.35	0.74		
5.55	0.85			4.72	0.81		
6.13	0.91			5.48	0.86		
7.45	0.97			5.76	0.91		
8.80	1.03			6.62	0.97		
				7.70	1.02		

ตารางที่ ก.5 แสดงผลการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF carbon sonogel และ RF carbon gel ที่มีค่า C/W เท่ากับ 80 mol/m<sup>3</sup>, R/C = 50 mol/mol



Tyrosine ( $\mu\text{g/l}$ )	Adsorbance
0	0.000
20	0.185
40	0.323
60	0.521
80	0.730
100	1.002
120	1.146
140	1.342

ตารางที่ ก.6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายที่มีความเข้มข้นของไทโรซีนต่างๆ



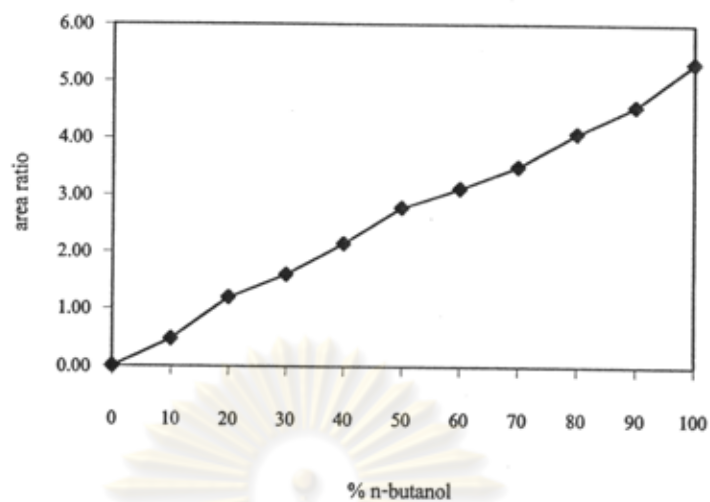
รูปที่ ก.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

% n-butanol	area ratio (butanol/heptane)
0	0.000
10	0.472
20	1.197
30	1.602
40	2.152
50	2.783
60	3.124
70	3.500
80	4.086
90	4.562
100	5.324

ตารางที่ ก.7 แสดงค่าอัตราส่วนพื้นที่ของโครมาโตกราฟีระหว่าง บิวทานอลกับเฮปเทน  
กับความเข้มข้นของบิวทานอลค่าต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

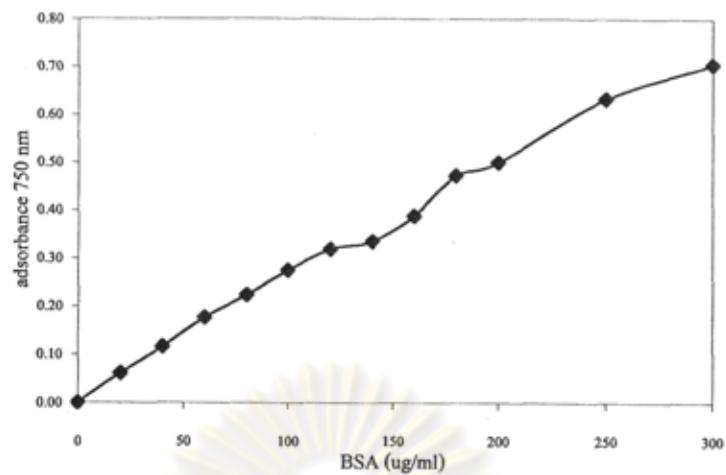


รูปที่ ก.2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายบีวทานอล

BSA ( $\mu\text{g/ml}$ )	adsorbance
20	0.061
40	0.115
60	0.176
80	0.223
100	0.275
120	0.319
140	0.329
160	0.388
180	0.483
200	0.500
250	0.633
300	0.705

ตารางที่ ก.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นค่าต่างๆ





รูปที่ ก.3 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA

Adsorption		Adsorption		Desorption	
Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>
4.92	0.000	195.59	0.392	604.2	0.891
19.57	0.000	203.64	0.455	532.2	0.865
43.88	0.000	212.15	0.518	456.8	0.849
77.96	0.000	221.68	0.579	349.6	0.813
115.85	0.002	233.12	0.636	270.3	0.739
143.03	0.027	246.98	0.694	228.7	0.627
151.76	0.058	265.03	0.751	207.4	0.507
154.78	0.073	290.22	0.801	193.8	0.407
156.41	0.081	327.4	0.840	184.0	0.325
158.43	0.091	373.11	0.872	174.6	0.242
160.33	0.103	430.89	0.892	166.4	0.172
166.58	0.149	498.54	0.911	159.2	0.114
173.24	0.204	579.09	0.926	151.1	0.063
180.44	0.264	629.42	1.005		

ตารางที่ ก.9 ผลไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ (Adsorption-Desorption Isotherm) ของไนโตรเจนที่ 77 เคลวิน ของ RF-NS Carbon

Adsorption		Adsorption		Desorption	
Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>
5.25	0.000	184.37	0.399	255.7	0.892
20.8	0.000	188.57	0.463	246.0	0.77
46.61	0.000	193.19	0.527	221.7	0.621
82.58	0.000	198.41	0.588	201.5	0.502
128.17	0.001	205.16	0.650	186.1	0.404
154.24	0.031	213.21	0.712	180.4	0.318
160.32	0.065	223.84	0.772	175.1	0.231
162.14	0.078	237.17	0.829	170.5	0.159
163.08	0.085	250.94	0.890	165.7	0.098
164.22	0.095	258.13	0.963		
165.43	0.106	284.25	1.002		
169.01	0.153				
172.86	0.211				
176.62	0.273				
180.46	0.336				

ตารางที่ ก.10 ผลไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ (Adsorption-Desorption Isotherm) ของไนโตรเจนที่ 77 เคลวิน  
ของ RF-CS Carbon

เวลาในการตรึง (hr)	ปริมาณ โปรตีนที่ตรึงได้ ( $\mu\text{g}$ )		เปอร์เซ็นต์เอนไซม์ที่ตรึงได้ (%)	
	RF-CS	RF-NS	RF-CS	RF-NS
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1	140.60	7.71	8.28	0.45
2	88.90	951.78	5.24	56.07
3	211.60	1000.84	12.47	58.96
4	234.51	1181.22	13.82	69.59
5	231.74	1345.40	13.65	79.26
6	228.77	1347.23	13.48	79.37
7	320.54	1314.31	18.88	77.43
8	342.55	1324.00	20.18	78.00
9	296.93	1223.40	17.49	72.08
10	220.79	1294.27	13.01	76.25

ตารางที่ ก.11 แสดงปริมาณ โปรตีน(แอลคาไลน์โปรติเอส)ที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอนที่  
เวลาการตรึงต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



เวลาในการตรึง (hr)	Activity (unit)	เวลาในการตรึง (hr)	Activity (unit)
0	50.824	6	47.142
1	50.135	7	47.135
2	49.872	8	46.202
3	49.934	9	45.523
4	47.253	10	44.821
5	47.224		

ตารางที่ ก.12 แสดงกิจกรรมที่เปลี่ยนไปของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสตีเอส เมื่อทำการทดสอบที่สภาวะเดียวกับการตรึงที่เวลาต่างๆ

ความเข้มข้นเอนไซม์ (%)	ปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้ ( $\mu\text{g protein/ g support}$ )
10	431.422
30	673.521
50	702.896

ตารางที่ ก.13 แสดงปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้บน RF-NS คาร์บอนที่ค่าความเข้มข้นเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสค่าต่างๆ

เวลาในการเร่งปฏิกิริยา (min)	ปริมาณ Tyrosin ที่ผลิตได้ ( $\mu\text{g}$ )
0	66.235
1	115.369
2	170.705
3	280.001
4	345.996
5	382.141

ตารางที่ ก.14 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ

time	Tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	60.524	227.177	274.245	300.523	333.558
5	379.487	420.565	388.426	400.556	397.314
20	385.598	433.514	400.002	410.211	422.226

ตารางที่ ก.15 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

time	Tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	80.761	50.884	49.598	45.213	36.176
5	118.965	63.863	57.884	50.259	40.021
20	133.353	73.537	60.259	58.612	43.638

ตารางที่ ก.16 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิบัติการต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน

time	Tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	57.741	54.924	48.251	43.277	37.564
5	75.190	69.741	57.741	50.264	44.230
20	107.149	78.557	63.312	57.283	50.645

ตารางที่ ก.17 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิบัติการต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน

time	Tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	45.236	45.269	44.647	44.523	40.987
5	53.189	52.114	50.838	50.123	45.114
20	58.663	56.483	56.921	54.244	49.556

ตารางที่ ก.18 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิบัติการต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ตรึงด้วย RF-NS เจล



Enzyme	run1(%)	run2(%)	run3(%)	run4(%)	run5(%)
Physical adsorbed on RF-CS carbon	100.00	33.97	21.69	13.21	10.06
Physical adsorbed on RF-NS carbon	100.00	84.92	54.39	40.04	38.20
Gel entrapped with RF-NS gel	100.00	86.07	77.84	70.41	51.89
Natural enzyme	100.00	60.63	35.80	31.35	19.99

ตารางที่ ก.19 แสดงค่า retention activity จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และแอลคาไลน์โปรติเอสครึ่งรูป

weeks	natural enzyme (unit)		adsorbed on RF-CS carbon (unit)		adsorbed on RF-NS carbon (unit)		entrapped with RF-NS gel (unit)	
	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom
0	48.742	48.742	23.814	23.814	15.921	15.921	9.635	9.635
1	46.431	38.891	23.366	21.482	15.800	15.039	9.544	9.214
2	42.236	30.265	23.019	19.316	15.542	13.878	9.510	8.446
3	36.994	26.145	22.238	17.632	15.305	12.783	8.973	7.268
4	31.234	18.546	21.259	15.536	15.017	12.189	8.984	7.342

ตารางที่ ก.20 แสดงค่ากิจกรรม (unit activity) ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และแอลคาไลน์โปรติเอสครึ่งรูป ภายหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

weeks	natural enzyme (%)		adsorbed on RF-CS carbon (%)		adsorbed on RF-NS carbon (%)		entrapped with RF-NS gel (%)	
	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	95.26	79.79	98.12	90.21	99.24	94.46	99.06	95.63
2	86.65	62.09	96.66	81.11	97.62	87.17	98.70	87.66
3	75.90	53.64	93.38	74.04	96.13	80.29	93.13	75.43
4	64.08	38.05	89.27	65.24	94.32	76.56	93.24	76.20

ตารางที่ ก.21 แสดงผลการคำนวณ retention activity ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และแอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป ภายหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

เวลาในการตรึง (hr)	ปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้ (mg)		เปอร์เซ็นต์เอนไซม์ที่ตรึงได้ (%)	
	RF-CS	RF-NS	RF-CS	RF-NS
2	4.321	8.327	18.51	35.67
5	7.111	13.122	30.46	56.21
10	8.236	11.764	35.28	50.62

ตารางที่ ก.22 แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส)ที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอนที่เวลาการตรึงต่างๆ

ปริมาณเอนไซม์ (g)	ปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้ (mg protein)
0.5	13.122
1.0	29.527
1.5	45.607
2.0	49.818

ตารางที่ ก.23 แสดงปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้บน RF-NS คาร์บอนที่ปริมาณเอนไซม์ไลเปสค่าต่างๆ

เวลาในการเร่งปฏิกิริยา (min)	ปริมาณ n-butanol ที่ใช้ไป (mmol/ml)
0	23.298
5	136.425
10	150.103
15	164.147
20	161.236
25	168.339
30	173.445
60	170.327
120	167.023
180	179.130

ตารางที่ ก.24 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ใช้ไปที่เวลาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

time (min)	butanol consumed (mmol/ml)				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	23.298	27.235	29.315	23.178	26.532
5	136.425	94.456	82.536	60.178	60.124
10	150.103	105.771	88.634	70.542	66.877
15	164.147	105.163	87.452	73.456	69.323
20	161.236	110.023	94.238	78.124	72.145

ตารางที่ ก.25 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ



time (min)	butanol consumed (mmol/ml)				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	20.145	24.635	25.771	25.349	22.168
5	109.691	60.561	53.548	52.625	45.235
10	124.714	68.145	59.456	60.143	58.789
15	126.356	80.111	66.142	65.377	62.134
20	140.254	83.457	75.802	76.142	70.045

ตารางที่ ก.26 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปเป็นเวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของ เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน

time (min)	butanol consumed (mmol/ml)				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	23.645	20.144	21.788	24.175	19.117
5	149.205	137.929	141.934	114.632	97.259
10	157.456	140.006	146.657	120.235	96.532
15	162.147	145.970	150.032	127.789	102.456
20	170.403	143.021	148.780	130.013	111.156

ตารางที่ ก.27 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปเป็นเวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของ เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

time (min)	butanol consumed (mmol/ml)				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	20.145	27.235	29.315	23.178	26.532
5	104.561	103.218	102.510	82.278	76.878
10	127.477	106.405	101.659	86.479	80.124
15	135.052	110.234	108.878	87.493	81.068
20	144.423	111.478	106.456	90.364	84.697

ตารางที่ ก.28 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปเป็นเวลาต่างๆ และรอบปฏิบัติการต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของ เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วย RF-NS เจล

Enzyme	run1(%)	run2(%)	run3(%)	run4(%)	run5(%)
Physical adsorbed on RF-CS carbon	100.00	40.12	31.02	30.46	25.76
Physical adsorbed on RF-NS carbon	100.00	93.81	95.69	72.04	62.23
Gel entrapped with RF-NS gel	100.00	90.01	87.56	70.01	59.64
Natural enzyme	100.00	59.42	47.05	32.71	29.69

ตารางที่ ก.29 แสดงค่า retention activity จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และไลเปสตรึงรูป

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

weeks	natural enzyme (unit)		adsorbed on RF-CS carbon (unit)		adsorbed on RF-NS carbon (unit)		entraped with RF-NS gel (unit)	
	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom
	0	210.805	210.805	283.786	283.786	278.666	278.666	507.897
1	205.978	165.060	269.682	266.276	274.263	265.895	494.976	484.788
2	189.561	87.036	250.939	227.666	260.934	247.335	478.889	436.018
3	153.620	35.598	226.156	181.359	251.671	222.997	452.119	351.082
4	108.564	11.751	193.183	122.853	234.104	192.973	429.694	273.879

ตารางที่ ก.30 แสดงค่ากิจกรรม (unit activity) ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และ ไลเปสตรึงรูป ภายหลังจากเก็บรักษา  
ที่อุณหภูมิต่างๆ

weeks	natural enzyme (%)		adsorbed on RF-CS carbon (%)		adsorbed on RF-NS carbon (%)		entraped with RF-NS gel (%)	
	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom
	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	97.71	78.30	95.03	93.83	98.42	95.42	97.46	95.45
2	92.03	52.73	93.05	85.50	95.14	93.02	96.75	89.94
3	81.04	40.90	90.12	79.66	96.45	90.16	94.41	80.52
4	70.67	33.01	85.42	67.74	93.02	86.54	95.04	78.01

ตารางที่ ก.31 แสดงผลการคำนวณ retention activity ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และ ไลเปสตรึงรูป ภาย  
หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ