17/9/56

SUT3-304-54-24-02

รายงานการวิจัย

การผลิตเม็ดเจลนาโนชนิดไบโอพอลิเมอร์/ไฮดรอกซีอะพาไทท์ เพื่อการตรึงเอนไซม์

(Production of biopolymer/hydroxyapatite nanocomposite beads for enzyme immobilization)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รายงานการวิจัย

การผลิตเม็ดเจลนาโนชนิดไบโอพอลิเมอร์/ไฮดรอกซีอะพาไทท์ เพื่อการตรึงเอนไซม์

(Production of biopolymer/hydroxyapatite nanocomposite beads for enzyme immobilization)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย วนภู

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กุมภาพันธ์ 2556

กิตติกรรมประกาศ

กระผมขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุนทุนวิจัย ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2554-2555 รวมถึงได้ให้การสนับสนุนด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ บุคลากรและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย ซึ่งทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รศ.ดร. โชคชัย วนภู

บทคัดย่อ

แคลเซียมอัลจิเนทไฮดรอกซิอะพาไทท์และยางพาราเป็นวัตถุดิบที่มีการนำไปใช้อย่างแพร่หลาย ทั้งในการประยุกต์เพื่อการตรึงเอนไซม์และเพื่อชะลอหรือเพื่อควบคุมการปลดปล่อยของตัวยา โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการผสมแคลเซียมอัลจิเนทเข้ากับไฮดรอกซีอะพาไทท์ซึ่งเตรียมได้จากส่วนผสมทางเคมีแบบเปียกและน้ำยางพารา ทำการแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือ แคลเซียมอัลจิเนท/ยางพารา และแคลเซียมอัลจิเนท/ไฮดรอกซีอะพาไทท์/ยางพารา โดยทำการแปรผันปริมาณของน้ำยางพารา ออกเป็น 5 ระดับได้แก่ 2.5%, 5%, 10%, 15% และ 20% จากการทดลองการเตรียมเม็ดเจลนาโนพบว่า ปริมาณน้ำยางพาราที่ไม่สามารถใช้ได้คือที่สัดส่วนปริมาตร 15% และ 20% เพราะจะทำให้เม็ดเจลนาโนที่ได้ลอยน้ำ

จากการทดสอบหาค่าความหนืดของสารละลายผสมทั้งหมดก่อนที่จะทำการขึ้นรูปเม็ดเจลนาโน พบว่า เมื่ออุณหภูมิของสารละลายผสมเพิ่มขึ้น ความหนืดของสารละลายจะลดลง จากนั้นได้ทำการทดสอบค่าความแข็งแรงและค่าความคงตัวของเม็ดเจลนาโน ผลปรากฏว่าการที่ผสมยางพาราลงไป 10% มีผลทำให้เม็ดเจลนาโนของทั้ง 2 กลุ่ม มีค่าสูงที่สุด หลังจากนั้นทำการทดสอบค่าการดูดซับน้ำ พบว่าเมื่อมีการผสมยางพาราลงไป ค่าการดูดซับน้ำของตัวอย่างลดลงตามสัดส่วนของยางพาราที่เพิ่มขึ้น โดยค่าการดูดซับน้ำลดลงมากที่สุดที่ปริมาณของยางพาราเท่ากับ 10% ทั้งนี้เนื่องมาจากยางพาราดูดซึมน้ำได้น้อยมาก ซึ่งไปขัดขวางการดูดซับน้ำของเม็ดเจลนาโน และจากการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และแบบส่องผ่านพบว่า เนื้อของยางพาราและแคลเซียมอัลจิเนทเข้ากันได้ดี แต่ไฮดรอกซีอะพาไทท์นั้นมีลักษณะเป็นแท่งคริสตัลอยู่ทั่วบริเวณ ซึ่งการผสมกันของสารดังกล่าวได้ถูกนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FT-IR) เพื่อยืนยันการผสมกันจากการเปลี่ยนแปลงของพันธะเคมี ซึ่งพบว่าพันธะเคมีของยางพารามีการเปลี่ยนแปลงโดยมีลักษณะการย้ายตำแหน่ง

การทดสอบการตรึงเอนไซม์ พบว่าในการเปลี่ยนแปลงปริมาณยางพาราและอุณหภูมิ(40 และ 50 องศาเซลเซียส) ในระหว่างการขึ้นรูปเม็ดเจลนาโนนั้น ที่ปริมาณยางพาราและอุณหภูมิสูงพบว่าแทบจะไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้น นั้นเป็นเพราะเมื่อยางพาราได้รับอุณหภูมิสูง ในขณะขึ้นรูปจะมีผลทำให้ยางพาราเกิดการขยายหรือพองตัวจนไปปิดรูพรุนภายในโครงสร้างของเม็ดเจลบีดจนหมด และทำให้ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นซึ่งกรณีดังกล่าวกลับไม่พบในเมื่อมีการเติมไฮดรอกซิอะพาไทท์ลงไป ซึ่งสารดังกล่าวจะไปทำหน้าที่ในการขัดขวางการปิดกั้นรูพรุนของยางพารา ผลการศึกษาอาจกล่าวสรุปได้ว่าเม็ดเจลนาโนที่มีส่วนผสมของอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์และยางพารา มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการตรึงเอนไซม์เพื่อที่จะนำกลับมาใช้ใหม่เพราะสามารถคงประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้มากกว่า 50% เมื่อผ่านการใช้งาน 8 ครั้ง

คำสำคัญ ไบโอพอลิเมอร์, ไฮดรอกซีอะพาไทท์, อัลจิเนท, เม็ดเจลนาโน

Abstract

Calcium alginate (CA) is applied to enzyme immobilization for prolonging enzymatic activity. In this study CA composite with hydroxyapatite (HA) was prepared by using a wet chemical method and then mixed with various Latex (LX) concentrations into groups of CA/LX and CA/HA/LX in various LX concentrations. LX solutions at 2.5%, 5%, 10%, 15% and 20% were used and it was found that between 15% and 20% of their beads were floating. Thus 2.5-10% LX with CA and CA/HA were used for the entire experiment. At the gel forming stage, all solutions showed decreased viscosity when the temperature was increased.

The viscosity results of mixture before forming to gel bead showed that as temperature increase the viscosity mixture was decrease. The results of a texture profile showed that both the strength and stability of the bead structure at 10% LX addition from each group of CA/LX and CA/HA/LX were higher than the control group. Bead swelling of 10% LX decreased because the LX's hydrophobic character obstructed the swelling of defective CA/LX and CA/HA/LX beads. Moreover, pH and temperature had an affect on the swelling of the beads. The morphology of all the groups was studied by SEM and TEM and it was found that the LX material was homogeneous in CA and CA/HA, and that the HA in CA/LX resulted in crystallization. The material was proved by the result of FT-IR analysis when it was found that the CA/LX and CA/HA/LX had changed the wave number at 1325-1380 cm^{-1} which was the character's bands of CH_2 from LX. The bands shifted towards a higher number of waves in the composite beads.

Immobilized enzyme was tested. It was found that the variation of LX most important result of the enzyme immobilization experiment was shown in the high concentration of LX at 40°C and 50°C at the gel forming stage. The LX in CA/LX was inflated and blocked the flow of the substrate. However, this did not occur in CA/HA/LX. It is possible that the HA in CA/HA/LX bead expanded the pores inside the beads, whereas the LX expansion was inadequate to seal the expanded pores. The results of reused immobilized beads showed no difference in the relative activity of each beads type but the suitable is CA/HA/LX because it can still relative activity of enzyme more than 50% after 8 cycles reused.

Keywords biopolymer, hydroxyapatite, alginate, nanobeads

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค

บทที่ 1 บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย..... 7

ขอบเขตของโครงการวิจัย..... 7

บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 8

วัสดุและสารเคมี..... 8

การเตรียมเม็ดเจลนาโน..... 9

การทดสอบและวิเคราะห์คุณสมบัติของเม็ดเจลนาโน..... 10-12

ทดสอบการการตรึงเอนไซม์อินเวอร์เทส..... 12

บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 13

ผลของการวิเคราะห์คุณสมบัติของเม็ดเจลนาโน..... 13-25

ผลการทดสอบทดสอบการการตรึงเอนไซม์อินเวอร์เทส..... 26-29

บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 30-31

เอกสารอ้างอิง..... 32-34

ประวัติผู้วิจัย..... 35-43

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	อัตราส่วนผสมของเจลแต่ละชนิดและปริมาณยางพารา.....	13

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูปภาพ

	รูป	หน้า
1	แสดงลักษณะโครงสร้างอัลจิเนทและองค์ประกอบ.....	2
2	ภาพถ่ายจากกล้อง SEM แสดงโครงสร้างของเม็ดเจลอัลจิเนท ……..	4
3	ลักษณะของเม็ดเจลนาโนที่เตรียมโดยเพิ่มความเข้มข้นของยางพาราที่ 0, 2.5, 5, 10, 15 และ 20%.....	14
4	กราฟแสดงค่าความหนืดของสารละลายโซเดียมอัลจิเนทที่อุณหภูมิและปริมาณน้ำยางพาราที่ต่างกัน.....	16
5.	กราฟแสดงค่าความต้านทานแรงบีบอัดเม็ดเจลแต่ละชนิด……	18
6.	กราฟแสดงปริมาณการคงเหลือของเม็ดเจลในอัตราส่วนต่างๆ โดยในถังหมัก…….	19
7.	กราฟแสดงค่าความดูดซึมน้ำกลับของเม็ดเจลชนิดต่างๆที่มีปริมานยางพาราที่ต่างกัน.....	20
8.	รูปแสดงลักษณะของพื้นผิวเม็ดเจลนาโน……	21
9.	รูปแสดงลักษณะพื้นผิวของแคลเซียมอัลจิเนทที่เติมยางพารา.....	22
10.	รูปแสดงลักษณะพื้นผิวของแคลเซียมอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่เติมยางพารา……	23
11.	รูปแสดงลักษณะพื้นผิวของแคลเซียมอัลจิเนท, ไฮดรอกซีอะพาไทท์และยางพาราที่ได้จากการถ่ายภาพด้วย TEM ……..	24
12.	กราฟที่ได้จากการทดสอบ Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy…….	25
13.	กราฟระยะเวลาการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ถูกตรึงในอัลจิเนทและยางพารา……...	27
14.	กราฟระยะเวลาการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ถูกตรึงในอัลจิเนท ไฮดรอกซีอะพาไทท์และยางพารา…….	28
15.	กราฟกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ถูกตรึงในเม็ดเจลนาโนแต่ละชนิด…….	29

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

พอลิเมอร์เป็นโมเลกุลชนิดพิเศษมีขนาดใหญ่ประกอบด้วยโมเลกุลย่อยๆ ต่อเรียงกัน ถ้าโมเลกุลย่อยเป็นชนิดเดียวกันจะเรียกพอลิเมอร์นี้ว่า"โฮโมพอลิเมอร์(homopolymer)" และถ้าโมเลกุลย่อยเป็นต่างชนิดกันจะเรียกพอลิเมอร์นี้ว่า "เฮตเทอโรพอลิเมอร์(heteropolymer)"พอลีเมอร์สามารถจำแนกตามองค์ประกอบได้ดังนี้

1. พอลิเมอร์ประเภทสารอินทรีย์ได้แก่ พอลีเอทไทลีน (polyethylene) พอลิโพรไพลีน (polypropylene) เฟลกซิกลาซส์ (Plexiglass) ฯลฯ
2. พอลิเมอร์ประเภทสารอนินทรีย์ได้แก่ ซิลิโคน (silicone)
3. พอลิเมอร์ชีวภาพ ได้แก่ ไบโอพอลิเมอร์ (biopolymers) โปรตีน (proteins) นิวคลิอิกแอซิก (nucleic acids) และพอลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ฯลฯ

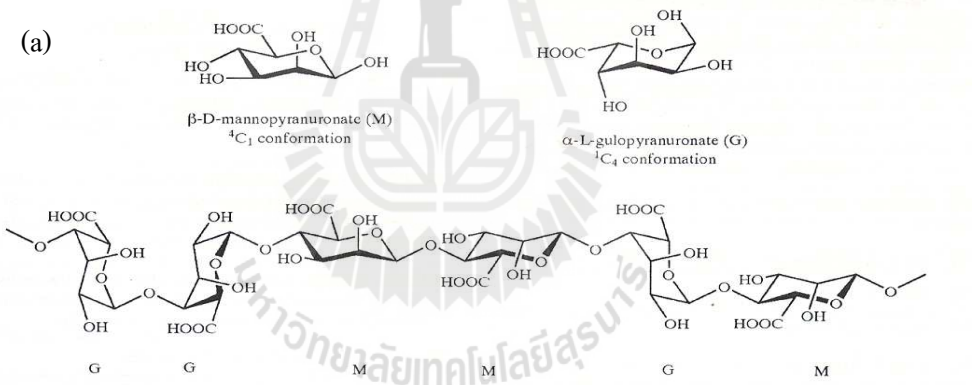
อัลจิเนท (alginate) เป็นพอลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ประกอบไปด้วยน้ำตาล 2 โมเลกุล คือ mannuronic acid (M) และ guluronic acid (G) ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ β-1,4 D-mannuronic acid และ α-1, 4 C-5 epimer α-L-guluronic acid โดยสามารถสกัดได้จากพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่บริเวณผนังเซลล์ของสาหร่ายทะเล (seaweed) เช่น *Laminaria digitata, L. hyperborean* และ *Macrocystis pyrifera* หรือ สาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) เช่น *Phaeophyceae* sp. โดยทั่วไปการผลิตอัลจิเนทเป็นอุตสาหกรรมสาหร่ายทะเลที่ใช้ ได้แก่ *M. pyrifera* มีอัลจิเนทประมาณ 14-19 %, *L. cloustoni* และ *L. digitata* มีอัลจิเนทประมาณ 15-40% ปริมาณที่พบจะขึ้นกับชนิดของสาหร่าย ฤดูกาล และแหล่งที่สาหร่ายเจริญเติบโต สาหร่ายเหล่านี้พบได้ทั่วๆไปในโลก ประเทศที่ผลิตอัลจิเนทมาก คือ อเมริกา อังกฤษ ฝรั่งเศส สเปน นอร์เวย์ แคนนาดา และญี่ปุ่น อัลจิเนทยังสามารถสกัดได้จากทั้งสาหร่ายและแบคทีเรียดิน เช่น *Azotobacter vinelandii* และ *A. crococcum* และหลายสปีชีส์ของ *Pseudomonas* อัลจิเนทที่ได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมาย อาทิ เป็นอาหาร เป็นเครื่องปรุงยาสีฟัน เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่นใช้เป็นไฮโดรเจล (hydrogel) เป็นสารแขวนลอย

อีเล็คโตรไลท์ สารเพิ่มความหนืด ซึ่งเจลอัลจิเนทมีความปลอดภัยสูงและเป็นที่ยอมรับกันในวงการอาหารและยาทั่วโลก (Amiji, 1999)

โครงสร้างอัลจิเนทประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลประเภท uronic acids 2 ชนิด คือ mannuronic acid (M) และ guluronic acid (G) ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ β-1,4 D-mannuronic acid และ α-1, 4 C-5 epimer α-L-guluronic acid ตามรูปที่ 1 จำนวนระหว่าง 50 ถึง 200,000 หน่วย

สายพอลิเมอร์อัลจิเนทจะเป็น heteropolymer ที่มีหน่วยย่อย (block) วางเรียงแตกต่างกันไป แต่ละหน่วยย่อยอาจมีโมเลกุลน้ำตาลวางเรียงตัวกัน 3-30 หน่วย หน่วยย่อยใดที่มี mannuronic acid จะเรียกว่า M-blocks หน่วยย่อยใดเป็น guluronic acid จะเรียกว่า G-blocks และอาจมีการผสมกันระหว่าง mannuronic acid และguluronic acid ก็จะเรียกว่า MG-blocks หรือการสลับกัน ตามรูปที่ 1a-1b

(a)



(b)

MMMMMMMGGGGGGGGMGMGMGMGMGGGGGGGG

M-block G-block MG-block G-block

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างหน่วยย่อยของน้ำตาลประเภท uronic acids 2 ชนิดและการจัดเรียงสายพอลีเมอร์(a), และ (b) แสดงแบบแผนการเรียงตัวของโครงสร้างอัลจิเนท

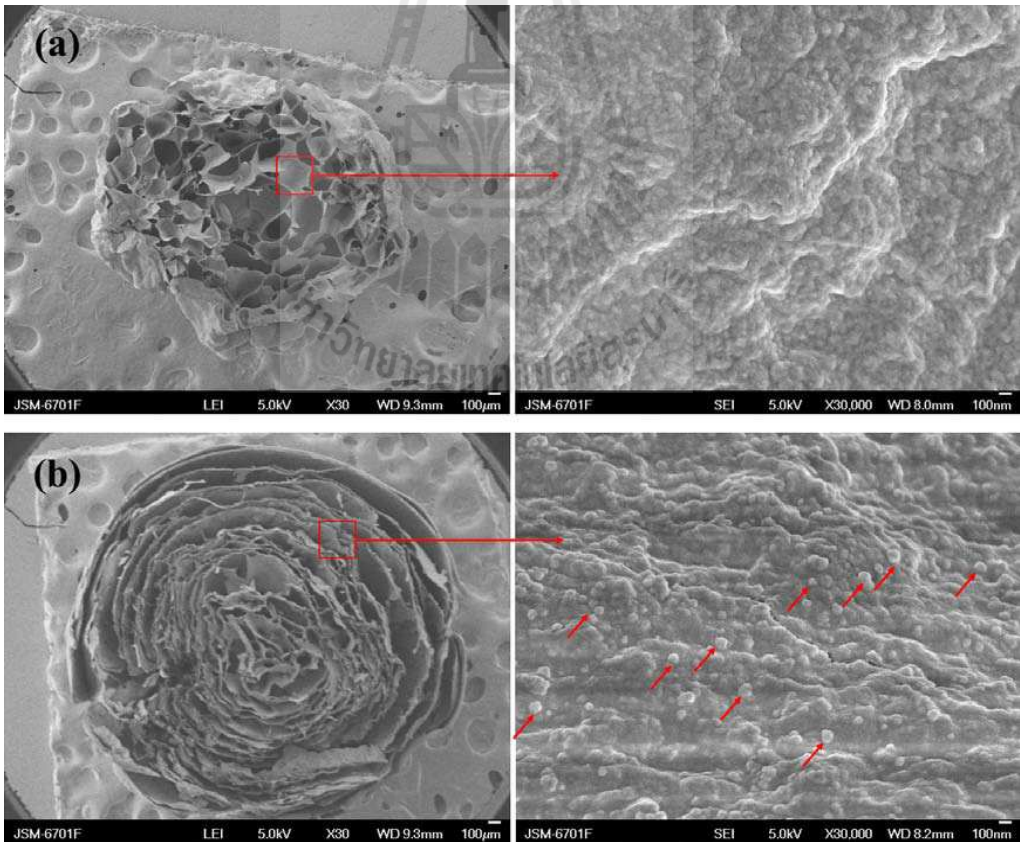
การเรียงตัวของน้ำตาลในแต่ละหน่วยย่อยจะขึ้นกับประเภทของสาหร่าย อายุ และชิ้นส่วนของสาหร่าย อาทิ ก้านสาหร่ายจะมี guluronic acid มากกว่าในใบค่อนข้างมาก หากอายุของสาหร่ายมากขึ้นปริมาณของ guluronic acid ก็จะเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังขึ้นกับสภาพแวดล้อมของน้ำเป็นอย่างมาก พบว่าในฤดูร้อนสาหร่ายจะผลิตอัลจิเนทที่มี mannuronic acid เพิ่มมากขึ้น (Hjelland, 2005)

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมทางการเกษตรมีการใช้เอนไซม์มากขึ้น มีการใช้เอนไซม์ตรึงร่วมกันกับอัลจิเนทและจากการทดลองวิจัยผลิตอัลจิเนทจะเชื้อจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับอัลจิเนทที่จำหน่ายในท้องตลาด พบว่าอายุของเม็ดเจลอัลจิเนทที่ใช้ตรึงเอนไซม์ค่อนข้างสั้น เม็ดเจลแตกง่าย มีความเสถียรต่ำ ใช้ได้ไม่กี่ครั้งก็เสียสภาพ มีการแพร่ของเอนไซม์ออกจากเม็ดเจลเร็วเกินไป อีกทั้งความแข็งแรงของเม็ดเจลยังไม่เพียงพอ

ดังนั้น การพัฒนาความสามารถการตรึงเอนไซม์ด้วยเม็ดเจลอัลจิเนทให้ทนทานมากยิ่งขึ้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ นักวิจัยหลายคนได้พุ่งเป้าการพัฒนาคุณภาพดังกล่าวโดยใช้สารพอลีเมอร์อื่นๆ ร่วมกับอัลจิเนท พบว่าไฮดรอกซีอะพาไทท์ (hydroxyapatite) $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ เป็นสารที่น่าจะนำมาใช้ได้ โดยไฮดรอกซีอะพาไทท์ เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างหลักของกระดูกและฟันซึ่งมีความน่าสนใจในการนำไปใช้อย่างยิ่ง เพราะสามารถหาได้ง่ายและมีจำนวนมาก (Sivakumar, 2002) และยังสามารถสังเคราะห์ได้อีกด้วยโดย ไฮดรอกซีอะพาไทท์ ที่สังเคราะห์จาก $(NH_4)_2HPO_4$ และ $Ca(NO_3)_24H_2O$ นั้นจะมีความคล้ายคลึงกันกับ ไฮดรอกซีอะพาไทท์ ที่อยู่ในกระดูกและเนื้อเยื่อโครงสร้างต่างๆในร่างกายมาก (Descamps et al., 2009) ซึ่งการที่ไฮดรอกซีอะพาไทท์ มีลักษณะโครงสร้างที่ตาข่ายรูพรุน จึงทำให้เป็นที่สนใจในการนำไปพัฒนาใช้ในการผลิตวัสดุทางชีวภาพ ซึ่งได้มีรายงานการนำไฮดรอกซีอะพาไทท์ ไปใช้เป็นจำนวนมากโดยส่วนมากจะนำไปผสมรวมกันโพลิเมอร์ชนิดอื่นๆ (Bigi et al., 2009) เพื่อให้ได้คุณสมบัติตามต้องการ ดังนั้นการใช้ไฮดรอกซีอะพาไทท์ นำมาเป็นแนวนความคิดหลักในการทำให้เกิดโครงร่างตาข่ายเพื่อใช้ในการชะลอการแพร่ของยา เพราะว่าไฮดรอกซีอะพาไทท์ มีคุณสมบัติทั้งในแง่ของการเป็นตัวดูดซับที่ดีร่วมไปจนถึงมีความหลากหลายของโครงสร้างและยังมีความสามารถของการรวมตัวกันกับสารพอลิเมอร์ชนิดอื่นได้ดีอีกด้วย ซึ่งการนำเอาไฮดรอกซีอะพาไทท์ มาผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นนั้นทำให้เกิดความเป็นไปได้ของการชะลอการแพร่

ของยา ซึ่งความสามารถในการแพร่นั้นจะขึ้นอยู่กับปรับระดับปริมาณของไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่ในผสมในพอลิเมอร์นั้นๆ (Zhang et al., 2009)

โดยทั่วไปการผสมกันระหว่างพอลิเมอร์และไฮดรอกซีอะพาไทท์ นั้น จะเกิดจาก 2 ขบวนการหลักๆ โดยอันดับแรก จะมีการจับกันของอนุภาคไฮดรอกซีอะพาไทท์ เกิดขึ้นแล้วเกิดเป็นโครงสร้างระดับไมโคร หลังจากนั้นจึงมีการนำเข้าไปในตัวของวัสดุชีวภาพในสภาวะที่มีความเหมาะสม ซึ่งการสร้างไฮดรอกซีอะพาไทท์ ในวัสดุชีวภาพนั้นอาจเกิดขึ้นในระดับนาโน (Shinichi et al., 2004) โดยการเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคไฮดรอกซีอะพาไทท์ จะมีลักษณะคล้ายกับอนุภาคดินที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ดังนั้นแนวความคิดที่ว่าการผลิตวัสดุชีวภาพร่วมกันกับไฮดรอกซีอะพาไทท์ ในระดับโมเลกุลระดับนาโนนั้นจึงมีความเป็นไปได้ และสามารถพัฒนาต่อยอดแนวความคิดนี้ไปใช้ในการชะลอการแพร่ของเอนไซม์ในเม็ดเจลเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไปได้ โดยลักษณะการสร้างโครงร่างของไฮดรอกซีอะพาไทท์ ที่เกิดขึ้นภายในเม็ดเจลอัลจิเนทแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้อง SEM แสดงโครงสร้างของเม็ดเจลอัลจิเนท (a) และโครงสร้างของเม็ดเจอัลจิเนท/ไฮดรอกซีอะพาไทท์ (b) (Zhang et al., 2009)

ยางพาราในปัจจุบันมีการนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางโดยแหล่งผลิตยางธรรมชาติที่ใหญ่ที่สุดในโลกคือ แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้คิดเป็นร้อยละ 90 (http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK3/chapter4/t3-4-l1.htm) ของแหล่งผลิตทั้งหมดส่วนที่เหลือมาจากแอฟริกากลาง ซึ่งพันธุ์ยางที่ผลิตในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้คือ พันธุ์ฮีเวียบราซิลเลียนซิส (Livonniere, 1993) น้ำยางที่กรีดได้จากต้นจะเรียกว่าน้ำยางสด (field latex) น้ำยางที่ได้จากต้นยางมีลักษณะเป็นเม็ดยางเล็ก ๆ กระจายอยู่ในน้ำ (emulsion) มีลักษณะเป็นของเหลวสีขาว มีสภาพเป็นคอลลอยด์ (Frank and Anthony, 2002) มีปริมาณของแข็งประมาณร้อยละ 30-40 pH 6.5-7 น้ำยางมีความหนาแน่นประมาณ 0.975-0.980 กรัมต่อมิลลิลิตร มีความหนืด 12-15 เซนติพอยส์ (http://th.wikipedia.org)

ยางธรรมชาติมีชื่อทางเคมีว่า ซิส-1,4-พอลิไอโซพรีน (cis-1,4-polyisorene) เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนล้วน (Sethuraj, 1992) ทำให้มีสมบัติไม่ทนต่อน้ำมัน แต่เป็นฉนวนไฟฟ้าได้ดี ใน 1 โมเลกุลจะประกอบด้วยหน่วยของไอโซพรีน (C_5H_8) มาต่อกันเป็นสายโซ่ยาวแบบเส้นตรงใน 1 หน่วยไอโซพรีนจะเป็นพันธะคู่และหมู่อัลฟาเมทธิลีนที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (Manas, 2007) ทำให้สามารถวัลคาไนซ์ได้ด้วยกำมะถันและทำให้ยางทำปฏิกิริยาได้ง่ายด้วยออกซิเจนและโอโซนทำให้ยางเกิดการเสื่อมสภาพได้ง่ายเช่นเดียวกัน (Makuuchi et al., 1990) ดังนั้นยางธรรมชาติจึงมีสายโซ่ที่เคลื่อนไหวหักงอไปมาได้ง่าย ทำให้ยางธรรมชาติคงสภาพยืดหยุ่นได้ดี มีค่าอุณหภูมิของการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว ประมาณ -72 องศาเซลเซียสสามารถใช้งานได้ที่อุณหภูมิต่ำ (Young, 1981) สำหรับความสม่ำเสมอในโครงสร้างโมเลกุล ทำให้ยางธรรมชาติสามารถตกผลึกได้เมื่อยืด การเกิดผลึกเนื่องจากการยืดตัวยังทำให้ยางคงรูปมีสมบัติเชิงกลดีขึ้น นั่นคือ ยางจะมีความทนทานต่อแรงดึง ความทนทานต่อการฉีกขาด และความต้านทานต่อการขัดถูสูงขึ้น ยางธรรมชาติมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยสูง อยู่ในช่วง 200,000 ถึง 400,000 (http://th.wikipedia.org) ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการเพิ่มความแข็งแรงในตัววัสดุชีวภาพได้เป็นอย่างดี

โครงการวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะนำไฮดรอกซีอะพาไทท์ ในระดับนาโน และ/หรือโมเลกุลของยางพารามาจับร่วมกับอัลจิเนทเพื่อช่วยเสริมความแข็งแรง ยืดหยุ่น และความเสถียรเพื่อใช้ตรึงเอนไซม์ในทางอุตสาหกรรมในอนาคต โดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นตัวอย่างทดสอบการย่อยสลายโมเลกุลของแป้งที่มีขนาดใหญ่เพื่อศึกษาการซึมเข้าออกช่องว่างของเม็ด

เจลอัลจิเนทที่มีโมเลกุลของไฮดรอกซีอะพาไทท์ ในระดับนาโน และ/หรือ โมเลกุลของยางพารา

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์ในอัลจิเนทร่วมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น
2) เพื่อเพิ่มความแข็งแรงและคงตัวของเม็ดเจลอัลจิเนทด้วยการเสริมด้วยเจลนาโนเพื่อใช้ในการตรึงเอนไซม์
3) เพื่อเพิ่มความแข็งแรงและคงตัวของเม็ดเจลอัลจิเนทด้วยการเสริมด้วยเจลนาโนเพื่อใช้ในการตรึงเอนไซม์
4) เพื่อทำการพัฒนาประยุกต์ใช้เม็ดเจลในการตรึงเอนไซม์เพื่อการอุตสาหกรรม

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1) ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตเม็ดเจลนาโนชนิดไบโอพอลิเมอร์/ไฮดรอกซีอะพาไทท์ ได้แก่ ระยะเวลาในการผสม, pH และ สัดส่วนของพอลิเมอร์แต่ละประเภทที่ใช้ในการผสม
2) ทดสอบการตรึงเอนไซม์ร่วมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และ ยางพารา
3) นำอัลจิเนทมาประยุกต์ใช้ในการตรึงเอนไซม์อุตสาหกรรม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและเพิ่มอายุการใช้งานเอนไซม์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุและสารเคมี

2.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

- อัลจิเนท (Alginate, Fluka)
- ยางพารา (Natural rubber)
- เอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase: Enzyme invertase was β-D-fructofuranoside fructohydrolase, EC 3.2.1.26 produced from baker's yeast, *Saccharomces cerevisiae,* Fluka).

2.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- หลอดฉีดยา
- ขวดรูปชมพู่
- ตะแกรงกรองสาร
- บีกเกอร์
- แท่งแก้วคน
- ขวดปรับปริมาตร

2.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- ไดออมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟส ($(NH_4)_2HPO_4$)
- แคลซียมไนเตรต ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

2.1.4 เครื่องมือที่ใช้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- เครื่องกวนแบบให้ความร้อน (Hot plate stirrer)
- เครื่องวัดความหนืด (Brookfield viscosity meter)
- ตู้อบชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Drying oven)
- เครื่อง FT-IR (Fourier Transform Infianed Spectrometry : FTIR)
- กล้องจุลทรรศจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด (Seaning Electron Microscop : SEM)
- กล้องจุลทรรศจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscop : TEM)
- เครื่องวัดแรงกด (Texture Profile Analysis)

2.2 เตรียมเม็ดเจลอัลจิเนท, อัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ ระดับนาโน และอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ -ยางพารา

การเตรียมเม็ดเจลนาโนนั้นเริ่มโดยการนำเอาส่วนแรกคือไดออมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟส $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 12.5 มิลิลิตรแล้วนำมาผสมกับโซเดียมอัลจิเนท 0.5 กรัม แล้วปั่นด้วยความเร็วประมาณ 1,000 รอบต่อนาทีประมาน 5 นาที และผสมกับยางพาราในอัตราส่วน 0%, 2.5%, 5%, และ 10% ตามลำดับปั่นผสมกันอีกประมาน 1 ชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที หลังจากที่ส่วนผสมเข้ากันดีแล้วจึงนำไปหยดลงในสารละลายแคลซียมไนเตรต $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ 6% ที่ pH 4 และปรับอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส หยดของสารลายโซเดียมอัลจิเนทดังกล่าวก็จะกลายเป็น เม็ดของแคลเซียมอัลจิเนทซึ่งเป็นไบโอพอลิเมอร์ชนิดหนึ่ง แล้วดำเนินการปั่นต่อไปที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที และทิ้งไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อเป็นการให้สารไดออมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟส และแคลเซียมไนเตรต เกิดการรวมตัวกันเป็นสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทท์ขึ้น หลังจากนั้นทำการกรองเม็ดเจล ออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบเพื่อขจัดแคลซียมไนเตรตที่อาจยังตกค้างอยู่ออกให้หมด โดยนำเอาเม็ดเจลทุกอัตราส่วนที่ได้รับการปรับเปลี่ยน ไปดำเนินการวัดความคงโดยใช้ถังหมักที่ปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Zhang et al., 2009)

$$10Ca(NO_3)_2 + 6(NH_4)_2HPO_4 + 8NH_3.H_2O \longrightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 6H_2O + 20NH_4NO_3$$

2.3 การทดสอบและวิเคราะห์คุณสมบัติของเม็ดเจลนาโน

2.3.1 **ค่าความหนืด (Viscosity)**

วัดความหนืดของสารละลาย 2.2 ที่เตรียมขึ้นก่อนที่จะทำเป็นเม็ดเจลโดยใช้ Brookfield Digital (Well-Brookfield LVT, series 82198 ประเทศ สหรัฐอเมริกา) ของพอลิเมอร์แต่ละชนิด อัลจิเนท, อัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และ อัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ -ยางพารา ความเร็ว 13 รอบต่อนาที shear rate 12.9 ใช้หัววัด C-21 อ่านค่าหลังจาก 30 วินาที โดยทำการวัดตัวอย่างของอัลจิเนทที่มีปริมาณยางพารา 0%, 2.5%, 5% และ 10% ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 50องศาเซลเซียสเพื่อทำการเปรียบเทียบว่าอุณหภูมิและปริมาณยางพาราที่ส่งผลมีผลต่อค่าความหนืด (Tina et al., 2008)

2.3.2 **ค่าความคงตัวของโครงสร้างเม็ดเจลจากการบีบอัด**

ทดสอบความแข็งแรงทนทานต่อการบีบอัดโดยใช้เครื่อง Texture Profile Analysis (TPA), (TA-XT_2 Stable Micro System, ประเทศอังกฤษ) โดยทำการวัดเม็ดเจลอัลจิเนท, อัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และ อัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ -ยางพาราจากข้อ 2.2 โดยเลือกขนาดของ load cell ให้เหมาะสม และเปลี่ยนอุปกรณ์หัวจับให้เป็นแบบ สำหรับ compression test จากนั้นวางตัวอย่างที่จะวัดให้อยู่ตรงกลาง ระหว่างหัวกดและฐานรอง จากนั้นเลื่อน หัวกดให้เข้ามาใกล้กับพื้นผิวด้านบนของตัวอย่างประมาณ 5 มม. เพื่อที่จะสามารถนำตัวอย่างเข้า-ออกจากฐานได้สะดวก จากนั้นทำการ zero ค่าแรง เพื่อกำหนดตำแหน่งกลับคืน ของ crosshead หลังจากการทดสอบสิ้นสุดรอบการทดสอบแล้ว ทำการบันทึกค่าของแรงชนิดต่างๆ (Bourne, 1982)

2.3.3 **ค่าความคงตัวในสภาวะถังหมัก**

นำเอาเม็ดเจลจากข้อ 2.2 ทุกอัตราส่วน ไปดำเนินการวัดความคงโดยใช้ถังหมักที่ปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา1 ชั่วโมง เพื่อศึกษาอัตราการคงเหลือของเม็ดเจลนาโน

2.3.4 **ค่าการดูดซับน้ำ**

โดยใช้เม็ดเจลแต่ละชนิดน้ำหนัก 2.5 กรัม แล้วทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชม. หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำเปล่าทิ้งไว้ 16 ชั่วโมงเพื่อให้เม็ดเจลดูดน้ำกลับอีกครั้ง แล้วนำน้ำหนักก่อนและหลังการแช่ไปคำนวณตามสมการดังนี้

$$\% \text{ EWU} = [(W_s - W_d)/W_s] \times 100$$

โดยที่ W_s คือ น้ำหนักของเม็ดเจลหลังจากการทำให้ดูดซึมน้ำกลับ W_d คือ น้ำหนักของเม็ดเจลหลังจากการทำให้แห้ง EWU (equilibrium water uptake) คือค่าการดูดซึมน้ำกลับของเม็ดเจล

2.3.5 **โครงสร้างของเม็ดเจลโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)**

ตรวจสอบโครงสร้างของเม็ดเจลจากข้อ 2.2 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ซึ่งจะทำการตรวจโครงสร้างของเม็ดเจล อัลจิเนท, อัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และ อัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ -ยางพารา เพื่อดูความแตกต่างทั้งภายในและภายนอก โดยตรึงเม็ดเจลนาโนไว้บนแท่นโลหะแล้วทำการโค้ทด้วยผงทองในระบบสูญญากาศจากนั้นตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM), (ยี่ห้อ Juol รุ่น JSM-5800LV ประเทศญี่ปุ่น) เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง ทั้งส่วนที่เรียบและส่วนที่เป็นรอยแตกในภาคตัดขวางของเม็ดเจลแต่ละประเภทพร้อมทั้งวัดขนาด (Tu, 2005)

2.3.6 **โครงสร้างของเม็ดเจลโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM)**

ตรวจสอบโครงสร้างผลึกของเม็ดเจลจากข้อ 2.2 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน โดยทำการบดเม็ดเจลจากข้อ 2.2 แล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 100 ไมโครเมตร จากนั้นผงที่ได้ไปตรวจสอบโครงสร้างผลึกของเม็ดเจลโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM), (ยี่ห้อ Hitachi รุ่น 7700 ประเทศญี่ปุ่น)

2.3.7 **การตรวจวิเคราะห์หาหมู่ functional ด้วยเครื่อง FT-IR**

ตัวอย่างเม็ดเจลนาโนจะถูกบดสำหรับทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ATR-microscope FT-IR (Vertex 70 Bruker สาขาประเทศไทย) การวิเคราะห์จะใช้ การสแกนด้วยสเปคตรัมช่วงความถี่ 800-4000 cm^{-1} และสแกนซ้ำ 128 รอบ ที่ความละเอียดทุกๆ 4 cm^{-1} (Singthong *et al.*, 2005)

2.3.8 **การตรึงเอนไซม์อินเวอร์เทส**

การเตรียมเม็ดเจลนาโนดังเช่นข้อ 2.2 โดยผสมเอนไซม์อินเวอร์เทสลงไป 10 unit/ml ในส่วนแรกคือไดออมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟส $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ผสมกับโซเดียมอัลจิเนท แล้วทำตามขั้นตอนข้อ 2.2 ต่อไปจนได้เม็ดเจลนาโน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

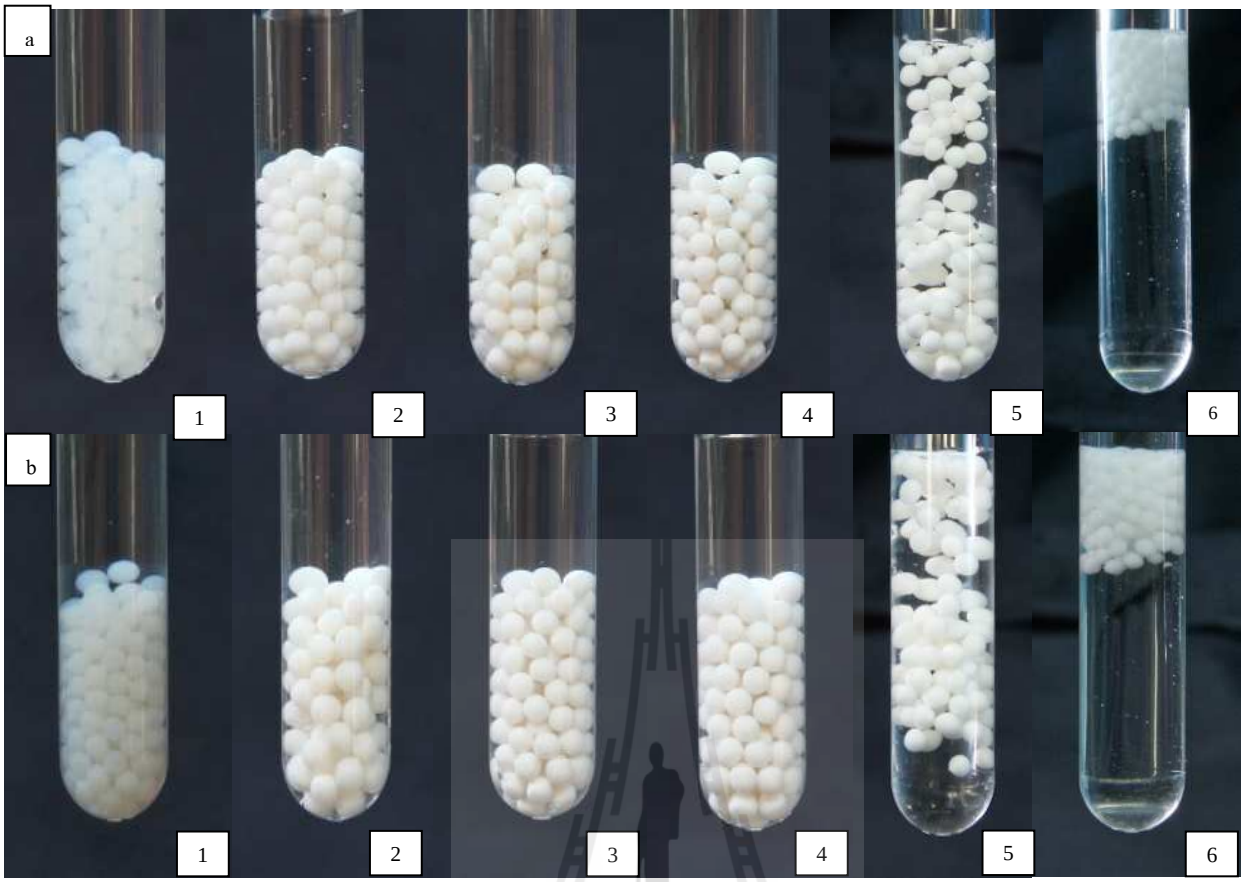
ผลการวิจัย (Results)

3.1 ขั้นตอนการเตรียมเม็ดเจลนาโน (Preparation of nano gel beade)

การเตรียมเม็ดเจลนาโนนั้นเริ่มโดยการนำเอาส่วนแรกคือไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟส $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 12.5 มิลิลิตรแล้วนำมาผสมกับโซเดียมอัลจิเนท 0.5 กรัม แล้วปั่นด้วยความเร็วประมาณ 1,000 รอบต่อนาทีประมาน 5 นาที และผสมกับยางพาราในอัตราส่วน 0%, 2.5%, 5%, และ 10% ตามลำดับปั่นผสมกันอีกประมาน 1 ชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที หลังจากที่ส่วนผสมเข้ากันดีแล้วจึงนำไปหยดลงในสารละลายแคลซียมไนเตรต $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ 6% ที่ pH 4 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร สารลายโซเดียมอัลจิเนทดังกล่าวก็จะกลายเป็น เม็ดของแคลเซียมอัลจิเนทซึ่งเป็นไบโอพอลิเมอร์ชนิดหนึ่ง แล้วดำเนินการปั่นต่อไปที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที และทิ้งไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อเป็นการให้สารไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟส และแคลเซียมไนเตรต เกิดการรวมตัวกันเป็นสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทท์ ขึ้น หลังจากนั้นทำการกรองเม็ดเจล ออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบเพื่อขจัดแคลซียมไนเตรตที่อาจยังตกค้างอยู่ที่ผิวเจลออกให้หมด โดยเปรียบเทียบกับเม็ดเจลที่ไม่ใส่ไฮดรอกซีอะพาไทท์ จากนั้นจึงนำไปดำเนินการวัดความคงตัวต่อไป ซึ่งอัตราส่วนการผสมแสดงตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราส่วนผสมของเจลแต่ละชนิดและปริมาณยางพารา

ปริมาณยางพารา	ชนิดของเม็ดเจลนาโน	
	แคลซียมอัลจิเนท (CA)	แคลซียมอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ (CA-HA)**5%**
0%	CA/LX 0%	CA/HA/LX 0%
2.5%	CA/LX 2.5%	CA/HA/LX 2.5%
5%	CA/LX 5%	CA/HA/LX 5%
10%	CA/LX 10%	CA/HA/LX 10%
15%	CA/LX 15%	CA/HA/LX 15%
20%	CA/LX 20%	CA/HA/LX 20%



รูปที่ 3 ลักษณะของเม็ดเจลนาโน CA/LX ที่ความเข็มข้นของยางพารา 0, 2.5, 5, 10, 15 และ 20% (a) CA/HA/LX ที่ความเข็มข้นของยางพารา 0, 2.5, 5, 10, 15 และ 20 % (b)

จากการทดสอบผลิตเม็ดเจลนาโน ที่มีปริมาณยางพาราตั้งแต่ความเข้มข้นจาก 0-20 พบว่ามีปริมาณของยางพาราที่เหมาะต่อการผลิตเม็ดเจลนาโนคือ 0, 2.5, 5 และ 10% เนื่องจากลักษณะเม็ดเจลนาโนที่มีปริมาณยางพาราตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 15 และ 20% นั้นไม่สามารถนำไปใช้ได้ เพราะเม็ดเจลจะมีขนาดเล็กและบางอันเนื่องมาจากปริมาณน้ำยางพาราที่มากเกินไปทำให้สารละลายอัลจิเนทไม่สามารถแข็งตัวเพื่อหุ้มองค์ประกอบทั้งหมดไว้ได้ทัน จึงทำให้มีน้ำยางบางส่วนหลุดออกมาผสมอยู่ในสารลายด้านล่างโดยจะสังเกตได้จากสีขาวขุ่นในสารละลายแคลซียมไนเตรต (ไม่แสดงรูป) อีกทั้งเม็ดเจลนาโนที่ได้ยังลอยน้ำอันเนื่องมาจากความถ่วงจำเพาะของยางพาราและหรือฟองอากาศมีผลให้เม็ดเจลนาโนลอยน้ำและไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ซึ่งแสดงในรูปที่ 3

3.2 ทดสอบความหนืด

โดยใช้เครื่อง Brookfield ความเร็ว 13 รอบต่อนาที shear rate 12.9 ใช้หัววัด C-21 อ่านค่าหลังจาก 30 วินาที โดยทำการวัดตัวอย่างของ อัลจิเนทที่มีปริมาณยางพารา 0%, 2.5%, 5% และ 10% ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 50 องศาเซลเซียส เพื่อทำการเปรียบเทียบว่าอุณหภูมิและปริมาณยางพาราที่ส่งผลมีผลต่อค่าความหนืดของสารละลายโซเดียมอัลจิเนท พบว่าค่าความหนืดจะสูงที่สุดก็ต่อเมื่ออุณหภูมิต่ำที่สุดคือที่ 4 องศาเซลเซียสและจะลดลงเรื่อยๆจนค่าต่ำที่สุดที่ 50 องศาเซลเซียส อันเนื่องมาจากที่อุณหภูมิต่ำความใกล้ชิดกันของโมเลกุลส่งผลต่อความแข็งแรงของพันธะที่จับตัวกันส่งผลให้มีค่าความหนืดสูง (Parente et al., 1998) ในทางตรงกันข้ามกันอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส พลังงานความร้อนที่เข้าไปจะทำลายพันธะบางส่วนทำให้โมเลกุลเกาะกันอยู่ห่างๆและหลวมส่งผลให้ค่าความหนืดลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด (Livonniere, 1993) ในส่วนของปริมาณยางพาราที่เติมเข้าไปพบว่าถ้าเปอร์เซ็นต์น้ำยางที่เติมลงไปสูงจะส่งผลต่อค่าความหนืดของสารละลายที่ต่ำลง เนื่องมาจากยางพารามีปริมาณน้ำที่สูงจึงทำให้ค่าความหนืดของสารละลายนั้นลดต่ำลงแต่เมื่อมีการในน้ำยางพาราน้อยลงค่าความหนืดของสารละลายนั้นก็จะค่อยๆเพิ่มขึ้นจนใกล้เคียงกับสารละลายที่ยังไม่เติมน้ำยางพารา ดังที่แสดงในรูปที่ 4

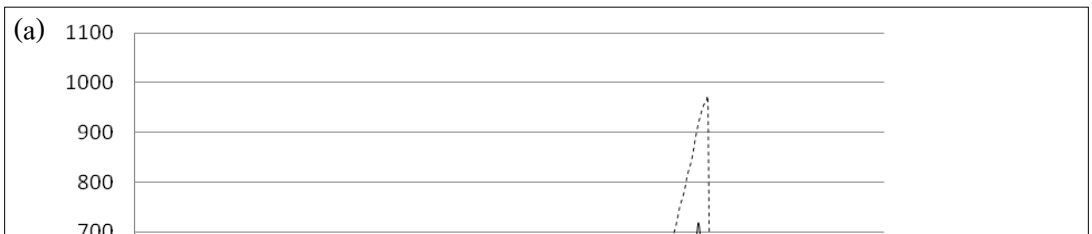
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 4 แสดงค่าความหนืดของสารละลายโซเดียมอัลจิเนทที่อุณหภูมิและปริมาณน้ำยางพาราที่ต่างกัน โดยรูป (a) คือความหนืดของสารละลายโซเดียมอัลจิเนทและยางพาราและรูป (b) คือความหนืดของสารละลายโซเดียมอัลจิเนทผสมสารละลายไฮดรอกซีอะพาไทท์และยางพารา

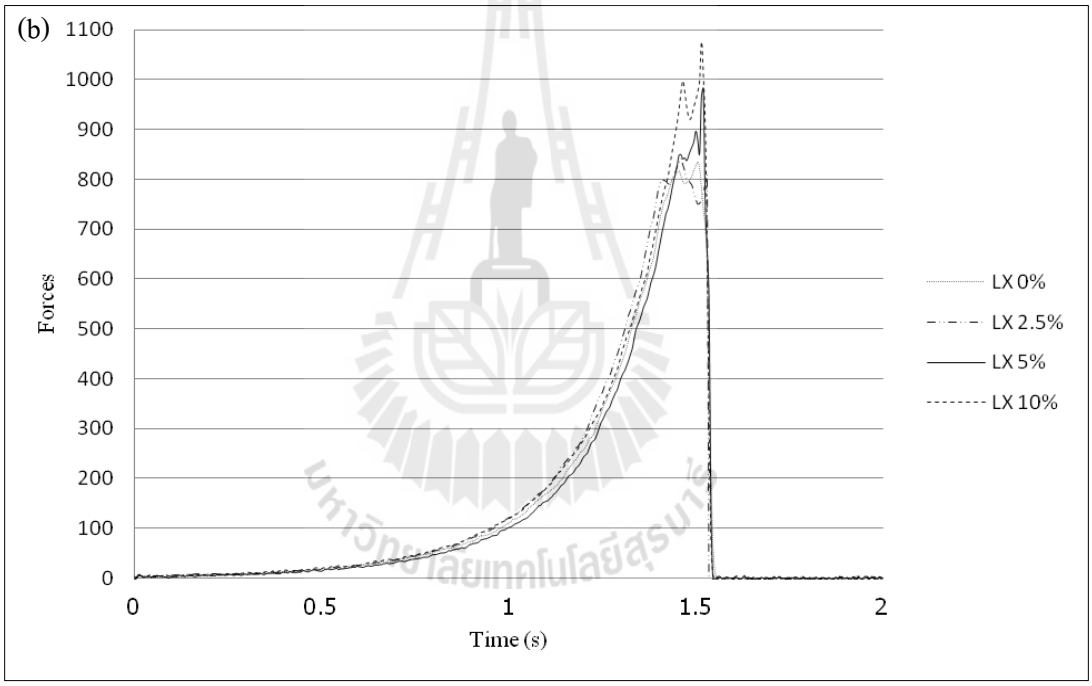
3.3 ทดสอบวัดความคงตัว

ผลของการวัดความคงตัวของเม็ดเจลโดยทำการเปรียบเทียบระหว่างแคลเซียมอัลจิเนท และแคลซียมอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ โดยเติมยางพาราลงไปในอัตราส่วน 0%, 2.5%, 5%, และ 10% ตามลำดับพบว่าแคลเซียมอัลจิเนทซึ่งยางพาราในอัตราส่วน 0%, 2.5%, 5%, และ 10% ให้ค่าความแข็งแรงที่ 600, 685, 720 และ 920 กรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มของแคลเซียมอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ พบว่าให้ค่าความแข็งแรงที่ 800, 830, 850 และ 1,000 กรัมต่อตารางเซนติเมตร ดังที่แสดงในรูปที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกันกับเม็ดเจลทั้งสองชนิดพบว่าที่การเติมยางพาราที่ 0% ค่าของความแข็งแรงของเม็ดเจลทั้งสองนั้นมีความแตกต่างกันเป็นอย่างมาก คือ 600 และ 800 กรัมต่อตารางเซนติเมตร ความแตกต่างดังกล่าวเกิดมาจากโครงสร้างของไฮดรอกซีอะพาไทท์ ที่เติมลงไปมีผลต่อค่าความแข็งแรง แต่ค่าความแข็งแรงนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนไปใกล้กันที่ค่า 970 และ 1,000 กรัมต่อตารางเซนติเมตร เนื่องมาจากปริมาณของยางพาราที่เติมลงไปซึ่งเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 10% จนทำให้มีค่าความแข็งแรงที่ใกล้เคียงกัน แต่จากการสังเกตลักษณะของกราฟทั้งสองพบว่าที่จุดปลายของกราฟหรือ ณ จุดที่เกิดการแตกของเม็ดเจลนาโนพบว่ามีลักษณะของเส้นกราฟที่แตกต่างกัน โดยกราฟของแคลเซียมอัลจิเนทและยางพารามีปลายของกราฟที่บ่งชี้ถึงการเกิดการแตกของเม็ดเจลนาโนเพียงครั้งเดียวแต่เส้นกราฟของแคลเซียมอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพารา มีการแตกของเม็ดเจลนาโนถึงสองครั้ง ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถบอกบอกได้ว่าไฮดรอกซีอะพาไทท์ ที่ผสมลงไปสามารถทำให้เกิดความแตกต่างในการแตกของเม็ดเจลนาโนได้ (Orive et al., 2003)

จากโครงสร้างและลักษณะการแตกเห็นได้ชัดว่าไฮดรอกซีอะพาไทท์ ได้สร้างโครงสร้างอีกชั้นหนึ่งขึ้นภายในเม็ดเจลนาโน และโครงสร้างดังกล่าวสามารถเพิ่มความแข็งแรงให้กับเม็ดเจลนาโนได้ โดยสามารถสังเกตได้จากการแตกครั้งแรกของเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพารามีค่าที่ใกล้เคียงกันกับเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนท-ยางพารา ซึ่งน่าจะเกิดจากแรงต้านทานของตัวอัลจิเนทและยางพารา และหลังจากนั้นยังสามารถต้านทานการแตกได้อีกระดับนึงก่อนเม็ดเจลนาโนจะแตกอีกครั้งจากภายในตัวเม็ดเจลนาโน ซึ่งจากผลการทดลองนี้ทำให้พบว่าไฮดรอกซีอะพาไทท์ สามารถสร้างโครงสร้างภายในและเพิ่มความสามารถในการต้านทานแรงบีบอัดได้ดียิ่งขึ้น (Avella et al., 2007)



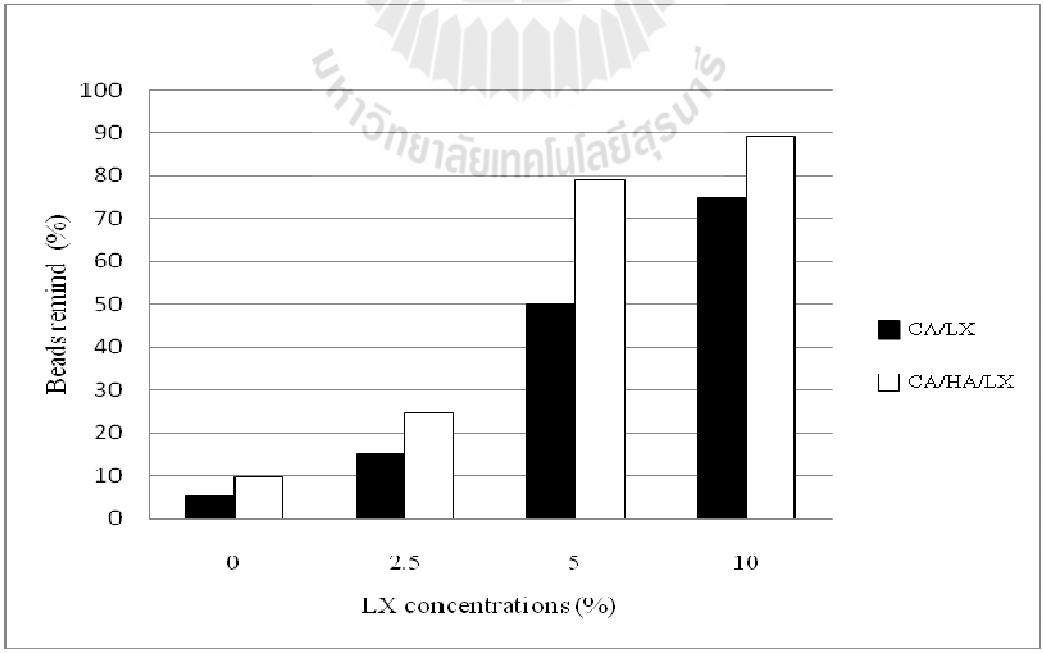
(N)



รูปที่ 5 แสดงค่าความความต้านทานแรงบีบอัดของเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนทและยางพารา (a) และเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพารา (b)

3.4 ทดสอบวัดความคงตัวในถังหมัก

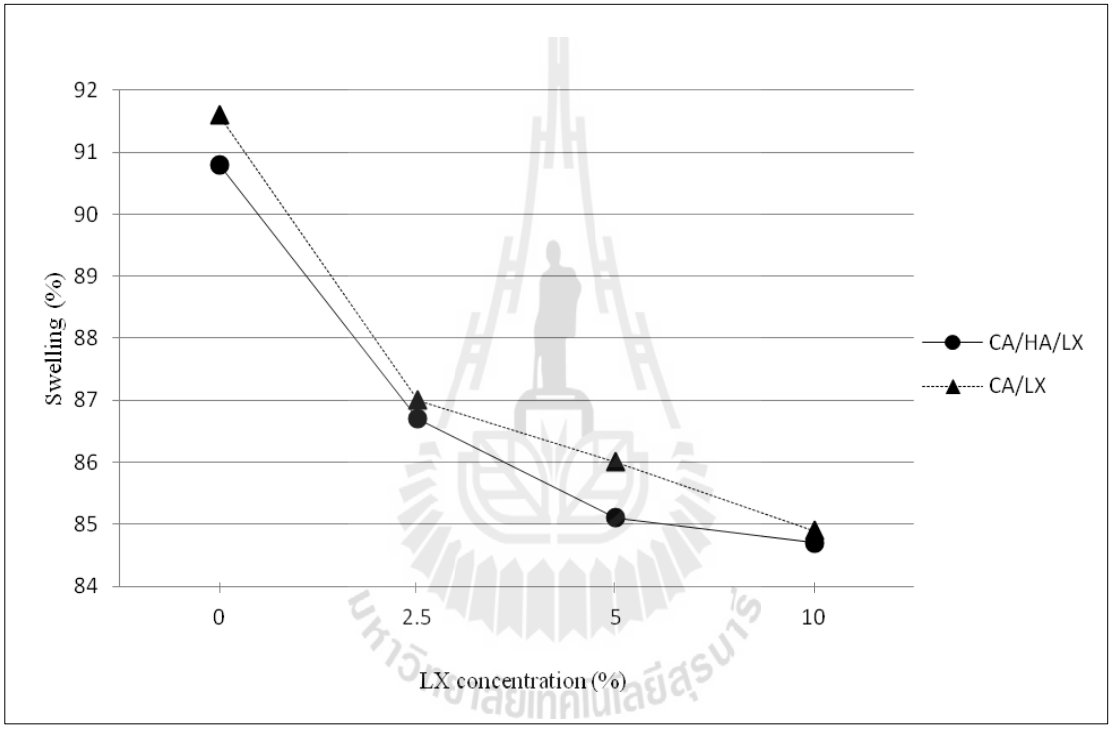
การเตรียมเม็ดเจลนาโนนั้นเริ่มโดยการนำเอาส่วนแรกคือไดออมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟส $(NH_4)_2HPO_4$ 0.6 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 12.5 มิลิลิตรแล้วนำมาผสมกับโซเดียมอัลจิเนท 0.5 กรัม แล้วปั่นด้วยความเร็วประมาณ 1,000 รอบต่อนาทีประมาน 5 นาที และผสมกับยางพาราในอัตราส่วน 0%, 2.5%, 5%, และ 10% ตามลำดับปั่นผสมกันอีกประมาน 1 ชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที หลังจากที่ส่วนผสมเข้ากันดีแล้วจึงนำไปหยดลงในสารละลายแคลเซียมไนเตรต $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ 6% ที่ pH 4 และปรับอุณหภูมิที่ 25 เซลเซียส หยดของสารลายโซเดียมอัลจิเนทดังกล่าวก็จะกลายเป็นเม็ดของแคลเซียมอัลจิเนทซึ่งเป็นไบโอพอลิเมอร์ชนิดหนึ่ง แล้วดำเนินการปั่นต่อไปที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที และทิ้งไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อเป็นการให้สารไดออมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟสและแคลเซียมไนเตรต เกิดการรวมตัวกันเป็นสารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทท์ ขึ้น หลังจากนั้นทำการกรองเม็ดเจล ออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบเพื่อขจัดแคลเซียมไนเตรตที่อาจยังตกค้างอยู่ออกให้หมด โดยนำเอาเม็ดเจลทุกอัตราส่วนที่ได้รับการปรับเปลี่ยน ไปดำเนินการวัดความคงโดยใช้ถังหมักที่ปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงผลการทดลองดังกราฟที่ 6 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณอัตราส่วนของยางพาราเพิ่มขึ้นอัตราการการคงเหลือของเม็ดเจลก็เพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของยางพาราซึ่งสรุปได้ว่า ยางพาราและไฮดริกซิอะพาไทท์มีผลทำให้ความแข็งแรงของเม็ดเจลเพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 6 แสดงปริมาณการคงเหลือของเม็ดเจลในโดยใช้ถังหมักที่ปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที

3.5 ทดสอบการดูดซับน้ำ

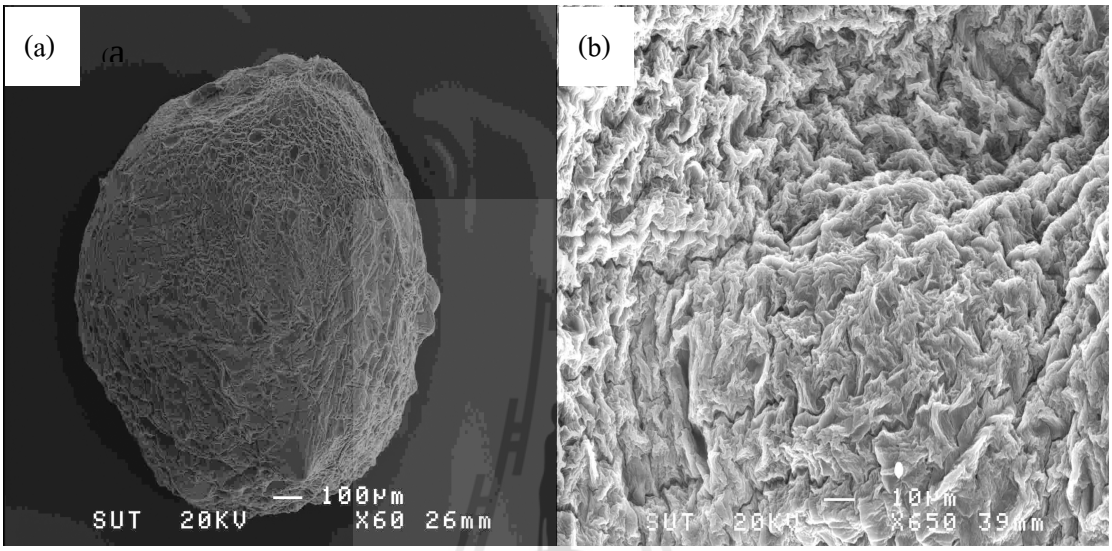
จากการทดลองพบว่าเมื่อเทียบกับเม็ดเจลที่ไม่ผสมสารไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพาราลงไปมีค่าการดูดซึมน้ำกลับที่สูงที่สุดแต่เมื่อใส่สารไฮดรอกซีอะพาไทท์ ลงไปก็พบว่าค่าการดูดซึมน้ำกลับมีปริมาณที่ลดลงและเมื่อเติมยางพาราลงไปก็ส่งผลให้ค่าการดูดซึมน้ำลดลงเพิ่มขึ้นอีก จึงสรุปได้ว่าสารทั้งสองนั้นไม่มีคุณสมบัติหรือสามารถดูดซึมน้ำกลับได้ในปริมาณที่น้อยจึงทำให้เม็ดเจลที่มีการเติมสารดังกล่าวมีค่าการดูดซึมน้ำกลับที่ลดลง (Gorka et al., 2009) และความสามารถในการดูดซึมน้ำกลับนี้ยังจะลดลงตามอัตราส่วนของยางพาราที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 แสดงค่าความดูดซึมน้ำกลับของเม็ดเจลชนิดต่างๆที่มีปริมานยางพาราที่ต่างกัน

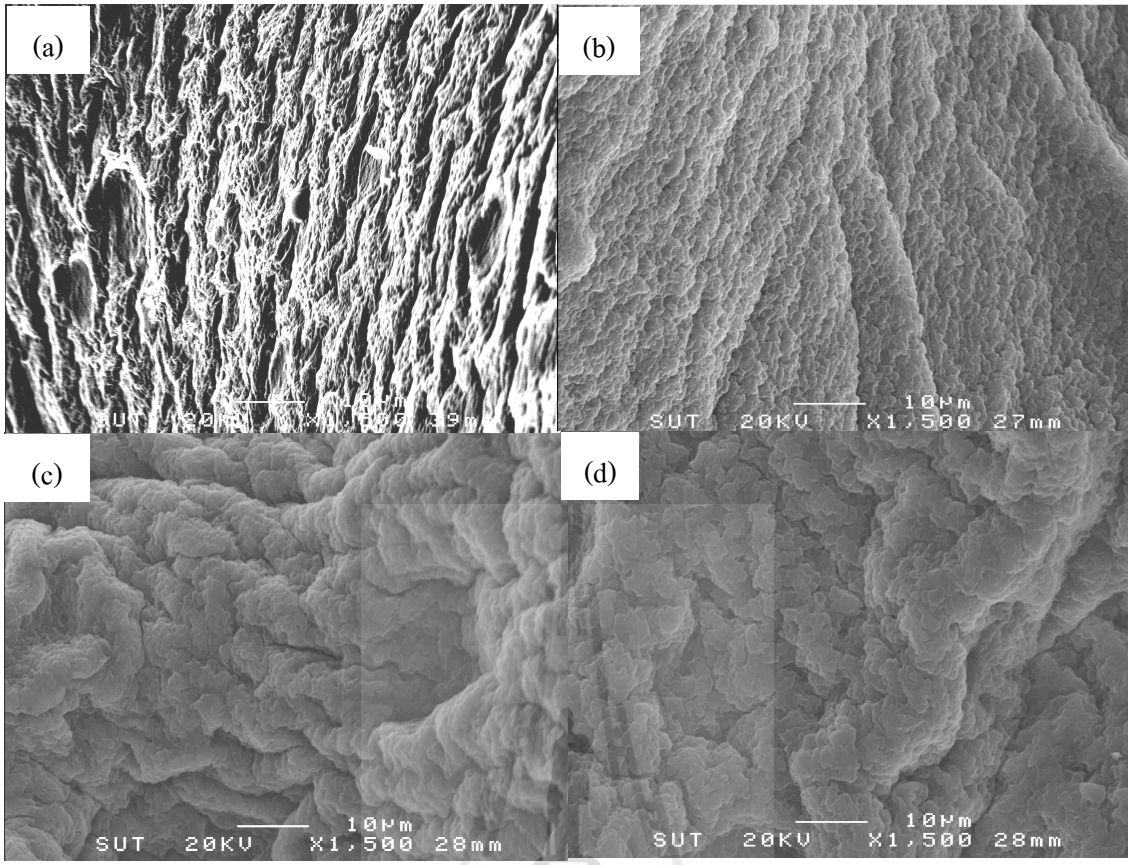
3.6 ตรวจสอบโครงสร้างของเม็ดเจลโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

จากการศึกษาลักษณะของพื้นผิวของตัวเม็ดเจลนาโนชนิดแคลเซียมอัลจิเนทด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) โดยทำการสังเกตที่ผิวนอกและภาคตัดขวางของเม็ดเจลนาโนที่ผ่านการทำแห้งด้วยความเย็น พบว่าเกิดรอยย่นจำนวนมากที่พื้นผิวของเม็ดเจลนาโนและมีขนาดของเม็ดเจลประมาณ 2 มิลลิเมตรดังรูปที่ 8



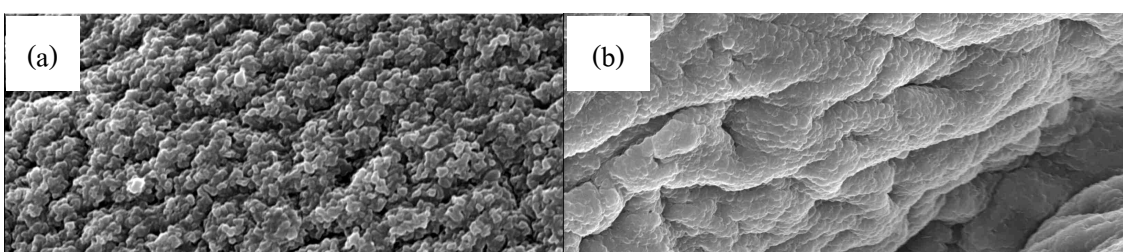
รูปที่ 8 ลักษณะของพื้นผิวเม็ดเจลนาโนขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร (a) ภาพลักษณะของพื้นผิวเม็ดเจลนาโน, (b) ลักษณะภาคตัดขวางของเม็ดเจลนาโน

การศึกษาลักษณะของแคลเซียมอัลจิเนทโดยเติมยางพาราลงไปในอัตราส่วน 0%, 2.5%, 5%, และ 10% ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) พบว่าลักษณะเริ่มแรกก่อนการเติมยางพาราของเม็ดเจลอัลจิเนทมีลักษณะเป็นเส้นใยที่และมีรูพรุนกระจายตัวอยู่ทั่วไป แต่หลังจากเติมยางพาราลงไปพบว่าลักษณะอนุภาคของเม็ดเจลนาโนเปลี่ยนเป็นลักษณะคล้ายเหลี่ยมและมีช่องว่างที่น้อยลง (Descamps, et al., 2009) ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของยางพาราเพิ่มขึ้นดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 ลักษณะพื้นผิวของแคลเซียมอัลจิเนทโดยเติมยางพาราลงไป ยางพารา 0% (a), ยางพารา2.5% (b), ยางพารา 5% (c) and ยางพารา 10% (d)

การศึกษาลักษณะของแคลเซียมอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ โดยเติมยางพาราลงไปในอัตราส่วน 0%, 2.5%, 5%, และ 10% ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) พบว่าลักษณะเริ่มแรกก่อนการเติมยางพาราของเม็ดเจลอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ มีลักษณะเป็นเม็ดกลมที่มีช่องว่างกระจายตัวอยู่ทั่วไป แต่หลังจากเติมยางพาราลงไปพบว่าลักษณะอนุภาคของเม็ดเจลนาโนเปลี่ยนเป็นลักษณะกึ่งกลมกึ่งแบนและมีช่องว่างที่น้อยลง ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของยางพาราเพิ่มขึ้นดังรูปที่ 10 ซึ่งลักษณะดังกล่าวในตอนแรกจะเห็นได้ชัดว่าเป็นอิทธิพลมาจากไฮดรอกซีอะพาไทท์ ที่เหนี่ยวนำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่เป็นเม็ดกลมและมีช่องว่างระหว่างอนุภาคที่มากแต่หลังจากเติมยางพาราลงไปทำให้โครงสร้างมีลักษณะแบนลงและแน่นมากขึ้นอันเนื่องมาจากยางพาราไปมีผลให้อนุภาคเปลี่ยนรูปร่าง

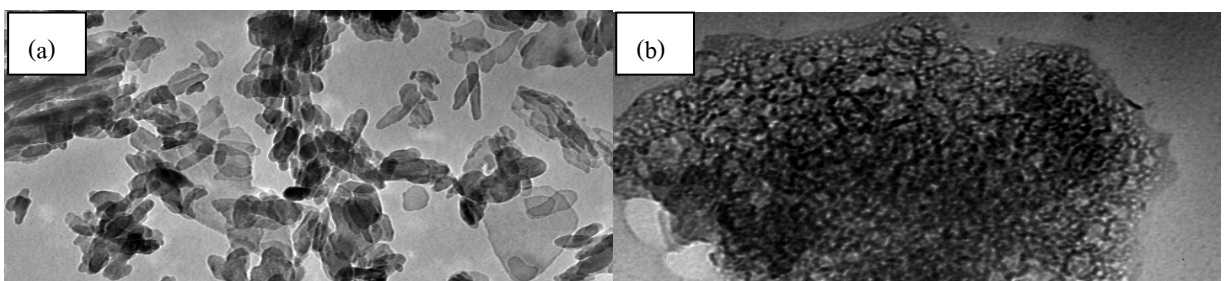


(c) (d)

รูปที่10 ลักษณะพื้นผิวของแคลเซียมอัลจิเนท-ไฮรอกซิอะพาไทท์โดยเติมยางพาราลงไป
ยางพารา 0% (a), ยางพารา 2.5% (b), ยางพารา 5% (c) และ ยางพารา 10% (d)

3.7 ทดสอบ TEM (Transmission Electron Microscope)

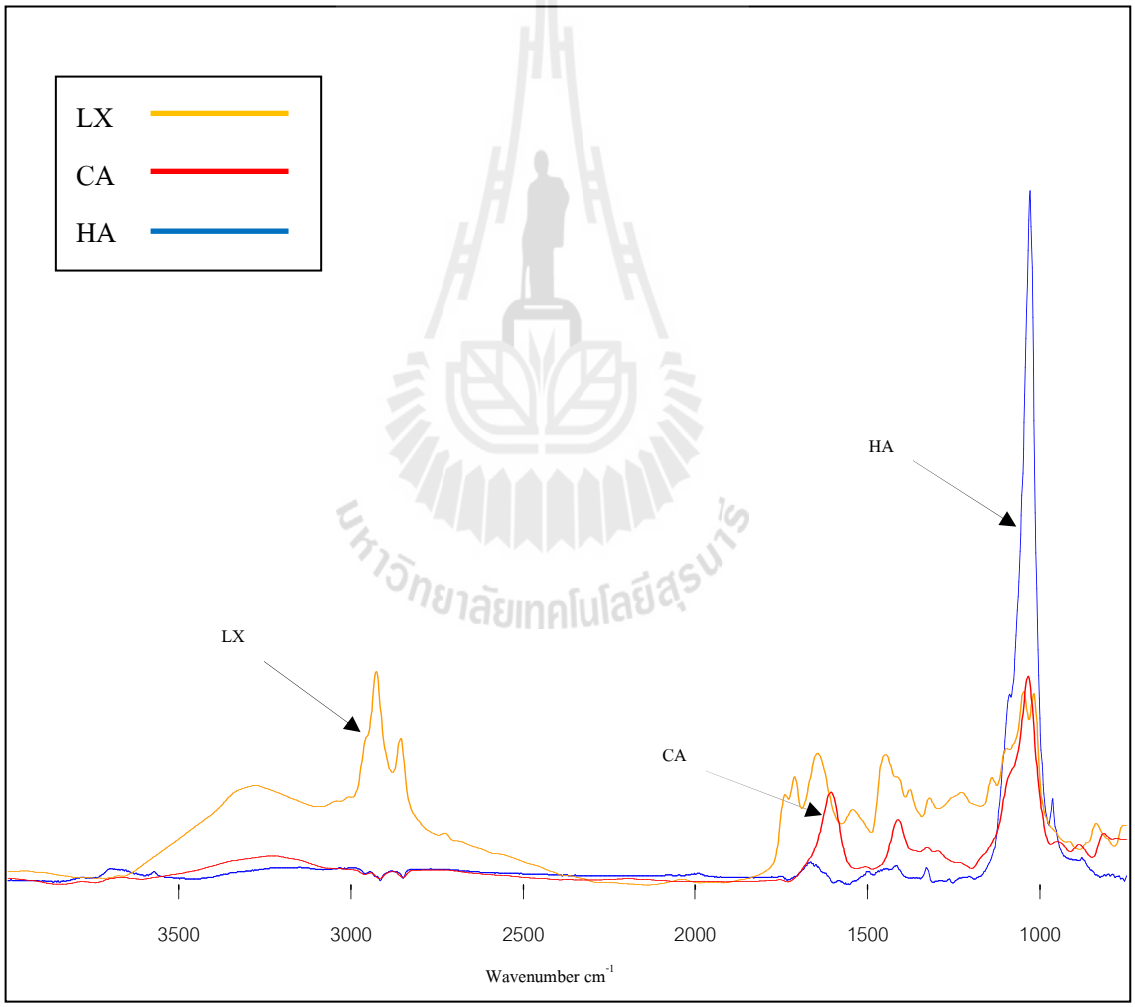
จากการทดสอบโดยการถ่ายภาพ TEM (Scanning Electron Microscope) (รูปที่ 11) พบว่า ลักษณะอนุภาคขององประกอบต่างๆนั้นแตกต่างกันโดยที่เราสามารถจำแนกผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทท์ ได้อย่างชัดเจน (Descamps, et al., 2009) แต่ในส่วนของยางพาราและอัลจิเนทนั้นถ้ารวมตัวกันแล้วจะไม่สามารถจำแนกหรือยากต่อการจำแนกได้ว่าเป็นสารใด จึงสามารถสรุปได้ว่า ไฮดรอกซีอะพาไทท์ นั้นไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการรวมตัวกันของสารต่างๆแต่ช่วยในการแยกหรือก่อให้เกิดโพรงหรือโครงสร้างที่เป็นรูขึ้นในโครงสร้าง และตัวของอัลจิเนทและยางพาราเป็นตัวประสานวัสดุต่างๆให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันเกิดเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะขึ้นมา



รูปที่ 11 แสดงรูปที่ได้จากการถ่ายภาพด้วย TEM (a), ไฮดรอกซีอะพาไทท์ (b), อัลจิเนท (c), อัลจิเนท และไฮดรอกซีอะพาไทท์ 10% (d), และยางพาราและอัลจิเนทและยางพารา 10% (e)

3.8 ทดสอบการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด (Fourier Transform - Infrared Spectroscopy)

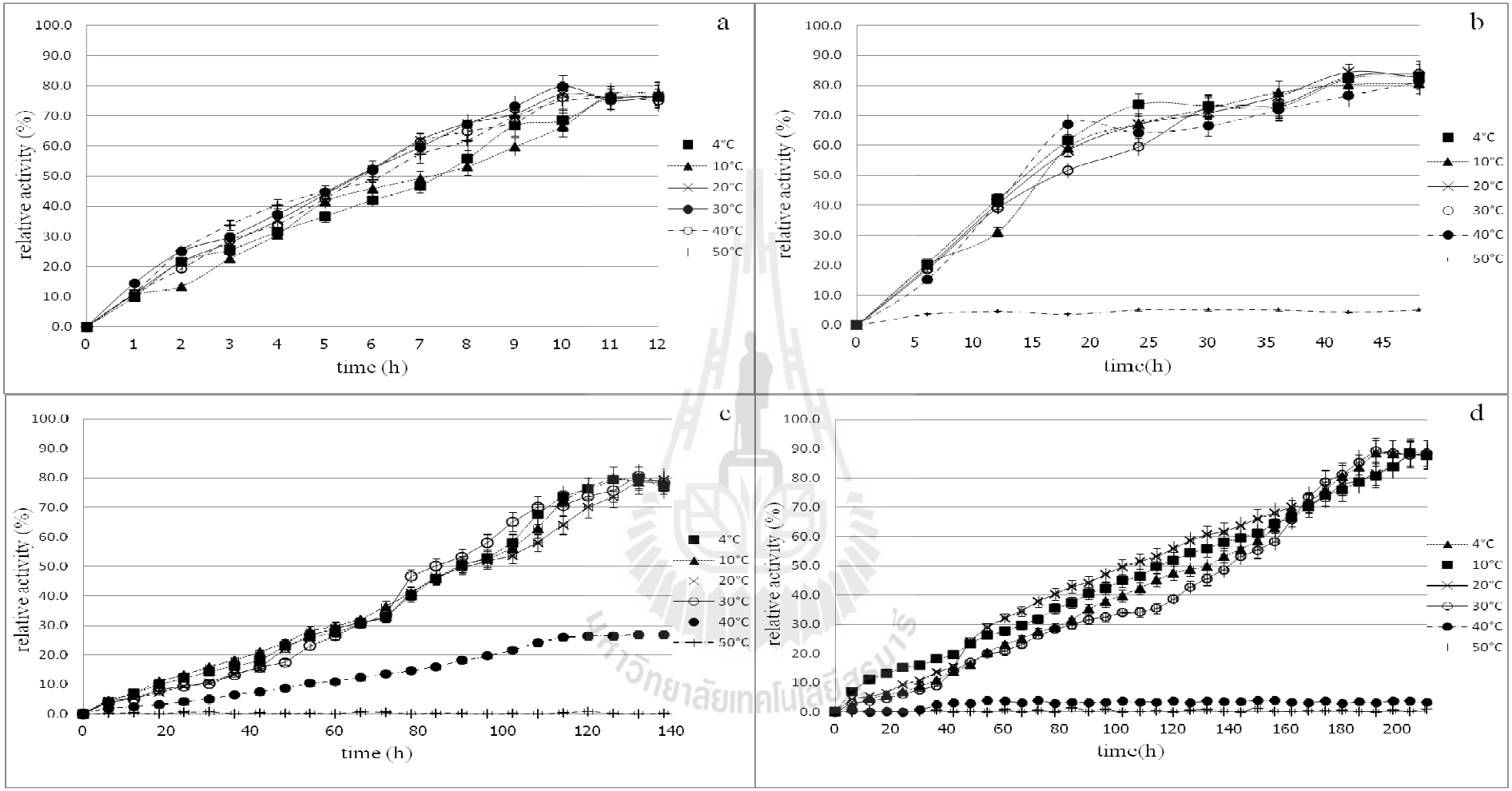
การทดสอบเม็ดเจลชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิค FT-IR โดยในการทดสอบเป็นการใช้เม็ดเจลในอัตราส่วนต่างๆมาบดให้มีขนาดประมาน 10 ไมครอนแล้วนำเข้าทดสอบในเครื่อง FT-IR Tensor 27 (Bruker) โดยวัด spectrum ที่ 4,000-800 cm^{-1} และวัดซ้ำ 128 scans พบว่าสารแต่ละชนิดที่นำมาผสมในการสร้างเม็ดบีดชนิดต่างๆขึ้นมานั้นมีความแตกต่างกันทางโครงสร้างเป็นอย่างมาก และมีพันธะเคมีหลักในสารแต่ละตัวที่ไม่มีความใกล้เคียงกันมากนักโดยเฉพาะไฮดรอกซีอะพาไทท์ ที่มีพีคที่ตำแหน่ง 1082, 1030 and 964 cm^{-1} ซึ่งเป็น PO_4 (Bonfield and Hing 2002) ส่วนตัวของยางพาราจะมีพีคที่ตำแหน่ง 2960 - 2857 cm^{-1} ที่เป็นลักษณะเด่นและอัลจิเนทที่ตำแหน่ง 1717 cm^{-} และ 1544 cm^{-1} (Won et al., 2005) ที่โดดเด่นซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิดในรูปที่ 12



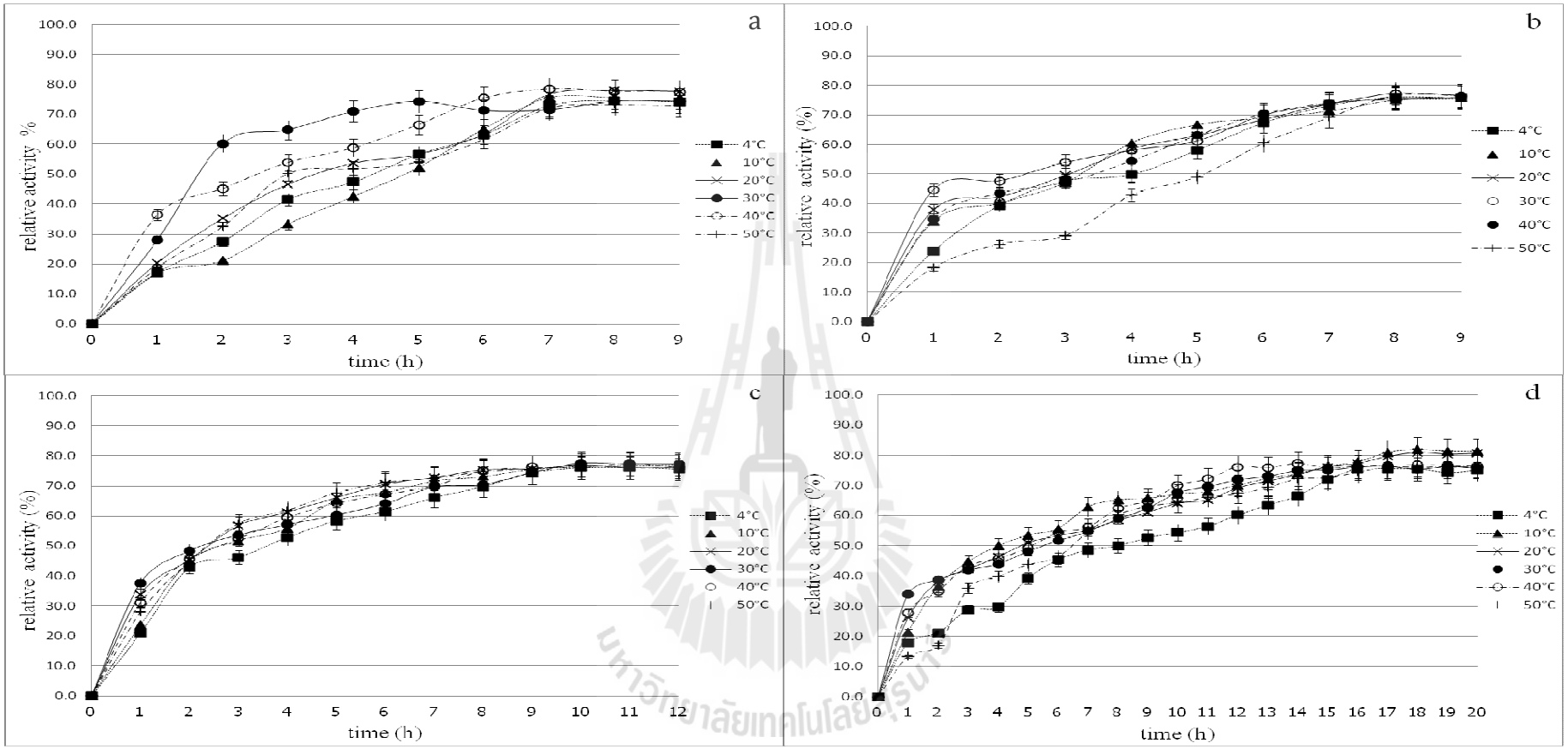
รูปที่ 12 แสดงรูปที่ได้จาก Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy โดยทำการศึกษาพันธะทางเคมีของสารตัวอย่างแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบกัน

3.9 การทดสอบการตรึงเอนไซม์

หลังจากการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ถูกตรึงในเม็ดเจลนาโนชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยน้ำตาลซูโครสให้ได้น้ำตาลกลูโคสและฟลุคโตส และมีอุณหภูมิและ pH เหมาะสมสูงสุดอยู่ที่ 55 องศาเซลเซียสและ pH 4.6 ตามลำดับ โดยนำเอนไซม์ดังกล่าวมาตรึงในแคลเซียมอัลจิเนทและเติมยางพาราลงไปในอัตราส่วน 0%, 2.5%, 5%, และ 10% โดยมีการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการสร้างเม็ดเจลที่อุณหภูมิ 4, 10, 20, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียสซึ่งพบว่าระยะเวลากิจกรรมของเอนไซม์จากเริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดกิจกรรมของอัตราส่วนยางพาราที่ 0%, 2.5%, 5%, และ 10% อยู่ที่ 10, 48, 130 และ 200 ชั่วโมง(รูปที่ 13) ตามลำดับ ในทุกๆ อุณหภูมิระหว่างการสร้างเม็ดเจลนาโนพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสิ้น ยกเว้นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสไม่พบกิจกรรมใดๆของเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะอนุภาคที่สังเกตได้จากใช้กล้อง SEM ที่เมื่อเพิ่มปริมาณของยางพาราลักษณะอนุภาคจะแน่นขึ้นและมีรูพรุนน้อยลง ประกอบกับการที่ยางพาราได้รับอุณหภูมิสูงจนทำให้เกิดการบวมจนปิดบังรูพรุนจนหมด เอนไซม์ที่อยู่ในเม็ดเจลจึงไม่สามารถออกมามีกิจกรรมภายนอกได้จึงไม่พบกิจกรรมใดๆของเอนไซม์ในอุณหภูมิดังกล่าว แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดเจลนาโนชนิดแคลเซียมอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่เติมยางพาราลงไปในอัตราส่วน 0%, 2.5%, 5%, และ 10% กลับพบว่ามีอัตราความเร็วของการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เร็วกว่าโดยสังเกตได้จากระยะเวลาที่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดกิจกรรมของเอนไซม์นั้นเร็วกว่าเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนทที่เติมยางพาราเป็นอย่างมาก โดยระยะเวลาที่ใช้อยู่ที่ 7, 8, 10 และ17 ชั่วโมงตามอัตราส่วนยางพาราที่ 0%, 2.5%, 5%, และ 10% ตามลำดับ(รูปที่ 14) อีกทั้งในทุกๆอุณหภูมิของการสร้างเม็ดเจลนาโนพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสิ้นตั้งแต่ 4, 10, 20, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างกับเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนทที่เติมยางพาราที่ไม่พบกิจกรรมใดๆของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสซึ่งสอดคล้องกับลักษณะอนุภาคที่สังเกตได้จากใช้กล้อง SEM ที่เมื่อมีการผสมไฮดรอกซีอะพาไทท์ ลงไปอนุภาคจะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมและมีรูพรุนมากขึ้น จึงสามารถสรุปได้ว่าไฮดรอกซีอะพาไทท์ ที่ผสมลงไปมีส่วนทำให้โครงสร้างของเม็ดเจลนาโนเปลี่ยนไปโดยมีความเป็นรูพรุนมากยิ่งขึ้น



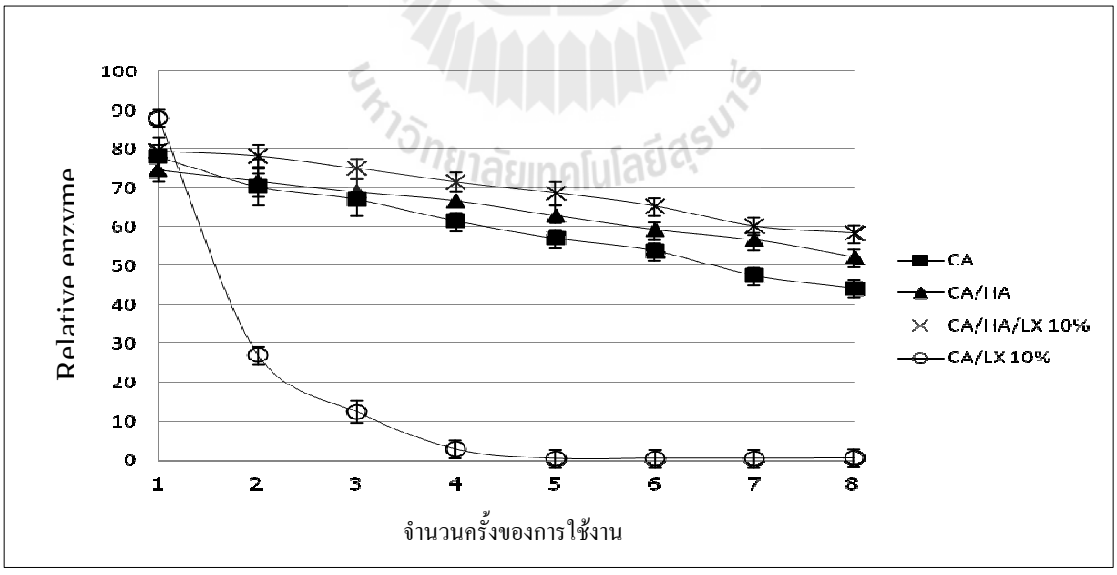
รูปที่ 13 ระยะเวลาการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ถูกตรึงในเม็ดเจลอัลจิเนทและยางพารา เม็ดเจลอัลจิเนท (a), เม็ดเจลอัลจิเนทและยางพารา 2.5% (b), เม็ดเจลอัลจิเนทและยางพารา 5% (c), และ เม็ดเจลอัลจิเนทและยางพารา 10% (d)



รูปที่ 14 ระยะเวลาการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ถูกตรึงในเม็ดเจลนาโนชนิด อัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพารา เม็ดเจลอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ (a), เม็ดเจลอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพารา 2.5% (b), เม็ดเจลอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพารา 5% (c) และ เม็ดเจลอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพารา 10% (d)

3.9 การทดสอบการนำกลับมาใช้ซ้ำของเม็ดเจลนาโนที่ใช้ตรึงเอนไซม์

หลังจากที่ผ่านกระบวนการตรึงเอนไซม์เม็ดเจลนาโนแต่ละชนิดจะถูกเก็บไว้ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.02 M (pH 4.8) โดยเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสและนำออกมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทุกๆ สองวันเป็นจำนวนทั้งสิ้น 8 ครั้ง ซึ่งผลปรากฏว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงในเม็ดเจลนาโนชนิดต่างกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึง (Norton and Vuillemard 1994; Mitsura et al., 1980) กิจกรรมของเอนไซม์ของเม็ดเจลอัลจิเนทและเม็ดเจลอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพารา ลดลง 40-50 % หลังจากผ่านการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทุกๆ สองวันเป็นจำนวนทั้งสิ้น 8 ครั้ง ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์จากเม็ดเจลอัลจิเนท-ยางพารา 10% นั้นมีค่าลดลง 30% หลังจากผ่านการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เพียงในครั้งแรกและเกือบจะไม่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์หลังจากผ่านการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไป 5 ครั้ง แต่ในทางกลับกันกิจกรรมของเอนไซม์จากเม็ดเจลอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพารา 10% ในค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดหลังจากผ่านการใช้งานไป 8 ครั้ง โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 58% ในรูปที่ 15 จากการทดสอบดังกล่าวพบว่าการตรึงเอนไซม์ในเม็ดเจลนาโนชนิดเม็ดเจลอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และหรือผสมยางพาราสามารถนำไปใช้ในกิจกรรมที่ต้องการการตรึงเอนไซม์ได้เป็นอย่างดีเพราะสามารถคงประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้เกินร้อยละ 50 หลังจากผ่านการใช้งานไปแล้ว 8 ครั้ง



รูปที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ถูกตรึงในเม็ดเจลชนิดอัลจิเนท (CA), อัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ (CA/HA), อัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพารา 10% (CA/HA/LX 10%) และ อัลจิเนท-ยางพารา 10% (CA/LX 10%)

บทที่ 4

สรุปและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

4.1 สรุปผลการทดลอง (Conclusion)

ในการทดสอบการใช้แคลเซียมอัลจิเนท, ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพาราเป็นวัสดุในการสร้างเม็ดเจลนาโนนั้น จากการทดลองการเตรียมเม็ดเจลนาโนพบว่าปริมาณของน้ำยางพาราที่เหมาะสมในการนำไปใช้คือ 2.5%, 5%, 10% และปริมาณน้ำยางพาราที่ไม่สามารถใช้ได้คือ 15% และ 20% เพราะจะทำให้เม็ดเจลจะลอยน้ำและรั่วไหลออกมาภายนอก หลังจากการทดสอบหาค่าความหนืดของสารละลายผสมทั้งหมดก่อนที่จะทำการขึ้นรูปเม็ดเจลนาโนแสดงให้เห็นว่า เมื่ออุณหภูมิของสารละลายผสมเพิ่มขึ้น ความหนืดของสารละลายจะลดลง และค่าความคงตัวของเม็ดเจลนาโนแคลเซียมอัลจิเนท/ยางพารา และแคลเซียมอัลจิเนท/ไฮดรอกซีอะพาไทท์ /ยางพารา ที่ปริมาณยางพารา 10% มีผลทำให้เม็ดเจลนาโนของทั้งกลุ่มการทดลอง มีค่าสูงที่สุดทั้งค่าที่ได้จากการทดสอบการบีบอัดและค่าที่ได้จากการทดสอบในถังหมัก หลังจากนั้นทำการทดลองค่าการดูดซับน้ำของตัวอย่างทั้งสองกลุ่มการทดลอง พบว่าเมื่อมีการผสมยางพาราลงไป ค่าการดูดซับน้ำของตัวอย่างลดลงตามสัดส่วนของยางพาราที่เพิ่มขึ้น และค่าการดูดซับน้ำลดลงมาที่สุดที่ปริมาณของยางพาราเท่ากับ 10% ทั้งนี้เนื่องมาจากยางพารานั้นดูดซึมน้ำได้น้อยมาก ซึ่งไปขัดขวางการดูดซับน้ำของเม็ดเจลนาโน จากการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าลักษณะของอนุภาคเดิมของเม็ดอัลจิเนทมีลักษณะเป็นโครงตาข่ายกระจายตัวอยู่และมีรูพรุนค่อนข้างมากแต่เมื่อมีการผสมไฮดรอกซีอะพาไทท์ลงไปมีผลทำให้โครงสร้างของอนุภาคเปลี่ยนไปเป็นเม็ดกลมกระจายตัวอยู่โดยทั่วไปและมีความเป็นรูพรุ่นที่มากขึ้น ในทางกลับกันการเติมยางพาราลงไปกลับมีผลทำให้ลักษณะของอนุภาคมีความแน่นขึ้น โดยที่อนุภาคจะมีลักษณะที่เป็นแผ่นแบนเรียงตัวซ้อนทับกัน ซึ่งการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องส่องผ่านพบว่าไฮดรอกซีอะพาไทท์ นั้นมีลักษณะเป็นแท่งคริสตัลอยู่ทั่วบริเวณ ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เองที่เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดอนุภาคก้อนกลม

การผสมกันของสารดังกล่าวได้ถูกนำไปทดสอบด้วยเทคนิค FT-IR เพื่อยืนยันการผสมกันจากการเปลี่ยนแปลงของพันธะเคมี ซึ่งพบว่าพันธะเคมีของยางพารามีการเปลี่ยนแปลงโดยมีลักษณะการย้ายตำแหน่งอันเนื่องมาจากการผสมกันของสารต่างๆ แต่กลับไม่พบพันธะใหม่เกิดขึ้นนั้นแสดง

ให้เห็นว่าการผสมกันดังกล่าวเป็นเพียงแค่การร่วมกันอยู่ของสารผสมแต่ไม่มีการรวมตัวกันของพันธะใดๆ การทดสอบการตรึงพบว่าในการเปลี่ยนแปลงปริมาณยางพาราและอุณหภูมิในระหว่างการขึ้นรูปเม็ดเจลนาโนนั้นปริมาณยางพาราที่ 10% และอุณหภูมิที่ 40 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าแทบจะไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้น นั้นเป็นเพราะเมื่อยางพาราได้รับอุณหภูมิสูง (40 และ 50 องศาเซลเซียส)ในขณะขึ้นรูป จะมีผลทำให้ยางพาราเกิดการขยายหรือพองตัวจนไปปิดรูพรุนภายในโครงสร้างของเม็ดเจลนาโนจนหมด และทำให้ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้น แต่เหตุการณ์ดังกล่าวกลับไม่พบเมื่อมีการเติมไฮดรอกซีอะพาไทท์ ลงไป โดยไฮดรอกซีอะพาไทท์ นั้นไปทำหน้าที่ในการขัดขวางการปิดกั้นรูพรุนของยางพารา และสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพเมื่อสังเกตลักษณะของอนุภาคที่เปลี่ยนรูปแบบไป และเมื่อนำเม็ลเจลนาโนชนิดต่างๆที่ผ่านขบวนการตรึงเอนไซม์อินเวอร์เทสมาทำการใช้ซ้ำ พบว่าหลังจากผ่านการใช้ซ้ำไป 8 รอบเม็ดเจลชนิดอัลจิเนท-ไฮดรอกซีอะพาไทท์ และยางพาราสามารถนำไปใช้ในการใช้ซ้ำได้ เนื่องจากยังสามารถคงประสิทธิภาพของเอนไซม์ไว้ได้ถึงกว่า 50%

4.2 ข้อเสนอแนะ (Suggestion)

1. ในอนาคตควรนำเอาเม็ดเจลนาโนมาประยุกต์ใช้ในการตรึงสารชนิดอื่น อาทิเช่น ปุ๋ย หรือสารจำพวกแร่ธาตุที่พืชจำเป็น และศึกษาประสิทธิภาพการคงทนและการปลดปล่อยเพื่อการนำไปใช้จริงในทางอุตสาหกรรม

2. การทดลองใช้วัสดุชีวภาพชนิดอื่นผสมในเม็ดเจลนาโนนั้นเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการศึกษาในอนาคต เพื่อปรับปรุงความคงทนและการปลดปล่อยของเม็ดเจลนาโนให้มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Amiji MM. (1999) Drug delivery using pH-sensitive semi-interpenetrating network hydrogels. US Patent no: 5, 904,927.

Avella, M., Pace, E.D., Immirzi, B. and Impallomeni, G. (2007). Addition of glycerol plasticizer to seaweeds derived alginates: Influence of microstructure on chemical-physical properties. Carbohydrate Polymer. 31: 165-172

Bonfield W, and Hing K.A. (2002). A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering. 13(12): 1199-1206.

Bigi A., Panzavolta, S., and Roveri, N. (1998) Hydroxyapatite-gelatin films: a structural and mechanical characterization. Biomaterials 19 739–744.

Chandra, M., and Salil K, R. (2007) Handbook of Plastics Technology. CRC Press, p. 29-30.

Chang, TMS. (2003) Artificial cells for cell and organ replacements. Artificial Organs. 28, 265-270.

De Livonniere, H. (1993) Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. Clin. Rev. Allergy 11 309–323.

Descamps, M., Hornez, J.C., and Leriche A. (2009) Manufacture of hydroxyapatite beads for medical applications. European Ceramic Society 29:369–375.

Frank W. Perrella and Anthony A. Gaspari (2002) Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. Methods 27: 77-86.

Gorka O., María D, C., Hyun J, K., Rosa M, H., Sara P., David J, M., Jose L, P,. (2009). Bioactive cell-hydrogel microcapsules for cell-based drug delivery. Control Release. 135: 203-210.

Hjelland, F. (2005) Process for the production of alginate having a high mannuronic acid-content. US Patent no: US2005/0038237 A1.

http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK3/chapter4/t3-4-l1.htm

Livonniere De, H. (1993). Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. Clinical Review Allergy. 11: 309-323.

Makuuchi, K., Yoshi, F., Ishigaki, I., Tsushima, K., Mogi, M., Saito, T. (1990) Development of rubber gloves by radiation vulcanization. Radiat. Phys. Chem. 35, 154–157.

Mitsura, W. Kato, J.; Chibata, I. (1980). Continuous production of ethanol using immobilized growing yeast cells**.** Microbial Biotechnology. 10: 275-278.

Norton S. and Vuillemard J.C. (1994). Food bioconversions and metabolite production using immobilized cell technology. Critical Review Biotechnology. 14: 193-224.

Parente, E., Crudele, M.A., Aquino, M. and Clementi, F. (1998). Alginates production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. Indust Micro Biotech. 20: 171-176.

Sethuraj MR., Mathew NM. (1992) Natural rubber: biology, cultivation and technology. Amsterdam: Elsevier, p. 80.

Shu, X.Z. and Zhu, K.J. (2002) The release behavior of brilliant blue from calcium-alginate gel beads coated by chitosan: the preparation method effect. European J. Phar. Biophar. 53, 193-201.

Sivakumar, M. and Rao, K.P. (2002) Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite–gelatin composite microspheres. Biomaterials 23 3175–3181.

Sotomea, S., Uemurab, T., Kikuchic, M., Chen, J., Itoha, S., Tanaka, J., Tateishi, T., Shinomiy, K. (2004) Synthesis and in vivo evaluation of a novel hydroxyapatite/collagen–alginate as a bone filler and a drug delivery carrier of bone morphogenetic protein. Materials Science and Engineering 24:341–347.

Taqieddin, E. and Amiji, M. (2004) Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. Biomaterials 25, 1937-1945.

Taqieddin, E., Lee, C. and Amiji, M. (2002) Perm-selective chitosan-alginate hybrid microcapsules for enzyme immobilization technology. Phar. Engineer. 22, 1-3.

Young, RJ. (1981) Introduction to polymers. London: Chapman and Hall.

Won, K., Kim, S., Kim, K., Park, H. W., Moon, S. J. 2005. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. Process Biochemistry. 40: 2149-2154.

Zhang, J., Wanga, Q. and Wang, A. (2009) In situ generation of sodium alginate/hydroxyapatite nanocomposite beads as drug-controlled release matrices. Acta Biomaterialia.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Curriculum vitae

Name: **Chokchai Wanapu (Intapruk)**

Sex: Male

Nationality: Thai

Religion: Buddhism

Home Address: 114/246 Ratchsima-Pakthongchai Road, Nong Ja Bok, Muang, Nakhon ratchasima 30000, Thailand.

Present Status: Associate Professor in Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

Education Background and Experience:

From 1978 - 1982: B.Sc. (Chemistry) from Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.

From 1982 - 1984: M.Sc. (Biochemistry) from Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

From 1991 - 1994: Ph.D. (Engineering in Biotechnology) from Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan.

From 1996 – 1997: Head of Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkla 90110, Thailand.

From 1997 – 1999: Director of Center of Scientific and Equipment, Walailak University, Nakonsritummarat 80000, Thailand.

From 1999 – 2001: Director of Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand.

From 2002 – 2005: Manager of SUT's Farm, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand.

From 2006 – 2011: Chair, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand.

Scientific Experients:

Plant and microbial molecular genetics

Fermentation Techniques

Biopolymers

Symposium:

Krongjai, T. and **Wanapu, C.** (2004) The transformation of chitinase gene into grape plants. The 4th National Symposium on Graduate Research. 94.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd. N. (2004) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. The 4th National Symposium on Graduate Research. 124.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2004) Selection of maolactic bacteria for wine fermentation. The 4th National Symposium on Graduate Research. 128.

Kuapunyakoon, T., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N. and Chervin,C. (2004) What is the gene which expression depends ethylene receptor inhibition in berry of Carbernet Sauvignon at veraison. The 4th National Symposium on Graduate Research. 93.

Cheunkum, O. and **Wanapu, C.** (2002) Production of Lactic acid from cassava solid waste.The 3rd National Symposium on Graduate Research.633-634.

Sripunya, P. and **Wanapu, C.** (2005) Selection of Yeast Strains Containing ß-glucosidase for improving Aroma in Grape Wine. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0100.

Tasing, K., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N., Wongkaew, S. (2005) Transformation of grape calli variety shiraz with Leucaena chitinase cDNA. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0109.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2005) Selection of malolactic bacteria for wine fermentation. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0116.

Lertpinyochaithaworn, N., Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2005) Ma-Maow wine production. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0139.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, F0028.

Wanapu, C., Rattana, P., Teaumroong, N. and Boonkerd, N. (2005) Success stories of stainable factory Management for the Thai traditional alcoholic beverage enterprises. In International Symposium on "Corporate sustainablility management – approaches and applications" 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-3: 1-8.

Boonkerd N., Teaumroong, N., **Wanapu C.** and Chankhun Y. (2005) Application of Bio and Bioorganic fertilizers in organic farming systems for sustainable agriculture. In International Symposium on "Corporate sustainablility management – approaches and applications" 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-4: 1-7.

Muaenjang, T. and **Wanapu, C.** (2006) The study of ethanol production of thermotolerant yeast S1 strain. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006, Bangkok.

Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2006) Isolation and classification of thermotolerant yeast for ethanol production. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006, Bangkok.

Wasuwan, R., Boonkerd, N. and **Wanapu, C.** (2006) Classification and nitrogen fixation efficiency analysis of *Azolla* species in rice fields of Thailand. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006, Bangkok.

Usansa, U., Wanapu, C. and N. Boonkerd (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand, Chaing Mai, 2005.

Usansa U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C**. Arendt, E. K., Kreisz, S. and Zarnkow, M. (2008) The use of response surface methodology to optimize malting conditions of two black rice varieties (*Oryza sativa* L. indica) as a raw material for gluten- free foods. First International Symposium on Gluten-Free Products and Beverages, Cork, Ireland, September 2008.

Usansa, U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C**. Arendt, E. K., Kreisz, S. and Zarnkow, M. (2009) The optimization of malting condition for Thai rice. 10th RGJ-Congress. Pattaya, April 2009.

Usansa, U, Geiger, E., **Wanapu, C**. and Teaumroong, N. (2009) Improvement of nitrogenous content in wort produced from rice malt. ASBC Annual Meeting. Arizona, USA June 6-10, 2009.

Kongkaew, A., Wanapu, C. and Usansa, U. (2010). Response surface optimization of wort production for brewing from rice malt using commercial enzymes and malt barley. The 16th Asian Agricultural Symposium on Agricultural Technology: Sufficiency Agriculture, August 25 – 27, 2010, Faculty of Agricultural Technology, KMITL, Bangkok, Thailand.

Satsum, A, and **Wanapu, C**. (2010). FT-IR study for hydroxyapatite/alginate nanocomposite beads. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Li, L., **Wanapu, C**., Huang, X., Huang Q., and Huang, T. (2010). Genetic variation of *Brassica napus* cultivars using SSR markers. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Kongkaew, A., Wanapu, C., and Usansa, U. (2010). Beer production from rice malt based in pilot scale brewing : chemical and sensorial properties approach. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C**. (2012). Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. Burapha University International Conference 2012, July 9-11, 2012, Burapha University, Chonburi Thailand.

Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C**. (2012). High selenium-Enriched Yeast Production. Burapha University International Conference 2012, July 9-11, 2012, Burapha University, Chonburi Thailand.

Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C**. (2012). High selenium-Enriched Yeast Production. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Lertpinyochaithaworn N, and **Wanapu, C**. (2012). Effect of ethanolic on black-kernal rice flavonoids character. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Muaenjang, T., Ponchana P., and **Wanapu, C**. (2012). Improved Enzymatic Hydrolysis of Cassava Residue by Polyethylene Glycol Addition. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C**. (2012). Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pliansrithong P., Usansa U., and **Wanapu, C**. (2012).Protein Properties in Broken Rice for optimizing of Rice Ratio in Beer Production. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Satsum, A, and **Wanapu, C**. (2012). FT-IR study for Aiginate/Hydroxyapatite/latex Nanocomposite Beads. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Scientific Publication:

Intapruk, C., Tirawanchai, N., Wilairat, P. and Panyim, S. (1984). Application of cloned malaria parasite DNA in strain identification. Mahidol University Annual Research Abstracts 11, 297.

Intapruk, C. (1984). in Manual for international laboratory workshop "Genetic engineering techniques in tropical diseases research" to be published by WHO special programme for research and training in tropical diseases, 195-204.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradubkul, S. and Panyim, S. (1984). Strain characterization of human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by the use of a cloned parasite DNA probe. Microbial utilization of renewable resources. 4, 210-213.

Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Wilairat, P., Yuthavong, Y. and Panyim, S. (1985). Cloning of repetitive DNA from *Plasmodium falciparum* and its use in strain and species identification. Mahidol University Annual Research Abstracts, 12, 250.

Intapruk, C. (1985). in Manual for national laboratory workshop "DNA cloning techniques" (in Thai) to be published by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Ministry of Science and Technology, 172-188.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradabkul, S., Sertsrivanich, R., Panyim, S., Yuthavong, Y. (1985). Recombinant DNA techniques as potential diagnostic means. Ann. Ist. Super. Sanita. 21, 299-305.

Sriroongrueng, W. and **Intapruk, C.** (1989) The prenatal diagnosis of thalassemias (in Thai). Songkla Med J. 6, 428-435.

Intapruk, C., Higashimura, N., Yamamoto, K., Okada, N., Shinmyo, A. and Takano M (1991). Nucleotide sequences of two genomic DNAs encoding peroxidase of *Arabidopsis thaliana*. Gene 98: 237-241.

Intapruk, C., Yamamoto, K., Fujiyama, K., Shinmyo, A. and Takano, M. (1993). Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana*. J Ferment Bioeng 75: 166-172.

Shinmyo, A., Fujiyama, K., Kawaoka, A. and **Intapruk, C.** (1993). Structure and expression of peroxidase isozyme genes in horseradish and *Arabidopsis*. *In*: KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel and H Greppin, eds, Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology. Univ Geneva, Switzerland, pp 222-228.

Intapruk, C., Yamamoto, K., Sekine, M., Shinmyo, A. and Takano, M. (1994). Regulatory sequences involved in the peroxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 13: 123-129.

Intapruk, C., Takano, M. and Shinmyo, A. (1994). Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 104: 285-286.

Wanapu, C. and Shinmyo, A. (1996). *cis*-Regulatory of the peroxidase gene in *Arabidopsis thaliana* involved in root specific expression and responsiveness to high-salt stress. Ann New York Acad Sci. 782 (12): 107-114.

Rodtong, S.; **Wanapu, C.** and Ishizaki, A. (2000). Starch-utilizing bacteria for L-lactic acid production. The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 52.

Kanchanatawee, S., **Wanapu, C.** and Ketudat-Cairns, M. (2000). Biotechnology postgraduate program in Thailand. Thai J. Biotechnol. 2, 55-62.

Sripo, T., Phongdara, A., **Wanapu, C.** and Caplan, A.B. (2002). Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonas salina* strain AS11. J. Biotech. 95, 171-179.

Kuapunyakoon, T. and **Wanapu, C.** (2003). Effects of diammonium phosphate (DAP) supplementation on growth rate and ethanol production of *Saccharomyces cereviseae* K1-V1116 in tamarind wine. Suranaree J. Sci. Technol. 10: 147-151.

Sripunya, P., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005). Effect of ß-glucosidase enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* on aroma production during mango (Chok-anan) wine fermentation. Thai J. Biotechnol. 6: 50-56.

Usansa, U., Sompong, N., **Wanapu, C.,** Boonkerd, N. and Teaumroong, N. (2009). The influences of steeping duration and temperature on the α- and ß- amylase activities of six Thai rice malt cultivars (*Oryza sativa* L. indica). J. Inst. Brew. 105 (2) 140-147.

Teaumroong, N., **Wanapu, C**., Chankum, Y., Arjharn, W., Sang-Arthit, S., Teaimthaisong, K. and Boonkerd, N. (2010). Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming systems in Thailand: A case study. In: Insam, H. , Franke-Whittle, I. and Goberna, M. (eds). Microbs at work: from wastes to resources. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 294-296.

Usansa, U., Burberg, F., Geiger, E., Back, W., **Wanapu, C.,** Arendt, E.K., Kreisz, S., Boonkerd, N., Teaumroong, N. and Zarnkow, M. (2011). Optimization of malting for two black rice varieties, black non-waxy rice and black waxy rice (*Oryza sativa* L. Indica). J. Inst. Brew. 117(1), 39–46.

Vechklang, K., Boonanuntanasarn, S. Ponchunchoovong, S., Pirarat N. and **Wanapu, C.** (2011). The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at the juvenile stage. Aqua. Nut., 17(6), 685-694.

Li L., **Wanapu, C.**, Huang, X., Huang, T., Li, Q., Peng, Y. and Huang, G. (2011). Comparison of AFLP and SSR for Genetic Diversity Analysis of *Brassica napus* Hybrids. J Agri. Sc. 3(3), 101-110.

Boonterm, C., **Wanapu, C**., Silapapun, A. and Boonkerd, N. (2011). Effects of nitrogen, potassium fertilized, and clusters per vine on anthocyanins content in cabernet sauvignon wine. Suranaree J. Sci. Technol. 18(1), 41-54.

Li, L., Huang, X., **Wanapu, C**., Li, Q., Huang, G. and Huang, T. (2011). Genetic diversity analysis of 25 rapeseed varieties from Guizhou rapeseed regional test by SSR marker. Guizhou Agri. Sc. 11, 1-4 (in Chinese).

Wanapu, C., Sripunya, P. and Boonkerd, N. (2012). Selection of yeast strains □-glucosidase for improving wine aroma. J. Agri. Sc. Technol. B, 2, 691-702.

Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.** (2012). Beer production from rice mait based in pilot-scale: volatile compounds and sensorial properties analysis. The Journal of King Mongkut's University of Technology. 3(1), 86-94.

Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.** (2012). Optimisation of wort production from rice malt using enzymes and barley malt. Af. J. Biotech. 11(42), 9941-9949.

Vechklang, K., Lim, C., Boonanuntanasarn, S., Welker, T., Ponchunchuwong, S., Klesius, P.H. and **Wanapu, C.** (2012). Growth performance and resistance to Streptococcus iniae of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemted with GroBiotic-A and Brewtech dried brewers yeast. J App. Aqua. 24, 183-198.

Patents: 5 Thai patents and 3 Trade Secrets.

Current Research Works:

1. The Bioprocess Control of Microbial Alginates for Industrial Production.
2. Composition of Biopolymer and Filmogenics.
3. Improvement of Bioethanol Production by Using Thermotolerant Yeasts and Bioconversion.
4. Thai Rice Beer Production.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี