สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ไซลาเนส จากเชื้อ *Aspergillus niger*

T 061747

นันทิกา ตันวิจิตร
ศิวารักษ์ เพ็ชรสาด

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 61747
วัน,เดือน,ปี 21 ก.ค. 2549
b 41603092
i

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A study of optimization and partial purification of endo-ß-1,4-xylanase from *Aspergillus niger*

Miss Nantika Tunvijit

Mr. Siwarak Phetsad

A special Project submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department Applied Biology

King Mongkut 's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*

นักศึกษา น.ส. นันทิกา ตันวิจิตร รหัส 44050182

นาย ศิวารักษ์ เพ็ชรสาด รหัส 44050214

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ปัญหาพิเศษ/โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต	
กรรมการ ผศ. อารี ฤทธิบรูณ์	
กรรมการ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*

นักศึกษา	น.ส. นันทิกา	ตันวิจิตร	รหัส 44050182
	นาย ศิวารักษ์	เพ็ชรสาด	รหัส 44050214

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2547
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์

บทคัดย่อ

เอนไซม์เอนโดไซลาเนส (endo-ß-1,4-xylanase, E.C. 3.2.1.8) ผลิตได้จากการหมักเชื้อ *Aspergillus niger* ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสมีกิจกรรมสูงสุดที่ 158.49 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการหมัก และจากการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ พบว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ พีเอช 5.0 และ 70 องศาเซลเซียส และมีค่าความคงตัวที่พีเอชช่วง 4.0-8.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีกิจกรรมที่เหลือประมาณร้อยละ 99.0 และมีความคงตัวที่ช่วงพีเอช 5.0-8.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยยังมีกิจกรรมที่เหลือประมาณร้อยละ 99.0 อุณหภูมิที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส คือ อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 นาที มีกิจกรรมเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 74.0 และเมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้วิธีทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ในช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 45 ถึง 60 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 283.92 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ผลได้เป็นร้อยละ 7.414 และจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เท่ากับ 1.55 เท่า จากนั้นนำมากำจัดเกลือและทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ที่มี molecular weight cut off ที่ 10 กิโลดาลตัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	A study of optimization and partial purification of endo-ß-1,4-xylanase from *Aspergillus niger*
Name	Miss Nantika Tunvijit Mr. Siwarak Phetsad
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2004
Special Project Advisor	Asst. Prof. Aree Rittiboon

ABSTRACT

An endoxylanase (endo-ß-1,4-xylanase, E.C. 3.2.1.8) was produced by *Aspergillus niger* fermentation. The fermentation process was performed by cultureing the fungus on a pH 4.8 liquid medium containing corn cobs as the carbon source. The culture was agitated at 200 rpm at 30°c. The maximal xylanase activity of 158.49 IU/ml was observed after 5 days fermentation. The optimal pH and temperature values of the enzyme were about 5.0 and 70°c, respectively. The enzyme was stable at 4°c, pH 4.0-8.0 and in the incubation time of 24 hours. The enzyme was also stable at 30°c, pH 5.0-8.0 and in the incubation time of 60 min.The enzyme was partially purified from the culture medium by an ammonium sulfate precipitation, with a range of 45-60% saturation. It had a specific activity of about 283.92 IU/ml and a yield 7.414%. The specific activities of the purified xylanase were increased approximately 1.55 folds. The enzyme obtained was desaltation and concentrated by ultrafiltration (10 kDa at the molecular weight cut off)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต ประธานคณะกรรมการ กรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบรูณ์ และกรรมการร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบรูณ์

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้การศึกษาและทุนอุดหนุนในการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณภาคสัตวศาสตร์ คณะเทคโนเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องมือบดอาหารสัตว์

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ต่างๆ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ญาติพี่น้อง ด้วยความเคารพยิ่ง ที่สนับสนุนและให้กำลังใจมาโดยตลอด ขอขอบคุณพี่ๆปริญญาโท เพื่อนๆ น้องๆ และทุกๆท่าน ที่มิได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้ที่ให้กำลังใจ และมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบรูณ์ด้วยดี

ศิวารักษ์ เพ็ชรสาด

นันทิกา ตันวิจิตร

เมษายน 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	
สารบัญตาราง	
สารบัญรูป	
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	3
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 โครงสร้างของไซแลน	4
2.2 โครงสร้างของไซลาโนไลติกเอนไซม์	5
2.3 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกเอนไซม์	7
2.4 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	7
2.5 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน	9
2.5.1 การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยอาศัยคุณสมบัติด้านการละลาย	9
2.5.2 การกำจัดเกลือ	11
2.5.3 อัลตราฟิวเตรชัน	12
2.5.4 เทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี	12
2.5.5 การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ	24
2.6 คุณลักษณะของเอนไซม์ไซลาเนส	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	2.6.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและค่าคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส	44
	2.6.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส	46
	2.7 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในระดับอุตสาหกรรม	48
	2.7.1 การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการฟอกเยื่อกระดาษ เพื่อกำจัดลิกนินและลดการใช้คลอรีน	48
	2.7.2 การผลิตและการนำเซลลูโลติกเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในการไฮโดรไลซิสของเสียทาง การเกษตร	49
	2.7.3 ใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสเพื่อแก้ปัญหาทางด้านพลังงานและการขาดแคลน อาหาร	50
3	วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	51
	3.1 วัสดุ	51
	3.2 อุปกรณ์	51
	3.3 วิธีการทดลอง	52
	3.3.1 การวิเคราะห์	52
	3.3.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์	53
4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	56
5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	64
เอกสารอ้างอิง		66
ภาคผนวก		71
	ก การเตรียมสาร	71
	ข วิธีการวิเคราะห์	76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* AR 1	8
2	การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* ATCC 9363	9
3	ช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนส	11
4	สารที่ใช้เป็นตัวกลางในการเชื่อมไขว้กันเป็นเม็ดเจล สำหรับเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี	17
5	ชนิดของเจลที่ใช้ในทางการค้า สำหรับการใช้งานในเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี	18
6	คุณสมบัติของ Sephadex	20
7	คุณสมบัติของ Sepharose	20
8	องค์ประกอบของ Calibration Kits	23
9	ชนิดของเมทริกซ์และกลุ่มประจุบนเมทริกซ์ (counter ion)	28
10	ชื่อทางการค้าของตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก และลบ	29
11	ชนิดและข้อบ่งใช้ของตัวแลกเปลี่ยนประจุทางการค้า	31
12	ชนิดและข้อบ่งใช้ของ Sephadex ion exchanger.	32
13	บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ	37
14	ชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุและบัฟเฟอร์ที่ใช้	38
15	ช่วงพีเอชที่เลือกใช้กับตัวแลกเปลี่ยนประจุแต่ละชนิด	38
16	ความสัมพันธ์ระหว่างการปรับค่าพีเอช และการปรับค่าความแรงประจุในการชะสารตัวอย่าง	43
17	พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ	46
18	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ	48
19	การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัวในช่วงต่างๆ ของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*	62
20	ผลการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไซลาเนส จากเชื้อ *Aspergillus niger*	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของ arabino-4-O-methylglucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้ออ่อน)	4
2	ส่วนประกอบของ O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้อแข็ง)	5
3	โครงสร้างของ O-acetyl-arabino-4-O-methylglocuronoxylan ในพืชล้มลุกพืชตระกูลหญ้า	6
4	(A) การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซแลน (B) การย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยเบต้าไซโลซิเดส	8
5	การแยกสารออกจากกันโดยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี	13
6	ค่า Vt , V_o และ V_s ของเจลที่เรียงตัวอยู่ภายในคอลัมน์	14
7	ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆ ต่อพฤติกรรมของสารตัวอย่างในขณะผ่านลงมาในชั้นเจล	15
8	กราฟมาตรฐานในการหามวลโมเลกุลของสารตัวอย่าง โดยใช้ค่า relative elution volume บนcross linked dextran column (Sephadex G-200) ที่พีเอช 7.5	16
9	โครงสร้างของ Sephadex	21
10	โครงสร้างของ polyacrylamide gels	22
11	โครงสร้างของ agarose และปฏิกริยาในขณะเกิดการสร้างเจล	22
12	ลักษณะของโครมาโตแกรมที่ได้จากการใช้ Calibration Kits ผ่านเจลฟิลเตรชัน Sephadex G-200	24
13	ขั้นตอนในการแลกเปลี่ยนประจุ	26
14	ลักษณะการกระจายประจุบนส่วนเมทริกซ์ (counter ion) บนตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกและลบ	27
15	โครงสร้างของสารที่ใช้ในการทำเมทริกซ์	30
16	โครงสร้างของ Sephadex ion exchanger	32
17	โครงสร้างของ Sepharose ion exchanger.	33
18	โครงสร้างของ DEAE-Sephacel	33
19	ขั้นตอนในการทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ	34
20	ประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนที่เปลี่ยนไปตาม pH ในการเลือกชนิดตัวแลกเปลี่ยนประจุ	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
21	การเลือกพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการทำโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุโดยวิธี Test tube trial and error.	39
22	การเติมตัวแลกเปลี่ยนประจุลงในคอลัมน์	41
23	การเติมสารตัวอย่างลงในคอลัมน์	41
24	ปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการชะสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์	42
25	อุปกรณ์ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของพีเอช หรือสารละลายเกลือ	43
26	อุปกรณ์ในการทำโครมาโตรกราฟีแลกเปลี่ยนประจุแบบอัตโนมัติ	44
27	ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*	56
28	ผลของพีเอชต่อค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*	57
29	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*	58
30	ผลของอุณหภูมิต่อค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*	59
	รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานไซโลส	79
	รูปภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานกลูโคส	80
	รูปภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานโปรตีน	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมากมาย เช่น กาก-เมล็ดฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว ซังข้าวโพด เปลือกเมล็ดธัญพืชซึ่งถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีมาก ในธรรมชาติ โดยเซลล์ของพืชประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิดคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในธรรมชาติจะมีไซแลนมากเป็นอันดับสองรองลงมาจากเซลลูโลส ซึ่งพบได้ทั้งในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน (Orlando and Edivaldo, 1993)ไซแลนเป็นส่วนประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส ซึ่งเป็นเฮเทอโรจีเนียสพอลิแซกคาไรด์ (heterogeneous polysaccha ride) ประกอบด้วยดี-ไซโลซิล (D-xylosyl) เป็นโครงสร้างหลักเชื่อมด้วยพันธะเบต้า-1,4-ลิงเกด ไซโลส (β-1,4-linked xylose) และมีอะราบิโนซิล (arabinosyl) หรือมีโซ่กิ่งเป็นเมทิลกลูคูโรนิล (methylglucuronyl side chains) กรดกลูคูโลนิค (gluculonic acid) และกรดอะราบิโนกลูคูโรนิค (arabinuglucuronic acid) (Wong , Tan and Saddler, 1988)

เนื่องจากไซแลนเป็นส่วนประกอบที่มีน้ำตาลหลายชนิด ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยจะต้อง มีหลายชนิด ได้แก่ เบต้า-1,4-เอนโด-ไซลาเนส (β-1,4-endo-xylanase, E.C. 3.2.1.8) และเบต้า-ไซโลซิเดส (β-xylosidase, E.C. 3.2.1.37) จะทำการย่อยโครงสร้างหลักซึ่งเอนไซม์ชนิดแรกจะเข้า จับระหว่างพันธะไซโลซิดิก และเอนไซม์ชนิดที่สองจะทำการปลดปล่อยอนุมูลของไซโลซิลออกมาโดยเข้าจับที่ปลายสุดของไซโลโอลิโกแซกคาไรด์ ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองเป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายไซแลน ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยทางชีวภาพ เช่น *Trichoderma Aspergillus Schizophilium Bacillus Clostridium* และ *Streptomyces* (DEkker, 1985; Hashimoto, Muramatsu and Funatsu, 1971; Kolarova, Farkas, 1983 and Tan *et al*, 1985) อย่างไรก็ตามในการย่อยสลายจะสำเร็จได้จะต้องมีเอนไซม์ที่ทำการย่อยสายโซ่กิ่งด้วย

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการฟอกเยื่อกระดาษจะใช้สารเคมี คือ คลอรีนและด่างเข้มข้นซึ่งก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก จากปัญหาข้างต้นอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ จึงเปลี่ยนมาใช้วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและใช้พลังงานน้อยกว่ามา เป็นอีกทางเลือกหนึ่งคือ เอนไซม์ไซลาเนสสามารถใช้ย่อยสลายไซแลนได้ การทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสจะช่วยในการย้ายไซแลนออกจากเยื่อไม้ ทำให้การแยกลิกนินออกจากเยื่อไม้โดยการใช้สารเคมีทำได้ง่ายขึ้น และเอนไซม์ไซลาเนสจะช่วยทำให้กระดาษมีความสว่างขึ้น เป็นการลดการใช้สารเคมีให้น้อยลง รวมทั้งช่วยลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังได้มีการนำเอนไซม์ไซลาเนสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อาหาร-สัตว์ สิ่งทอ (Wong, Tan and Saddler, 1988) Kang และคณะ (2004) กล่าวว่า ในอุตสาหกรรมเนื้อเยื่อและกระดาษใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส ในการฟอกขาวเนื้อเยื่อ บำบัดน้ำเสียจากโรงงาน และทำการสกัดหมึกออกจากกระดาษรีไซเคิล (recycle) ซึ่งได้ประสบความสำเร็จในการทดลอง (Gübitz *et al,* 1998 and Bajpai, 1999) และกระตุ้นให้เกิดความสนใจในการผลิตเอทานอล (ethanol) ซึ่งจะเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ ในขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสได้พบปัญหาหลักในการย่อยสลาย เนื่องจากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสจะได้ กลูโคสและไซโลสในการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งสองนี้ไปเป็นเอทานอลมีความสำคัญอย่างมากต่อเศรษฐกิจ ซึ่งการย่อยจะใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสในการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสไปเป็นพลังงาน (Miclenz, 2001)

เอนไซม์จากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นหน่วยย่อยของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ รวมทั้งคุณลักษณะทางด้านจลนพลศาสตร์ ในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ การทำงานของเอนไซม์หรือการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ที่ต้องการความจำเพาะสูงต้องใช้เอนไซม์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยหลายกระบวนการ ได้แก่ การทำโครมาโตกราฟีโดยใช้ตัวกลางชนิดต่างๆ เพื่อแยกโปรตีนออก โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลหรือประจุ

ในโครงงานพิเศษได้กล่าวถึง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซ-ลาเนสและการทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนจากเชื้อ *Aspergillus niger* (เรวดี ปรีบัว , 2547) ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส (crude enzyme) จะทำการศึกษาพีเอชที่เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสม ความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ ความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ และการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนจะ ใช้วิธีต่างๆ คือ วิธีการทำการตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] แยกเกลือออกด้วยคอลัมน์ (desalting) และอัลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration)

การทดลองผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ประเภทนี้ และถ้ามีการพัฒนาและนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อประเทศในด้านเศรษฐกิจ ทำให้ไม่จำเป็นที่จะต้องสั่งซื้อเอนไซม์จากต่างประเทศแต่เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยสนับสนุนให้มีการใช้วัตถุดิบภายในประเทศที่มีราคาถูกให้เป็นประโยชน์มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*

2. ศึกษาการแยกเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* ในอาหารเหลว เป็นเวลา 5 วัน โดยในแต่ละวันจะต้องทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส แล้วนำมาเปรียบเทียบดูทั้ง 5 วัน ว่าวันที่เท่าไรกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด

2. นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและค่าความคงตัวของเอนไซม์ โดยทำการศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ รวมทั้งค่าความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ กัน

3. นำเอนไซม์ไซลาเนสมาทำการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนจะใช้วิธีต่างๆ คือ วิธีการทำการตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ การแยกเกลือออกด้วยคอลัมน์ (desalting) และอัลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration)

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* (เรวดี ปรีบัว, 2547) ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส (crude enzyme) จะทำการศึกษาพีเอชที่เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสม ค่าความคงตัวของเอนไซม์ ที่พีเอชต่างๆ ค่าความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ และการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนจะใช้วิธีต่างๆ คือ วิธีการทำการตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ แยกเกลือออกด้วยคอลัมน์ (desalting) และอัลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแนวทางในการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่มีราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอนแทนไซแลนที่มีราคาแพง ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้วิธีหนึ่ง

2. เป็นแนวทางที่ให้ได้ไซลาเนสที่บริสุทธิ์เพื่อที่ประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

3. เพื่อเป็นแนวทางในการทำวิจัยขั้นสูงต่อไป

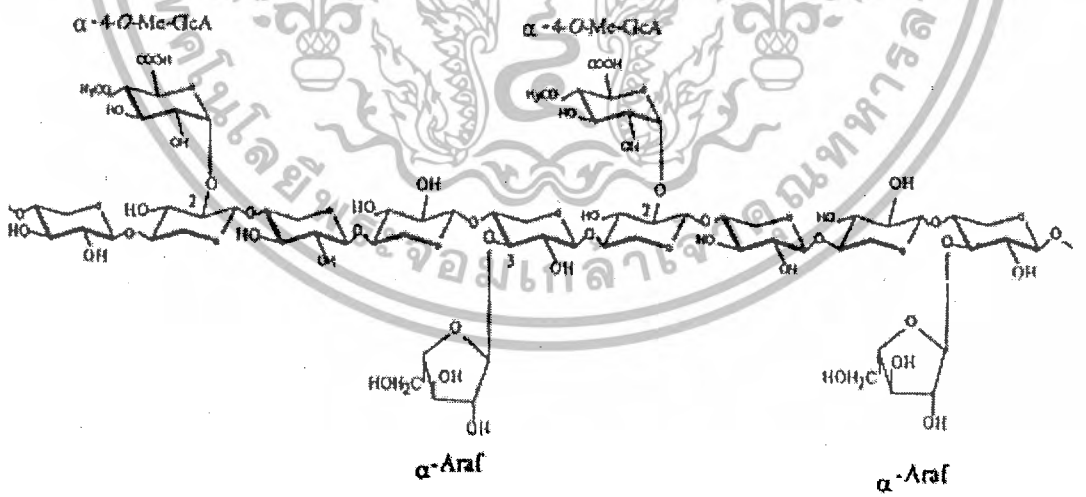
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างของไซแลน

ไซแลนเป็นคาร์โบไฮเดรตหลักที่พบในผนังเซลล์พืช ในไม้เนื้ออ่อนพบประมาณร้อยละ 7 ถึง 10 และไม้เนื้อแข็งพบประมาณร้อยละ 15 ถึง 30 ไซแลนมีโครงสร้างหลักเป็นเบต้า-ดี-ไซโลส (β-D-xylose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic) และมีโซ่กิ่งเป็นพวกอะซิทิล (acetyl) 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรซิล (4-O-methy-D-glucurosyl) และกลุ่มแอล-อะราบิโนฟูราโนซิล (L-arabinofuranosyl group)

ไซแลนในไม้เนื้ออ่อน ได้แก่ อะราบิโน–4–โอ–เมทิลกลูคูโรโนไซแลน (arabino-4-O-methyl-glucuronoxylan) ซึ่งกรด 4–โอ–เมทิลกลูคูโรนิค (4 – O – methylglucuronic acid) สร้างพันธะอัลฟา-1,2 ไกลโคซิดิก (α-1,2 glycosidic bond) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของไซโลสในโครงสร้างหลัก และมีแอล-อะราบิโนฟูราโนไซด์ (L-arabinofuranoside) เชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาลไซโลส ด้วยพันธะเบต้า-1,3 ไกลโคซิดิก (α-1,3 glycosidic bond) ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนไม่พบหมู่อะซิทิล รีซิดิว (acetyl residue) และไซแลนในไม้เนื้ออ่อนมีอัตราส่วนของไซโลสต่อกรด4-โอ-เมทิลกลูคูโรนิคต่ออะราบิโนส(arabinose) เท่ากับ 8 ต่อ 1.6 ต่อ 1

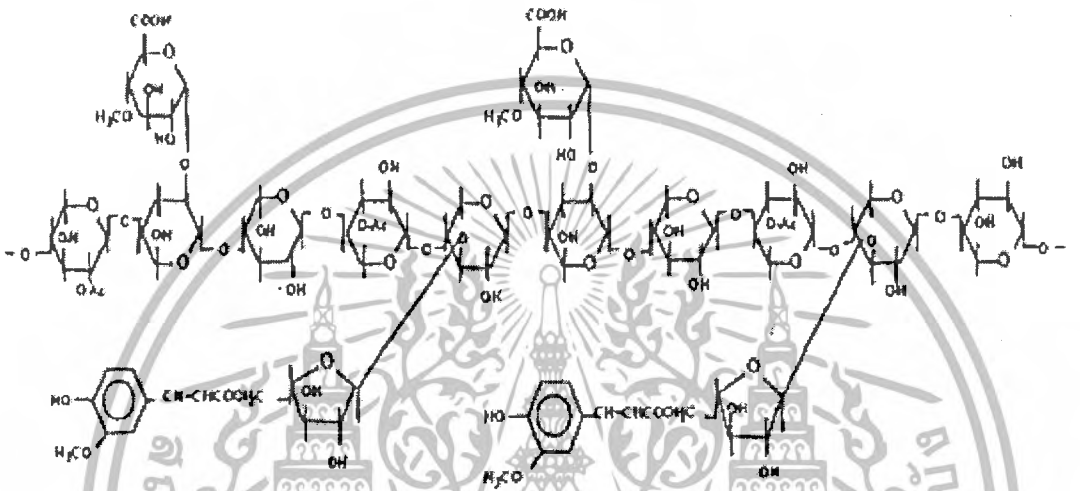


รูปที่ 1 ส่วนประกอบของอะราบิโน-4-โอ-เมทิล-กลูคูโรโนไซแลน (arabino-4-O-methyl-glucuronoxylan) ในไม้เนื้ออ่อน

ที่มา : Viilkari; *et. al.* (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซแลนในไม้เนื้อแข็งได้แก่ โอ-อะซิทิล-4-โอ-เมทิล-กลูคูโรโนไซแลน (O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan) ไซแลนในไม้เนื้อแข็งจะมีอัตราส่วนของไซโลสต่อกรด4-โอ-เมทิลกลูคูโรนิคต่อกรดอะซิติก (acetic acid) เท่ากับ 10 ต่อ 1 ต่อ 7 โดยที่ไซแลนในไม้เนื้อแข็งมีหมู่อะซิทิล (acetyl residue) เชื่อมต่อกับไซโลสในสายโครงสร้างหลักที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 อยู่เป็นจำนวนมาก และทุกๆ 10 โมเลกุลของไซโลสพบกรด 4-โอ-เมทิลกลูคูโรนิคเชื่อมต่อกับไซโลสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของไซโลส (รูปที่ 2)



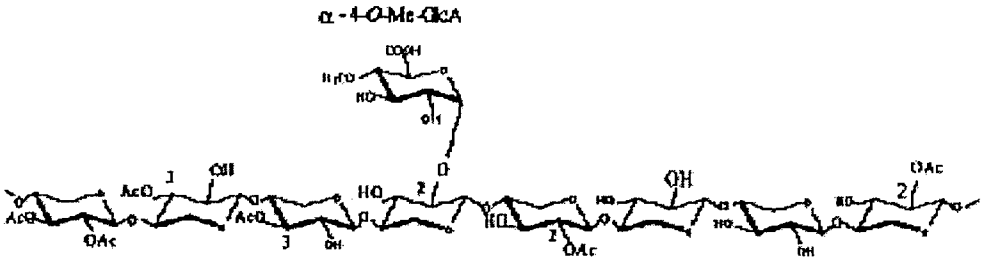
รูปที่ 2 ส่วนประกอบของโอ-อะซิทิล-4-โอ-เมทิล-กลูคูโรโนไซแลน (ไซแลนในไม้เนื้อแข็ง)
ที่มา : Viilkari; *et. al.* (1993)

ไซแลนในไม้ล้มลุกและพืชตระกูลหญ้า ได้แก่โอ-อะซิทิล-อะราบิโน-4-โอ-เมทิลกลูคูโรโนไซแลน (O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan) ไซแลนในไม้ล้มลุกมีโซ่กิ่งเป็นกรด4-โอ-เมทิลกลูคูโรนิคน้อยกว่าในไม้เนื้อแข็ง โดยส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแอล-อะราบิโนฟูราโนซิล ซึ่งเชื่อมต่อกับไซโลสในโครงสร้างหลักที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 หรือทั้งสองตำแหน่ง นอกจากนั้นพบกลุ่มอะซิทิล (acetyl group) ร้อยละ 2 ถึง 3 เชื่อมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ในน้ำตาลไซโลสของโครงสร้างหลัก และมีโซ่กิ่งอะราบิโนซิล (arabinosyl side chain) ประมาณร้อยละ 6 และมีพี-โคมาโรซิล (*p*-coumarosyl) ประมาณร้อยละ 3 ดังรูปที่ 3

2.2 ไซลาโนไลติกเอนไซม์ (Xylanolytic enzymes)

ไซลาโนไลติกเอนไซม์ เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเฮมิเซลลูโลส ไซลาโนไลติกเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 โครงสร้างของโอ-อะซิทิล-อะราบิโน-4-โอ-เมทิลกลูคูโรโนไซแลน ในพืชล้มลุกพืชตระกูลหญ้า

ที่มา : Viilkari; *et. al.* (1993)

กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก ประกอบด้วยเอนไซม์ดังนี้

1. เบต้า-1,4 –เอนโดไซลาเนส (1,4-β-D-xylan xylohydrolase; E.C. 3.2.1.8)

ย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4 ไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic) จากด้านในสายของไซแลนอย่างสุ่ม การย่อยสลายขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น เช่น ความยาวของสายไซแลน และจำนวนกิ่งก้าน ในช่วงแรกของการย่อยสลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ เมื่อเกิดการย่อยสลายต่อไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จะถูกย่อยสลายเป็นไซโลไตรโอส ไซโลไบโอสและไซโลส ตามลำดับ

2. เบต้า-ไซโลซิเดส (β-D-xyloside xylohydrolase; E.C. 3.2.1.37)

เป็นเอ็กโซไกลโคซิเดส (exoglycosidase) ที่ย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ และไซโลไบโอสจากปลายด้าน non-reducing และสามารถย่อยสลาย artificial substrate เช่น p-nitrophenyl-β-D-xyloside การทำงานของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสต่อการย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ลดลงเมื่อสายของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายไซ-แลนได้ แต่อัตราการย่อยสลายเกิดได้ช้ามากโดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส

กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้าน ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ กัน คือ

1. อัลฟา- แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (α-L-arabinofuranosidase; E.C. 3.2.1.55)

เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายไซแลนโดยเฉพาะไซแลนในไม้เนื้ออ่อน อะราบิโนฟูราโนซิเดสแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ อัลฟา- แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (exo-action α-L-arabinofuranosidase; E.C 3.2.1.55) ซึ่งสามารถย่อยสลายพี-ไนโตรฟีนิล อัลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (*p*-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside) และสาขาของอะราบิแนน (arabinan) ส่วนอีกชนิดหนึ่ง คือ เอนโด-1,5-อัลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (endo-1,5-α-L-arabinofuranosidase; E.C. 3.2.1.99) มีผลเฉพาะต่ออะราบิแนนที่เป็นเส้นตรงเท่านั้น และพบว่าการทำงานร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของอัลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดสกับไซลาเนสทำให้ได้ไซโลส ไซโลไบโอสและอะราบิโนส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนเพิ่มขึ้น

2. อัลฟา-กลูคูโรนิเดส (α-glucuronidase; E.C. 3.2.1.139)

ย่อยสลายพันธะอัลฟา-1,2 (α-1,2 linkage) ระหว่างไซโลสและกรดดี-กลูคูโรนิค (D-glucuronic acid) หรือ 4-โอ-เมททิล อีเธอร์ (4-O-methyl ether) ที่พบในกลูคูโรโนไซแลน ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์อัลฟา-กลูคูโรนิเดสขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์

3. อะเซททิลไซแลนเอสเตอเรส (acetylxylan esterase; E.C. 3.1.1.6)

ย่อยสลายพันธะระหว่างหมู่โอ-อะซิทิล ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในสาย ของอะซิทิลไซแลน (acetylxylan)

2.3 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกเอนไซม์

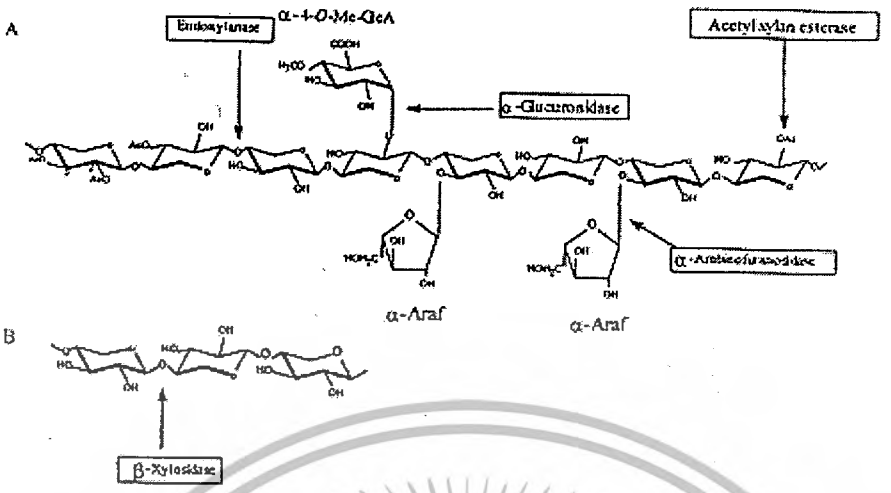
ไซแลนมีโครงสร้างที่ซับซ้อน การย่อยสลายให้สมบูรณ์จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันในกลุ่มของไซลาโนไลติกเอนไซม์หลายชนิดเข้าช่วยในการทำปฏิกิริยา ซึ่งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลักได้แก่ เอนโดไซลาเนส และเบต้า-ไซโลซิเดส ส่วนเอนไซม์ที่ย่อยสลาย ส่วนที่เป็นกิ่งก้านได้แก่ อัลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส อัลฟา-กลูคูโรนิเดส และอะซิททิล ไซแลน-เอสเตอเรส ดังรูปที่ 4

Haltrich และคณะ (1994) รายงานว่า *Sclerotinum rolfsii* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส รวมทั้งมีการทำงานรวมกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในการย่อยสลายไซแลนไปเป็นไซโลส

2.4 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

เอนไซม์ไซลาเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ แอคติโนมัยสีท โปรโตซัว พืช แมลงและสัตว์ทะเลบางชนิด เอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่นิยมศึกษามักมาจากจุลินทรีย์ เนื่องจากเจริญได้รวดเร็ว เพาะเลี้ยงได้ง่าย จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) แต่ก็มีบางชนิดที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทำงานภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) เช่น *Aspergillus niger* , *Aspergillus foetidus* , *Butyrivibrio fibrisovens* การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเริ่มผลิตในระยะที่มีการเจริญคงที่ (stationary growth phase) เช่น *Pseudomonas stuzeri* , *Streptomyces sp.*, *Aspergillus niger* แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานว่า การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเกิดไปพร้อมๆ กับการเจริญ ประสิทธิภาพของการผลิตไซลาโนไลติกเอนไซม์นั้นขึ้นอยู่กับการเลือกใช้สับสเทรต และส่วนประกอบของอาหารที่เป็นตัวชักนำการผลิตเอนไซม์อย่างเหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 (A) การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซแลน

Ac: หมู่อะซิทิล; α-Araf: อัลฟา-อะราบิโนฟูราโนส; α-4-O-Me-GlcA: กรดอัลฟา-4-โอ-เมธิลกลูคูโรนิก

(B) การย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยเบต้าไซโลซิเดส

ที่มา: Sunna และ Antranikian (1997)

ตัวอย่าง การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เศษวัสดุทางเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงดังตารางที่ 1 , 2 และ 3

ตารางที่ 1 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* AR1

แหล่งคาร์บอน	ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
ไซแลน	24.0
แล็คโตส	3.5
ซูโคส	3.3
มอลโตส	0.7
กลูโคส	0.0
อะราบิโนส	7.0
ไซโลส	38.0
ซังข้าวโพด	19.3
ชานอ้อย	16.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* AR1 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
ฟางข้าว	30.0
ฟางข้าวสาลี	20.0

ที่มา: Anthony, *et al.* (2003)

ตารางที่ 2 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* ATCC 9363

แหล่งคาร์บอน	ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
ไซแลน	0.39
เปลือกถั่วแฮเซล (hazelnut)	0.42
ลำต้นข้าวสาลี	0.70
กากถั่วเหลือง	0.74
ฟางข้าวสาลี	1.50
ซังข้าวโพด	2.81

ที่มา: Ufuk, *et al.* (2001)

2.5 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน ประกอบด้วยหลายกระบวนการทั้งนี้เพื่อแยกเอาสารที่ไม่ต้องการออกไปให้หมด วิธีการนั้นทำได้โดย

2.5.1 การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยอาศัยคุณสมบัติด้านการละลาย

โปรตีนสามารถละลายอยู่ในน้ำได้มีเหตุผลหลักสองประการ คือ โมเลกุลของโปรตีนมีส่วนที่ชอบน้ำ สามารถเกิดแรงกริยากับน้ำได้เรียกส่วนนี้ว่า hydrophilic patches สามารถเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าเอาโมเลกุลของน้ำมาล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนได้ อีกสาเหตุหนึ่ง คือ บนโมเลกุลของโปรตีนมีประจุไฟฟ้าสุทธิ (electrostatic repulsion) สูงกว่าแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิต ทำให้โมเลกุลของโปรตีนอยู่ห่างกัน จึงไม่สามารถรวมตัวเข้ามาอยู่ใกล้กันแล้วตกตะกอนลงมาได้ ดังนั้นปัจจัยใดก็ตามที่สามารถเพิ่มปฏิกริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกันเอง (protein - protein interaction) หรือการลดปฏิกริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและน้ำ (protein - water interaction) ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลดลง ทำให้โปรตีนตกตะกอนในที่สุด สำหรับการตกตะกอนโปรตีนโดยวิธีที่ไม่ทำให้เกิดการเสียสภาพ ได้แก่

1.) การตกตะกอนที่ค่าจุดไอโซอิเลคทริค (Isoelectric pH) เรียกวิธีการนี้ว่า Isoelectric precipitation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.) การตกตะกอนโปรตีนโดยการเพิ่มความแรงอิออน ด้วยวิธีการตกตะกอนแบบลำดับส่วนด้วยเกลือ (ionic strength หรือ salt fractionation precipitation)

3.) การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำ (organic solvent precipitation)

บนโมเลกุลของโปรตีนสามารถแบ่งส่วนที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการตกตะกอนได้เป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่ชอบน้ำ สามารถเกิดแรงดึงดูดกับน้ำได้ดี (hydrophilic patches) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic patches)

การตกตะกอนโดยอาศัยหลักการเพิ่มค่าความแรงของอิออนโดยใช้เกลือ เป็นการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง เรียกวิธีการนี้ว่า " salting out " เป็นการเติมเกลือ ลงไปในสารละลายโปรตีนผสม เพื่อเพิ่มความแรงอิออน (ionic strength) ของสารละลายให้สูงขึ้น จนกระทั่งอิออนของเกลือไปแย่งโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนออกมาล้อมรอบโมเลกุลของเกลือเอง อาจกล่าวได้ว่าเป็นการแข่งขันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและโมเลกุลของเกลือในการเกิดแรงกริยาทางไฟฟ้ากับโมเลกุลของน้ำนั่นเอง เมื่อใดก็ตามที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับน้ำมีค่าเหลือน้อยกว่าแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับโปรตีน โปรตีนก็จะจับตัวกันตกตะกอนลงมา

การรวมตัวกันของโปรตีนเกิดจากส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนโมเลกุลของโปรตีน แต่ละโปรตีนเคลื่อนที่เข้ามาอยู่ใกล้กันโดยแรงดึงดูดระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำด้วยกันเอง เกิดเป็นกลุ่มก้อนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อน้ำหนักสะสมเพิ่มขึ้น ก็เกิดการตกกะกอนลงมาเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "salting out effect" เกลือที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ เนื่องจากเกลือชนิดนี้มีค่าการละลายน้ำสูงมาก และมีค่าสัมประสิทธิ์อุณหภูมิของการละลายค่อน ข้างต่ำ (temperature coefficient of solubility) ในช่วง 0 ถึง 30 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถใช้ ในการตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำได้ โดยไม่เกิดการสลายตัวของโครงสร้างโปรตีนหรือ เอนไซม์ที่สลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงได้ นอกจากนี้ยังมีเกลือชนิดอื่นที่นิยมใช้ในการตกตะกอน โปรตีน เช่น โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต โปตัสเซียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต เป็นต้น โดยเกลือที่มีประจุแบบไดวาเลนต์ (divalent ion) เช่น SO_4^{-2} และ ไตรวาเลนต์ (trivalent ion) เช่น PO_4^{-3} จะให้ผลในการตกตะกอนได้ดีกว่าพวกที่มีอิออนเดี่ยว (univalent ion) เช่น Cl^{-1} ตัวอย่างเช่น เกลือฟอสเฟตสามารถให้ค่า ionic strength สูงเป็น 3 เท่าของเกลือคลอไรด์ถ้าใช้ความเข้มข้น เป็นโมลาร์เท่ากัน

ในกรณีที่มีโปรตีนผสมหลายๆ ชนิดรวมอยู่ด้วยกัน สามารถแยกตกตะกอนโปรตีนออกเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ โดยการทำ salting out ที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆ กัน เรียกวิธีนี้ว่า " salt fractionation "โดยเลือกตกตะกอนโปรตีนเป็นช่วงๆ ความเข้มข้น

ข้อดีของการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Scopes, 1978; อารี, 2547)

1. เป็นการเพิ่มปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน

2. ละลายได้สูง (ประมาณ 4 โมล สารละลายอิ่มตัวร้อยละ 100)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. มีความสามารถละลายได้สูงถึงแม้ว่าอุณหภูมิต่ำ

4. สารละลายอิ่มตัวมีความหนืดต่ำ และมีความหนาแน่นต่ำ ทำให้แยกตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยงออกได้ง่าย

5. ราคาถูกและใช้ได้สะดวกรวดเร็ว

6. ใช้ตกตะกอนเอนไซม์ปริมาณมากๆ ได้

7. ไม่ทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ

ตัวอย่าง การตกตะกอนโปรตีนเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนส

แหล่งเอนไซม์	ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus kawachii	60	Ito, *et al.* (1992)
Aspergillus ochraceus (mutant)	30-60	Biswas, *et al.* (1990)
Aspergillus pullulans Y-2311-1	30-50	Li, *et al.* (1993)
Bacillus pumilus IPO	20-60	Panbangred, *et al.* (1983)
Humicola lanuginose	60	Vichien, *et al.* (1984)
Rhizopus oryzae ATCC 9363	40-75	Ufuk, *et al.* (2001)
Streptomyces roseiscleroticus	30-50	Grabski และ Jeffries (1991)
Thermophilic Fungus Strain HG-1	20-80	Masanobu, *et al.* (1997)

2.5.2 การกำจัดเกลือ (desalting)

การกำจัดเกลือหรือแยกสารอนุภาคเล็กๆ ที่ปะปนมาได้โดยวิธีไดแอไลซิส (dialysis) ซึ่งเป็นการแยกสารโมเลกุลเล็กออกจากโมเลกุลใหญ่โดยใช้ semipermeable membrane เช่น cellophane bags (Araujo and D'Souza, 1986) cellulose-based dialysis tube (Grabski and Jeffries, 1991) นอกจากนี้อาจกำจัดเกลือด้วยการกรองด้วยเจล (gel filtration) โดยอาศัยความแตกต่างของ น้ำหนักโมเลกุล อนุภาคสารที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของเจลเมื่อถูกชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จะ ถูกชะออกมาก่อน เนื่องจากอนุภาคขนาดเล็กจะเข้าไปอยู่ในรูพรุนของเม็ดเจลทำให้หลุดออกมาใน ช่วงหลัง มีรายงานการใช้เม็ดเจลต่อไปนี้ในการกำจัดเกลือ เช่น Sephadex G-25 (Hurst, *et al.*, 1977; Ricardo, *et al.*, 1985) Sephadex G-50 (Matanguihan, *et al.*,1985) BioGel P-6DG (Huang, *et al.*, 1991) Biogel-P2 (Ito, *et al.*, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 อัลตราฟิวเตรชัน (Ultrafiltration)

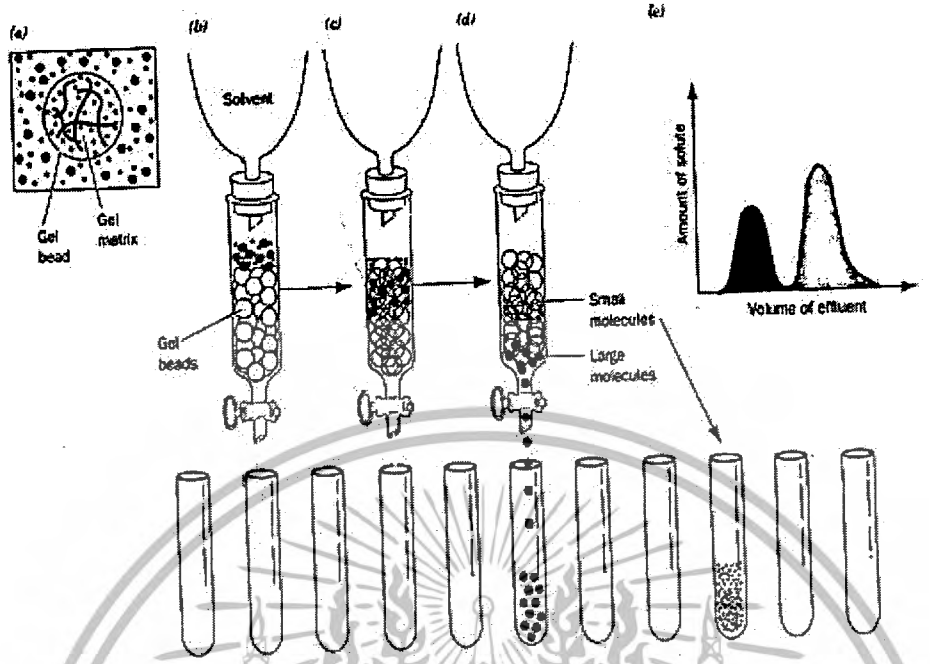
เป็นกระบวนการที่แยกสารด้วยการใช้เมมเบรน (membrane) ซึ่งจะใช้หลักการแยกสาร ตามน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) และขนาด (size) โดยน้ำหนักโมเลกุลที่ใช้แยกจะอยู่ระหว่าง 1,000 ถึง 100,000 ดาลตัน การกรองระดับโมเลกุลนี้เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับแยกเกลือ ต่างๆและแยกตัวถูกละลายที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำออกจากชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ในการกรองจะมีการให้ความดันแก่สารละลายระหว่าง 1 ถึง 10 บรรยากาศ ซึ่งตัวทำละลายส่วนใหญ่จะเป็นน้ำและสารโมเลกุลเล็กจะสามารถผ่านเมมเบรน ในขณะเดียวกันสารโมเลกุลขนาดใหญ่จะถูกกักไว้ ในกรณีที่นำมาดัดแปลงใช้กับเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์จะเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะถูกเมมเบรนกักไว้ ส่วนน้ำและสารที่มีโมเลกุลเล็กๆ จะลอดผ่านเมมเบรนออกมาได้ ในการกรองระดับโมเลกุลนี้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่แตกต่างที่ผ่านเมมเบรนมากกว่าความแตกต่างของตัวถูกละลาย ดังนั้นในการกรองระดับโมเลกุลจะแยกตัวถูกละลาย และความเข้มข้นของสารที่ต้องการแยกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

2.5.4 เทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (gel filtration chromatography) หรือ Size exclution หรือMolecular sieve chromatography

เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างกันของขนาด มวล และรูปร่างของสารตัวอย่าง (Voet และ Voet , 1990) ค้นพบเมื่อปี 1959 โดยการศึกษาของ Porath และ Flodin ที่ห้องวิจัย AB-Pharmacia Research ในประเทศสวีเดน (Unger ,1990) เพื่อใช้ในการแยกโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้โพลีเมอร์สังเคราะห์จากเดกซ์แทรน และ epichlorohydrin เป็นตัวกลางในการแยก ต่อมาในปี 1962 ได้มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการแยกเกลือและสารโมเลกุลเล็กอื่นๆแยกออกจากสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่

ทฤษฎีของเทคนิคเจลฟิลเตรชัน คืออาศัยคุณสมบัติของเม็ดเจลที่มีลักษณะช่องว่างภายในที่เกิดจากการเชื่อมไขว้ ของโพลีเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเจล (gel matrix) โดยภายในเม็ดเจลแต่ละเม็ดมีขนาดช่องว่างที่จำเพาะยอมให้สารที่มีขนาดโมเลกุลค่าหนึ่งผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่กว่าไม่สามารถผ่านเข้าไปได้ถูกชะออกมากับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะหลุดออกจากคอลัมน์ก่อน จากหลักการข้างต้นเห็นได้ว่าสามารถแยกสารที่มีขนาดเล็กและใหญ่ออกจากกันได้ โครงสร้างของเม็ดเจลและการแยกสารตามขนาดโมเลกุลในขณะผ่านลงมาตามคอลัมน์ แสดงดังรูปที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 การแยกสารออกจากกันโดยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

ที่มา : Voet; *et. al.* (1990)

จากรูปที่ 5 สามารถอธิบายกลไกในการแยกสารโดยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน ได้ดังนี้

ก) แสดงดังลักษณะของเม็ดเจล ประกอบด้วยส่วนเมตริกซ์เกิดจากการเชื่อมไขว้ของโพลีเมอร์สายยาว โดยระหว่างเส้นสายเหล่านี้มีช่องว่างอยู่ จากรูปเห็นได้ว่ามีสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กผ่านเข้าไปวนอยู่ในช่องว่างนี้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปภายในช่องว่างดังกล่าวได้

ข) แสดงการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างขณะเคลื่อนเข้าสู่ชั้นเจล

ค) โมเลกุลที่มีขนาดเล็กแทรกผ่านเข้าไปในช่องว่างภายในเจล ทำให้วนเวียนอยู่ภายในเม็ดเจลทำให้ใช้เวลานานกว่าจะหลุดออกมาภายนอกเจลได้ ในขณะที่สารที่มีขนาดใหญ่ถูกชะผ่านลงมาตามคอลัมน์ก่อน

ง) สารโมเลกุลใหญ่เคลื่อนที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ในขณะที่สารขนาดเล็กกำลังถูกชะให้ไหลผ่านลงมาตามคอลัมน์ ดังนั้นสารที่มีขนาดเล็กย่อมหลุดออกมาจากคอลัมน์ในภายหลัง

จ) แสดง elution diagram ของโครมาโตแกรม (chromatogram) ใช้บอกถึงลำดับหรือช่วงเวลาของการแยกสารที่มีขนาดต่างกันออกจากกัน โดยการเพิ่มขึ้นของกราฟในช่วงแรกเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนที่มีขนาดอนุภาคใหญ่ส่วนเส้นกราฟในช่วงหลังเป็นของโปรตีนที่มีขนาดเล็ก

โมเลกุลสารตัวอย่างที่ผ่านชั้นเจลในคอลัมน์ สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงได้โดยการพิจารณาจากความสัมพันธ์ระหว่างค่าต่างๆ เมื่อกำหนดให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

V_t= Total bed volume คือปริมาตรรวมของสารทุกอย่างที่อยู่ภายในคอลัมน์

V_e = Elution volume คือ ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการชะ หรือปริมาตรสารละลายที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ทั้งหมดในการชะสารตัวอย่างจนออกจากคอลัมน์

V_O = Void volume คือปริมาตรระหว่างเม็ดเจล ทราบได้จากการใช้สารที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ ทำให้ทราบปริมาตรของช่องว่างระหว่างเม็ดเจลทั้งหมดได้ ตัวอย่างสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ที่นิยมใช้ เช่น Blue dextran

V_I = Internal volume คือ ปริมาตรของช่องว่างภายในเม็ดเจล หาได้จากการผ่านสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมากๆเข้าไปภายในเม็ดเจล ตัวอย่าง เช่น Bromophenol blue

V_S = Stationary gel volume คือ ปริมาตรของเม็ดเจลทั้งหมด มีค่าเท่ากับ $V_t - V_O$

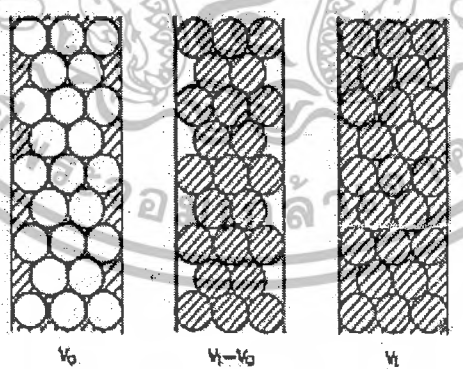
ปริมาตรของตัวชะ V_eเป็นฟังก์ชันของ V_O และ V_I แสดงความสัมพันธ์ดังสมการ

$$V_t = V_O + V_I + V_e \quad \text{..... (1)}$$

$$V_e = V_O + K_d V_I \quad \text{เมื่อ } V_e = f(V_O, V_I) \quad \text{..... (2)}$$

$$K_d = (V_e - V_O) / V_I = \text{distribution constant} \quad \text{..... (3)}$$

ในกรณีของตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่มากอาจกล่าวได้ว่า $V_e = V_O$ คือ ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการชะไล่สารออกมามีค่าเท่าปริมาตรของช่องว่างระหว่างเม็ดเจลภายในคอลัมน์ ในกรณีนี้ค่า K_d มีค่าเท่ากับศูนย์ หมายความว่าไม่มีสารใดสามารถผ่านเข้าไปในช่องว่างภายในเม็ดเจลได้เลยในทางตรง กันข้ามในกรณีที่สารตัวอย่างมีขนาดเล็กมากๆ สามารถผ่านเข้าไปวนภายในช่องว่างภายในเม็ดเจลได้ ค่า $V_e = V_t + V_O$ ค่า K_d มีค่าสูงสุดเท่ากับหนึ่ง ดังนั้นเห็นได้ว่าค่า K_d ของสารตัวอย่างใดๆย่อมมีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 1 แสดงค่า V_t,V_O และ V_S แสดงดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 ค่า Vt , V_O และ V_S ของเจลที่เรียงตัวอยู่ภายในคอลัมน์

ที่มา : Pharmacia (1991)

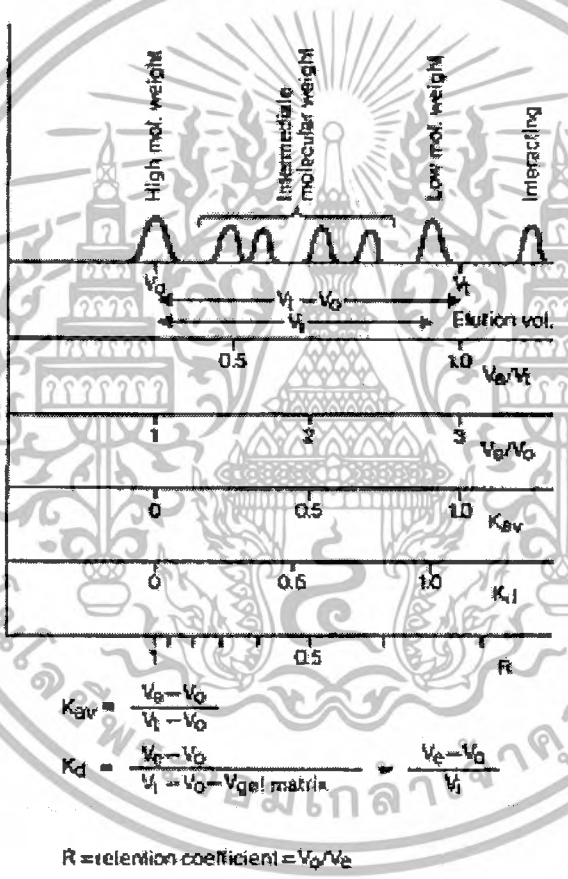
เนื่องจากเทอม V_I ในทางปฏิบัติหาค่าได้ยาก ดังนั้นจึงทำการเปลี่ยนรูปค่า V_I ให้อยู่ในรูปของตัวแปรอื่นแทน โดยสมมุติให้ V_I มีค่าเท่ากับ $V_I + V_e$ ทำให้ค่าคงที่ K_d เปลี่ยนเป็นค่าใหม่คือ K_{av} เป็นค่าสัดส่วนของปริมาตรที่เกิดจากการแพร่ของตัวอย่างทั้งหมด โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$K_{av} = (V_e - V_O) / (V_i + V_O)$ ..... (4)

เมื่อ V_I ในกรณีนี้มีค่าเท่ากับ $V_t - V_e$ (พิจารณาจากสมการ 1)

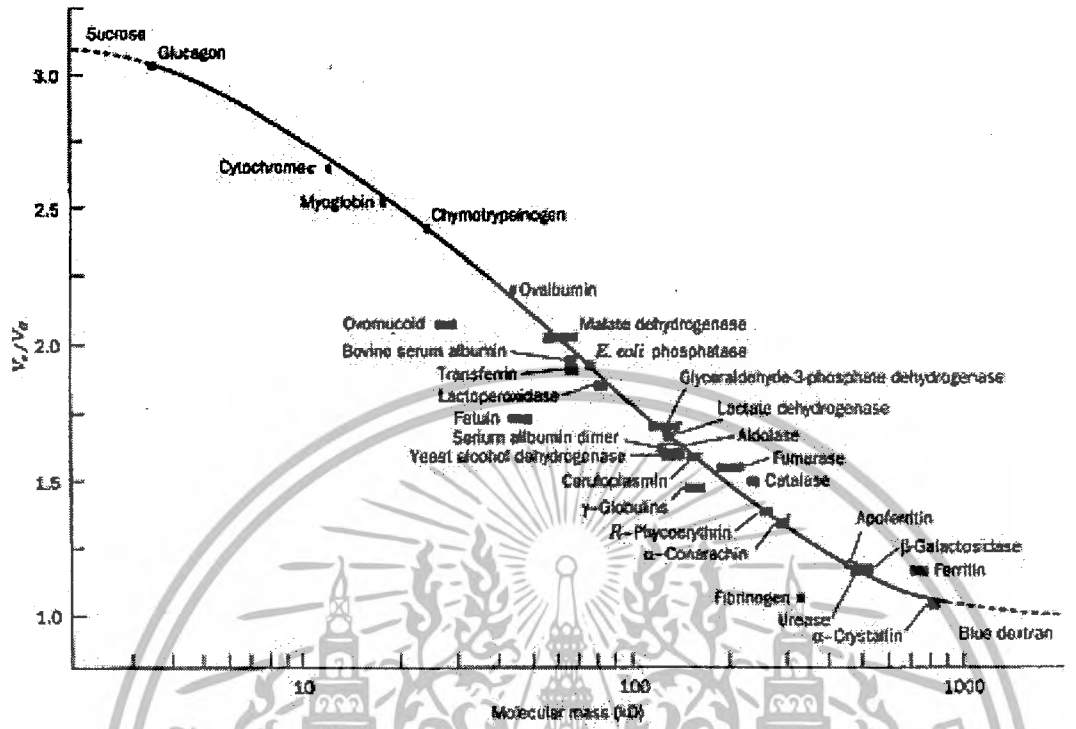
ค่าที่ได้บอกถึงพฤติกรรมของโปรตีนตัวอย่างในรูปของค่า V_t , V_O และ V_e สามารถหาค่าได้โดยตรง และเป็นค่าเฉพาะของสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันอีกด้วย สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างค่าตัวแปรต่างๆที่ได้กล่าวมาทั้งหมดแสดงดังรูปที่ 7 อย่างไรก็ตามค่าที่นิยมใช้ในการเปรียบเทียบว่าสารชนิดใดมีมวลโมเลกุลเท่ากันหรือไม่ สามารถเปรียบเทียบโดยค่า relative elution volume (V_e / V_O) การหาว่าสารตัวมีมวลโมเลกุลเท่าใดสามารถใช้ค่า relative elution volume นี้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารที่ทราบมวลโมเลกุลแล้วได้แสดงดังรูปที่ 8



รูปที่7 ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆ ต่อพฤติกรรมของสารตัวอย่างในขณะผ่านลงมาในชั้นของเจล

ที่มา ; Pharmacia (1991d)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานในการหามวลโมเลกุลของสารตัวอย่าง โดยใช้ค่า relative elution volume บน cross linked dextran column (Sephadex G-200) ที่พีเอช 7.5

ที่มา ; Voet และ Voet (1990)

2.5.4.1 ชนิดของสารที่ใช้ในการทำเจล (Gel filtration media)

สารที่นำมาทำเป็นตัวกลางในการเชื่อมไขว้เป็นเม็ดเจลแบ่งออกเป็นสามกลุ่มด้วยกัน คือ

1) เดกซ์แทรน (dextran)

2) polyacrylamide

3) agarose

โดยชนิดและชื่อทางการค้าของสารที่นิยมใช้เป็นตัวกลางในการทำเม็ดเจล แสดงดังในตารางที่ 4 และ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 4 สารที่ใช้เป็นตัวกลางในการเชื่อมไขว้กันเป็นเม็ดเจล สำหรับเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

ชื่อ	ชนิดของสารที่ใช้	ช่วงของมวลโมเลกุลที่ยอมให้ผ่านเข้าในเม็ดเจล (kD)
Sephadex G-10	dextran	0.05-0.7
Sephadex G-25	dextran	1-5
Sephadex G-50	dextran	1-30
Sephadex G-100	dextran	4-150
Sephadex G-200	dextran	5-600
Bio-Gel P-2	polyacrylamide	0.1-1.8
Bio-Gel P-6	polyacrylamide	1-6
Bio-Gel P-10	polyacrylamide	1.5-20
Bio-Gel P-30	polyacrylamide	2.4-40
Bio-Gel P-100	polyacrylamide	5-100
Bio-Gel P-300	polyacrylamide	60-400
Sepharose 6B	agarose	10-4,000
Sepharose 4B	agarose	60-20,000
Sepharose 2B	agarose	70-40,000

หมายเหตุ : Sepadex และ Sepharose gels เป็นของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals AB , Bio-Gels เป็นของบริษัท Bio Rad Laboratoies.

1.) dextran เป็นโพลีเมอร์ของกลูโคสที่ผลิตขึ้นโดยใช้แบคทีเรีย

จากนั้นนำโพลีเมอร์ดังกล่าวมาเชื่อมไขว้เข้าด้วยกันระหว่างเดกซ์แทรนกับ epichlorohydrin แสดงลักษณะโครงสร้างดังรูปที่ 9 มีชื่อทางการค้าว่า Sephadex แบ่งออกเป็นเกรด ต่างๆกันเรียกว่า G- type มีความแตกต่างกันในด้านระดับของการเชื่อมไขว้ (degree of cross linked) และช่วงมวลโมเลกุลของโปรตีนที่เหมาะสมในการแยกแสดงดังตารางที่ 6 คุณสมบัติทางเคมีของ Sephadex ที่สำคัญ คือไม่ละลายในตัวทำละลายทุกชนิด มีความเสถียรสูงในน้ำ สารละลายเกลือ ตัวทำละลายอินทรีย์ สารละลายด่างและกรดอ่อน ส่วนในสารละลายกรดแก่เกิดการสลายตัวได้ อย่างไรก็ตามยังคงมีความคงตัวในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ นาน 1-2 ชั่วโมง และคงตัวได้นาน 6 เดือนในกรดชนิดเดียวกันความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ข้อควรระวังของการใช้งาน Sephadex คือไม่ควรใช้กับ strong oxidizing agent สำหรับคุณสมบัติทางกายภาพที่ว่าคัญของเดกซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

61747

แทรน คือสามารถทนอุณหภูมิและความดันสูงได้ สามารถฆ่าเชื้อภายใต้ความดันสูง 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาทีที่พีเอชเป็นกลางได้ แต่ถ้าอยู่ในรูปของเจลแห้งจะทนความร้อนได้ไม่เกิน 120 องศาเซลเซียส เกิดการหลอมตัวได้

ตารางที่ 5 ชนิดของเจลที่ใช้ในทางการค้า สำหรับการใช้งานในเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

Company	Ciel-code	Gel type	Useful working range for globular molecules (MW)
Bio-Rad	P-30	polyacrylamide	2,500-40,000
Biogels	P-60	polyacrylamide	3,000-60,000
	P-100	polyacrylamide	500-100,000
	P-150	polyacrylamide	15,000-150,000
	P-200	polyacrylamide	30,000-200,000
	P-300	polyacrylamide	60,000-400,000
	A-0.5m	agarose	1,000-500,000
	A-1.5m	agarose	2,000-1.5 x 10^6
	A-5.0m	agarose	4,000-5 x 10^6
LKB Ultrogels	AcA 54	agarose/polyacrylamide	5,000-70,000
	AcA 44	agarose/polyacrylamide	10,000-130,000
	AcA 34	agarose/polyacrylamide	20,000-350,000
	AcA 22	agarose/polyacrylamide	100,000-1.2 x 10^6
LKB Trisacryls	GF2000	poly "Trisacrylamide"	10,000-15 x 10^6
Pharmacia	G-50	dextran	1,500-30,000
Sephadexes	G-75	dextran	3,000-70,000
	G-100	dextran	4,000-150,000
	G-150	dextran	5,000-300,000
	G-200	dextran	10,000-600,000
Pharmacia	6B,CL-6B	Agarose,cross linked agarose	10,000-4 x 10^6
Sepharoses	4B,CL-4B	Agarose,cross linked agarose	60,000-20 x 10^6
Pharamacia	S-200	dextran/bisacrylamide	5,000-300,000
Sephacryls	S-300	dextran/bisacrylamide	10,000-800,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ชนิดของเจลที่ใช้ในทางการค้า สำหรับการใช้งานในเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (ต่อ)

Company	Ciel-code	Gel type	Useful working range for globular molecules (MW)
	S-400	dextran/bisacrylamide	20,000-2 x 10^6
	S-500	dextran/bisacrylamide	100,000-10 x 10^6
Pharmacia Superose	6B	cross linked agarose	10,000-4 x 10^6
Merck/Toyo Soda	HW-50	Hydroxylated vinyl polymer	1,000-80,000
Fractogel TSK/Toyopearl	HW-55	Hydroxylated vinyl polymer	2,000-800,000
	HW-60	Hydroxylated vinyl polymer	30,000-3 x 10^6
Amicon/Chisso Cellufines	GC-200	cellulose	1,000-30,000
	GC-700	cellulose	2,000-100,000
	GCL-2000	cellulose	10,000-2 x 10^6

ที่มา : Scopes (1988)

2.) polyacrylamide gels เป็นเม็ดเจลที่ได้จากการเชื่อมไขว้กันระหว่าง acrylamide gel กับ N,N'- methylene-bis-acrylamide ด้วยพันธะเปปไทด์ได้ลักษณะเป็นโครงร่างตาข่าย มีตัวเร่งปฏิกริยา คือ ammonium persulphate เจลที่ได้มีชื่อทางการค้าว่า Bio-Gel แบ่งเกรดเป็น P- type มีค่า exclusion limit อยู่ในช่วง 0.2 - 400 กิโลดาลตัน แสดงลักษณะของการเชื่อมไขว้ของ polyacrylamide gels ดังรูปที่ 10

3.) agarose gels เป็นโพลีเมอร์สายตรงจากสาหร่ายสีแดง ประกอบด้วย D-galactose ต่อเชื่อมกับ 3,6-anhydro-L-galactose เป็นเส้นสายยาว ในการสร้างเจลต้องมีขั้นตอนการกำจัดประจุบนโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์นี้ออกก่อน การเกิดเจลเกิดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยโพลี-แซคคาไรด์แต่ละเส้นเข้ามารวมตัวกันแล้วพันเป็นเกลียวคู่ (double helix) จากนั้นจึงเกิดการเชื่อมเป็นร่างแหได้เจลที่มีความคงตัวสูง แสดงลักษณะการเชื่อมไขว้ดังรูปที่ 11 เจลชนิดนี้มีชื่อทางการค้าว่า Sepharose แบ่งเกรดเป็น B- type แต่ละเกรดแสดงคุณสมบัติดังตารางที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 คุณสมบัติของ Sephadex

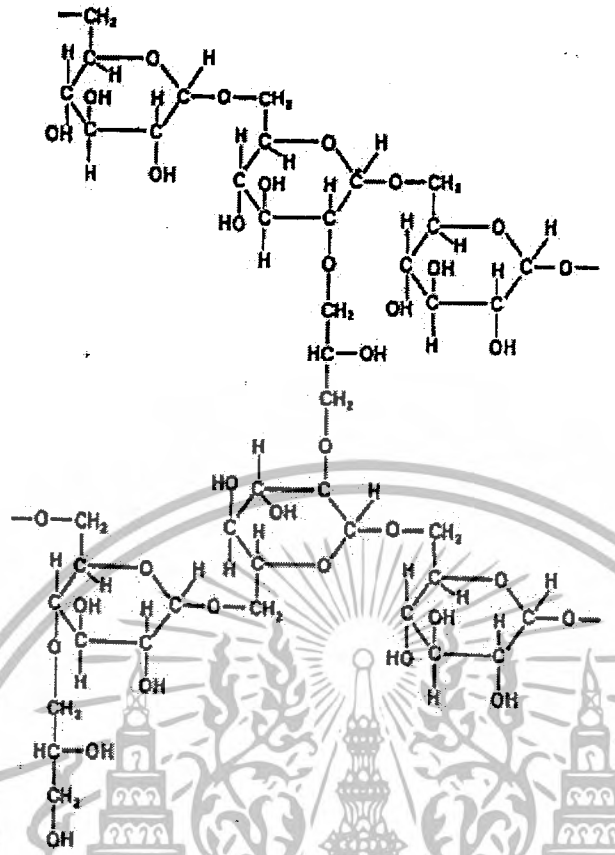
Sephadex type and grade		Dry bead diameter μm	Fractionation range (molecular weight)		Bed volume ml / g dry Sephadex
			Peptides and globular proteins	Dextrans	
G-10		40-120	- 700	- 700	2-3
G-15		40-120	- 1,500	- 1,500	2.5-3.5
G-20	Coarse	100-300	1,000-5,000	100-5,000	4-6
	Medium	50-150			
	Fine	20-80			
	Superfine	10-40			
G-50	Coarse	100-300	1,500-30,000	500-10,000	9-11
	Medium	50-150			
	Fine	20-80			
	Superfine	10-40			
G-75		40-120	3,000-80,000	1,000-50,000	12-15
	Superfine	10-40	3,000-70,000		
G-100		40-120	4,000-150,000	1,000-100,000	15-20
	Superfine	10-40	4,000-100,000		
G-150		40-120	5,000-300,000	1,000-150,000	20-30
	Superfine	10-40	5,000-150,000		18-22
G-200		40-120	5,000-600,000	1,000-200,000	30-40
	Superfine	10-40	5,000-250,000		20-25

ที่มา ; Pharmacia (1991d)

ตารางที่ 7 คุณสมบัติของ Sepharose

ชนิดของ Sepharose	ความเข้มข้นของ Agarose (%)	เส้นผ่าศูนย์กลางของเจลเปียก (μm)	Fractionation range	
			โปรตีน	คาร์โบไฮเดรท
Sepharose 2B	2	60-200	7×10^4 - 40×10^4	10^5 - 20×10^6
Sepharose 4B	4	60-140	6×10^4 - 20×10^6	3×10^4 - 5×10^6
Sepharose 6B	6	45-165	10^4 - 40×10^6	10^4 - 1×10^6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 โครงสร้างของ Sephadex
ที่มา : Pharmacia (1991d)

คุณสมบัติทางเคมีของ agarose คือ มีความคงตัวสูงเนื่องจากพันธะไฮโดรเจน ทำให้มีความเสถียรในน้ำและสารละลายเกลือที่พีเอช 4 - 9 และทนต่อสารประเภท oxidizing agent นอกจากนี้ยังมีอายุการใช้งานยาวนานในสภาพที่มี guanidine hydrochloride และ urea มีข้อควรระวัง คือ หลีกเลี่ยงการใช้งานกับสารพวก chaotrophics salt เช่น KSCN สำหรับคุณสมบัติทางกายภาพ คือ หลอมละลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสทำให้การใช้งานเจลชนิดนี้ไม่สามารถผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูงได้อย่างไรก็ตามสามารถทำการฆ่าเชื้อเพื่อใช้งานในสภาพปลอดเชื้อได้โดยใช้สารเคมี เช่น diethylpyrocarbonate เป็นต้น

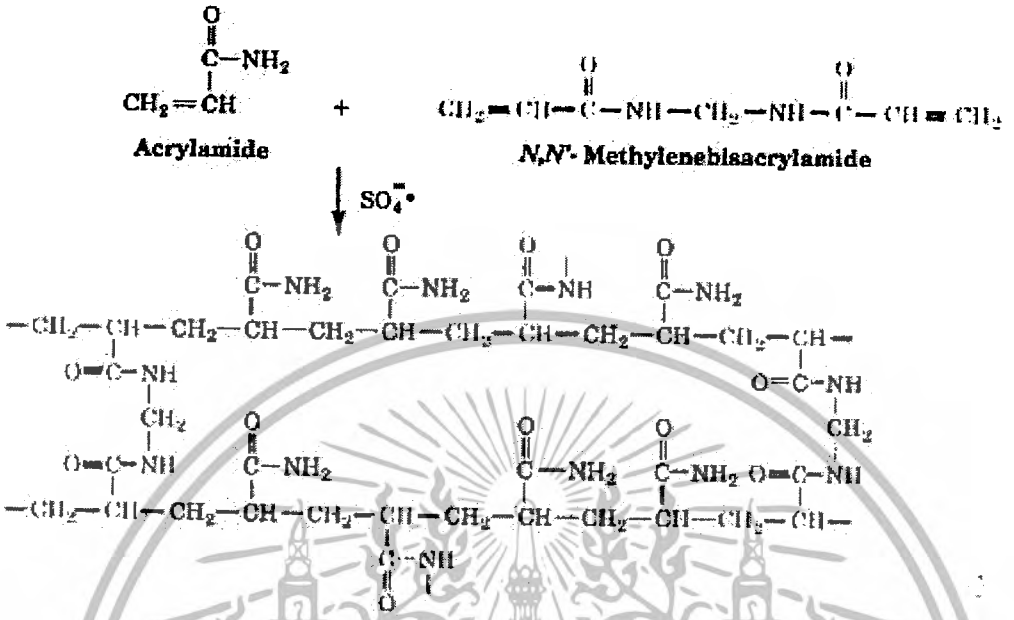
2.5.4.2 การประยุกต์ใช้งาน

นิยมใช้งานในกระบวนการหลังการผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยมีวัตถุประสงค์ของการใช้งานแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ

1) การประยุกต์ใช้ในการแยกสารตามขนาดโมเลกุล โดยสมมุติให้สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่มีค่า K_{av} เท่ากับศูนย์และสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมีค่าเท่ากับหนึ่ง เป็นการแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ออกจากสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กคล้ายกับหลักการทำ dialysis โดยทั่วไปนิยมใช้ใน

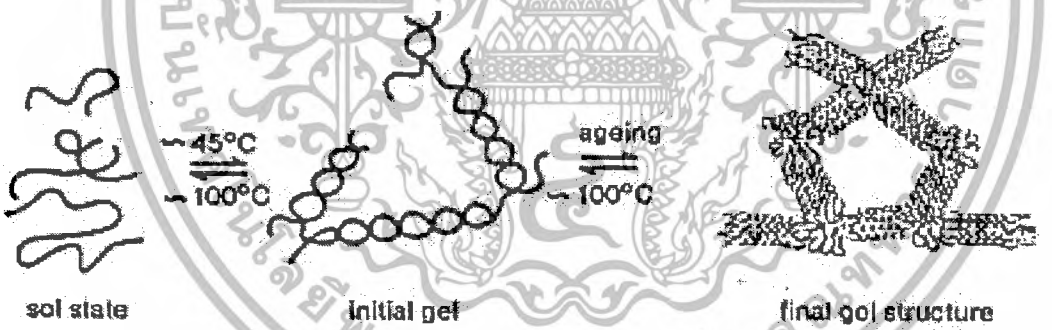
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การไล่เกลือออกหลังจากผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแล้ว หรืออาจสรุปการใช้งานเป็นกลุ่มได้ดังนี้



รูปที่ 10 โครงสร้างของ polyacrylamide gels

ที่มา : Voet และ Voet (1990)



รูปที่ 11 โครงสร้างของ agarose และปฏิกริยาในขณะเกิดการสร้างเจล

ที่มา : Pharmacia (1991d)

1.1 ใช้ในการแยกสารพวกโปรตีน โพลีแซคคาไรด์ โพลีเปปไทด์ ในขั้นตอนก่อนทำให้เข้มข้นโดยวิธี lyophilization

1.2 ใช้ในการสกัดฟีนอลออกจากกรดนิวคลีอิค

1.3 แยกสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันออกจากกัน

1.4 แยกผลิตภัณฑ์ โคแฟคเตอร์และตัวยับยั้งออกจากโมเลกุลของเอนไซม์

1.5 ใช้ในการไล่เกลือออกจากโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.) การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

2.1 ใช้ในการหามวลโมเลกุล โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบขนาดมวลโมเลกุลมาทำการแยกในคอลัมน์เพื่อหาค่า relative elution volume โดยเรียกกลุ่มของสารมาตรฐานนี้ว่า Calibration Kits แสดงตัวอย่างดังตารางที่ 8 และรูปที่ 12

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของ Calibration Kits

Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit			
Protein	Molecular Weight	Strokes'Redious (°A)	Source
Ribonuclease A	13,700	16.4	Bovine pancreas
Chymotrypsinogen A	25,000	20.9	Bovine pancreas
Ovalbumin	43,000	30.5	Hen egg
Albumin	67,000	35.5	Bovine serum
Blue Dextran 2000			
High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit			
Protein	Molecular Weight	Strokes'Redious (°A)	Source
Aldolase	158,000	48.1	Rabbit muscle
Catalase	232,000	52.2	Bovine liver
Ferritin	440,000	61.0	Horse spleen
Thyroglobulin	669,000	85.0	Bovine thyroid
Blue Dextran 2000			

ที่มา : Pharmacia (1991d)

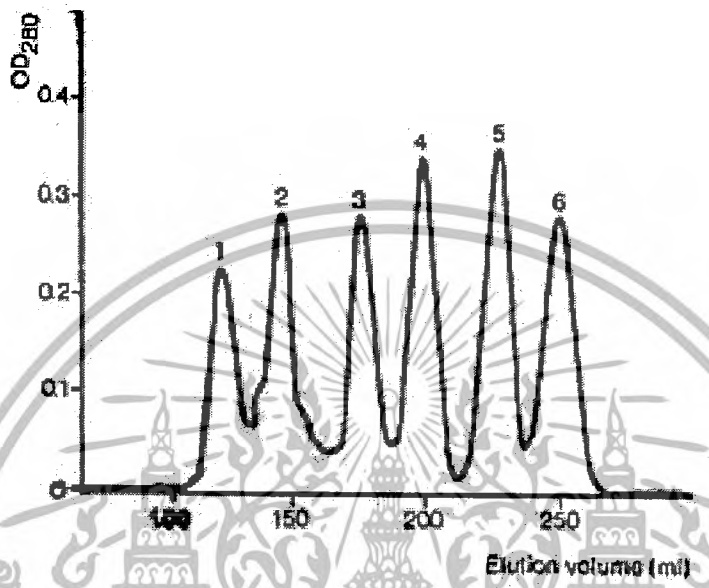
2.2 ใช้ในการแยกเซลล์ เศษเซลล์และอนุภาคอื่น เช่น การแยก monocyte ออกจาก lymphocyte หรือการแยก red blood cell ออกจาก blood plasma เป็นต้น

2.3 ใช้ในการทำสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ให้เข้มข้นขึ้น (concentration) โดยใช้ผงเจล แห้งมาแช่ในสารละลายผสม สารที่มีขนาดเล็กก็สามารถผ่านเข้าไปอยู่ภายในเม็ดเจล เมื่อทำการเหวี่ยงแยกที่ความเร็วสูงได้ส่วนสารละลายใสที่มีสารโมเลกุลขนาดใหญ่อยู่

2.4 ใช้แยกสารที่มีขนาดใหญ่ออกจากสารที่มีขนาดเล็ก โดยเฉพาะการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยเป็นเทคนิคที่นิยมใช้คู่กันกับเทคนิคโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุ เช่น ในกรณีการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุก่อน ไม่สามารถบอกได้ว่าในสารละลายที่เลือกเก็บไว้นั้นมีเอนไซม์อยู่กี่ชนิด บอกได้เพียงว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่เท่านั้น เนื่องจากเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็นไอโซไซม์ (isozymes) มีคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนประจุเหมือนกัน ดังนั้นเมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุก็จะออกมาใน fraction เดียวกัน แต่เมื่อนำมาผ่านเจลฟิลเตรชันคอลัมน์ สามารถแยกไอโซไซม์ เหล่านั้นออกจากกันได้เนื่องจากไอโซไซม์แต่ละตัวล้วนมีมวลโมเลกุลต่างกัน ดังนั้นจึงนิยมใช้เทคนิคทั้งสองควบคู่กันไปในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์



รูปที่ 12 ลักษณะของโครมาโตแกรมที่ได้จากการใช้ Calibration Kits ผ่านเจลฟิลเตรชัน Sephadex G-200 โดย peak ที่ 1 คือ catalse , 2 คือ aldolase , 3 คือ bovine serum albumin , 4 คือ ovalbumin , 5 คือ chymotrypsinogen และ 6 คือ ribonuclease A.

ที่มา : Pharmacia (1991d)

2.5.5 การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchanger chromatography) เป็นกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เป็นของเหลวกับเฟสคงที่ (stationary phase) โดยที่เฟสคงที่เป็นของแข็งที่ไม่ละลายในตัวทำละลาย เรียกว่า เมตริกซ์ (metrix) เป็นพอลี - เมอร์ (polymer) ที่เหนี่ยวนำให้ประกอบด้วยส่วนที่มีประจุที่ รวมเรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchager) เช่น carboxymethyl cellulose เป็นเซลลูโลสที่มีกลุ่มประจุของ carboxymethyl group (CH_2COO^-) หรือ dextran ที่มี aminoethyl group ($CH_2NH_3^+$) ล้อมรอบอยู่ เมตริกซ์นี้อาจเรียกเป็น ตัวแลกเปลี่ยนประจุหรือเรซิน (resin) ก็ได้ เมื่อตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกทำให้อิ่มตัวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ หรือ สารละลายเกลือใดๆ พบว่ามีส่วนของสารที่มีประจุที่เป็นองค์ประกอบในในบัฟเฟอร์หรือสารละลายเกลือ เข้ามาล้อมรอบตัวแลกเปลี่ยนประจุเพื่อรักษาสภาพสมดุลย์ทางไฟฟ้า เรียกประจุเหล่านี้ว่า counter ion เป็นอิออนที่มีประจุตรงข้ามกับเมทริกซ์ สารตัวอย่างแต่ละชนิดย่อมมีประจุต่างกันสามารถเกิดแรงกระทำทางไฟฟ้ากับประจุในส่วน counter ion ได้ต่างกัน สารใดที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประจุตรงข้ามกับเมตริกซ์และมีความแรงประจุสูงก็จะไปแทนที่ counter ion แล้วเข้าไปยึดจับกับส่วนเมตริกซ์ได้ ส่วนสารใดที่มีประจุชนิดเดียวกันกับตัวแลกเปลี่ยนประจุก็จะหลุดออกจากคอลัมน์ก่อนโดยแรงผลักทางไฟฟ้าทำให้สามารถแยกสารผสมออกจากกันได้ เมื่อต้องการไล่สารที่ถูกยึดจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุให้หลุดออกมาสามารถทำได้โดยการผ่านบัฟเฟอร์ที่มีประจุแรงกว่าเข้าไปจะไปแทนที่สารให้หลุดจากการจับกับส่วนเมตริกซ์ตามความแรงของประจุได้ด้วยอัตราความแรงของประจุที่แตกต่างกัน โดยวิธีนี้เป็นการแยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของประจุ

ทฤษฎีการแลกเปลี่ยนประจุ คือการแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนอิออนเกิดขึ้นโดยกระบวนการดูดซับบนพื้นผิวแบบย้อนกลับ (reversible ion exchanges) เกิดขึ้นสองขั้นตอนคือ ขั้นแรกเป็นกระบวนการดูดซับสารตัวอย่างบนพื้นผิวของตัวแลกเปลี่ยนประจุส่วนสารที่ไม่ถูกดูดซับถูกชะออกไปด้วยบัฟเฟอร์ ขั้นที่สองโมเลกุลของสารที่ยึดเกาะกับตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกชะออกจากคอลัมน์ โดยมีอัตราเร็วในการหลุดชะออกที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความแรงของการยึดเหนี่ยวกับประจุของสารแต่ละชนิดกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ หรือความจำเพาะทางไฟฟ้าเนื่องจากการมีประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนที่แตกต่างกัน ความจำเพาะดังกล่าวนี้สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงได้โดยการเปลี่ยนค่าพีเอช และค่า ionic strength ของสารละลายในระบบเป็นผลทำให้เทคนิคดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการแยกโปรตีนชนิดที่ต้องการออกจากสารละลายโปรตีนผสมได้ แม้มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย เช่น โปรตีนสองชนิดมีความแตกต่างกันที่ลำดับของกรดอะมิโนเพียงชนิดเดียว เทคนิคดังกล่าวนี้สามารถใช้แยกโปรตีนทั้งสองออกจากกันได้ เมื่อใช้เทคนิคนี้ร่วมกับเจลฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟี ทำให้สามารถแยกสารออกจากกันได้โดยอาศัยคุณสมบัติของความแตกต่างทั้งชนิดของประจุ ขนาดและมวลได้ นอกจากนี้การทำโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุสามารถเลือกได้ว่าต้องการให้สารที่ต้องการแยกจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ หรือให้ถูกชะหลุดออกมาก่อนก็ได้ กลไกการแลกเปลี่ยนประจุทั้งสองแบบแสดงดังรูปที่ 13

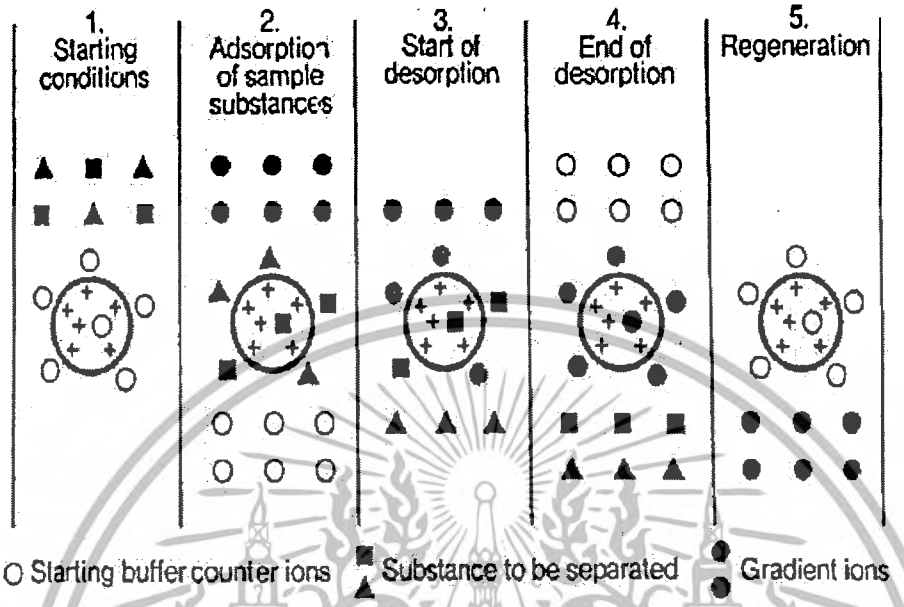
จากรูปที่ 13 แบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่1) แสดงภาวะที่ตัวแลกเปลี่ยนประจุอยู่ในภาวะที่สมดุลย์กับสารละลายเริ่มต้นในคอลัมน์ โดยตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกล้อมรอบด้วย counter ion มาจากอิออนของโลหะ เกลือ หรือสารที่เป็นองค์ประกอบในบัฟเฟอร์เริ่มต้น เพื่อรักษาสมดุลย์ทางไฟฟ้า ทำให้ตัวแลกเปลี่ยนประจุแสดงความสามารถของประจุได้สูงสุด

ขั้นตอนที่2) เมื่อเริ่มใส่ตัวอย่างลงไปในคอลัมน์สารตัวอย่างที่มีประจุชนิดเดียวกับ counter ion ของสารละลายบัฟเฟอร์เริ่มต้น เข้าไปแทนที่ในส่วน counter ion ที่ล้อมรอบตัวแลกเปลี่ยนประจุอยู่ทำให้ counter ion เดิมถูกชะออกจากคอลัมน์ ส่วนโปรตีนตัวอย่างถูกยึดจับไว้ที่ผิวของตัวแลกเปลี่ยนประจุเนื่องจากเกิดแรงกระทำทางไฟฟ้าขึ้นระหว่างประจุสุทธิบนโมเลกุลโปรตีนและตัวแลกเปลี่ยนประจุสารอื่นที่มีประจุสุทธิบนโมเลกุลเป็นแบบเดียวกันกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ หรือเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลางทางไฟฟ้าก็ถูกชะผ่านตัวแลกเปลี่ยนประจุลงมา เห็นได้ว่าสามารถแยกสารที่ต้องการออกจากสารผสมได้



รูปที่ 13 ขั้นตอนในการแลกเปลี่ยนประจุ

ที่มา : Pharmacia (1991a)

ขั้นตอนที่ 3) สารตัวอย่างที่เกิดการแลกเปลี่ยนประจุกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ ถูกชะให้หลุดออกจากตัวแลกเปลี่ยนประจุ เนื่องจากมีการชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเปลี่ยนไป เรียกว่าการทำให้เกิดความแตกต่างของช่วงพีเอช (buffer gradient) เมื่อพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปทำให้ความแรงประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนมีค่าลดลง หรือเปลี่ยนเป็นกลางทางไฟฟ้าหรือเปลี่ยนเป็นชนิดประจุตรงข้าม ทำให้แรงยึดจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุลดลงทำให้สารดังกล่าวหลุดออกแล้วถูกชะลงมาตามคอลัมน์ทำให้สามารถแยกเก็บสารชนิดนั้นออกมาได้

ขั้นตอนที่ 4) สารที่ต้องการแยกถูกชะออกมาจากคอลัมน์ ส่วนบริเวณตัวแลกเปลี่ยนประจุก็ถูกล้อมรอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดใหม่ที่ใช้ทำ buffer gradient

ขั้นตอนที่ 5) เป็นการชะไล่บัฟเฟอร์ในข้อ 4 ออกจากคอลัมน์ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เริ่มต้นมาทำการชะไล่ ทำให้บริเวณตัวแลกเปลี่ยนประจุกลับมาล้อมรอบด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมอีก ทำให้ตัวแลกเปลี่ยนประจุกลับมามีความแรงสูงสุดในการแลกเปลี่ยนประจุได้อีกครั้ง

2.5.5.1 ตัวแลกเปลี่ยนประจุ

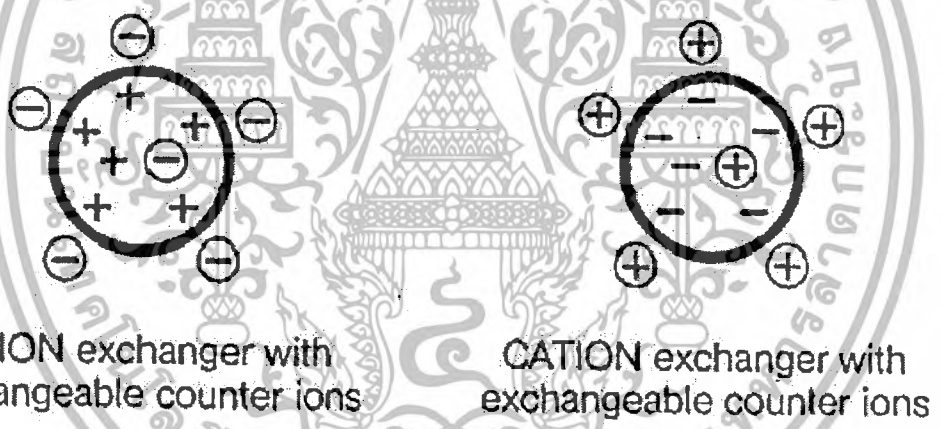
ตัวแลกเปลี่ยนประจุประกอบด้วยสองส่วน คือส่วนที่เป็นโครงสร้างทำจากของแข็งที่ไม่ละลายในตัวทำละลาย เป็นพอลีเมอร์ที่มีกลุ่มประจุเชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนท์ เรียกส่วนนี้ว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมตริกซ์หรือเรซินส่วนที่สองเป็นกลุ่มประจุที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดล้อมรอบส่วนเมตริกซ์ โดยการ ทำปฏิกริยาทางเคมีทำให้บริเวณผิวของเมตริกซ์มีกลุ่มของสารที่มีประจุไฟฟ้าอยู่ ส่วนที่สองนี้เป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนประจุ ตัวแลกเปลี่ยนประจุมีทั้งชนิดที่แลกเปลี่ยนประจุบวก และลบ ถ้ากลุ่มประจุในส่วนตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นประจุลบ (counter ion เป็นประจุบวก) เรียกตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchanger) ในทางกลับกันถ้ากลุ่มประจุของตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นประจุบวก (counter ion เป็นประจุลบ) เรียกตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger) แสดงลักษณะโครงสร้างดังรูปที่ 14 ส่วนเมตริกซ์อาจเป็นสารประกอบอนินทรีย์ เรซินสังเคราะห์ โพลี-แซคคาไรด์ โดยมีกลุ่มประจุบนโมเลกุลที่แตกต่างกันทั้งชนิดประจุ ความแรงประจุและความสามารถในการมีประจุมากน้อยแตกต่างกันไป ตัวอย่างของสารที่ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุแสดงดังตารางที่ 9

2.5.5.2 ชนิดตัวแลกเปลี่ยนประจุ

สารที่นิยมใช้เป็นตัวกลางหรือโครงสร้างของตัวแลกเปลี่ยนประจุที่เรียกว่าส่วนเมตริกซ์ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้



รูปที่ 14 ลักษณะการกระจายประจุบนส่วนเมทริกซ์ (counter ion) บนตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกและลบ

ที่มา : Pharmacia (1991a)

1) เรซิน เช่น polystyrene เชื่อมไขว้ด้วย divinylbenzene (รูป 15 ก)

2) เซลลูโลส (รูป 15 ข)

3) cross linked polyacrylamide หรือ polydextran gels (รูป 15 ค)

ตัวอย่างของตัวแลกเปลี่ยนประจุที่ใช้กันทั่วไป และข้อบ่งใช้แสดงดังตารางที่ 10 และ 11 คุณสมบัติของตัวแลกเปลี่ยนประจุที่นิยมใช้ในทางการค้าบางชนิด เช่น Sephadex ion exachanger ได้จากการนำเอา dextran มาต่อเชื่อมกันในลักษณะการเชื่อมไขว่เป็นสายยาวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะอีเธอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสารประกอบพวกที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ดูดซับน้ำได้ดีทำให้โมเลกุลพองตัว มีข้อดีคือไม่ทำปฏิกริยาหรือทำลายสภาพโปรตีน กรดอะมิโน ชนิดของ Sephadex มีหลายชนิดแตกต่างกันไปตามหมู่ฟังก์ชัน (functional group) บนหน่วยโครงสร้างของมันแสดงดังรูปที่ 15 และจัดกลุ่มได้ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 9 ชนิดของเมทริกซ์และกลุ่มประจุบนเมทริกซ์ (counter ion)

เมตริกซ์	หมู่ฟังก์ชัน
Anion exchangers	
Aminoethyl (AE-)	$-OCH_2CH_2NH_3^+$
Diethylaminoethyl (DEAE-)	$-OCH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Quarternary aminoethyl (QAE-)	$-OCH_2CH_2N^+(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3$
Cation exchangers	
Carboxymethyl (CM-)	$-OCH_2COO^-$
Phospho	$-PO_4H_2^-$
Sulphopropyl (SP-)	$-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$

คุณสมบัติเด่นของ Sephadex คือ มีความคงตัวทางเคมีสูง ไม่ละลายในตัวทำละลายทุกชนิด มีความคงตัวในน้ำ สารละลายเกลือ ตัวทำละลายอินทรีย์ สารละลายด่างและกรดอ่อน แต่ในสารละลายกรดเข้มข้น (pH < 2) ควรหลีกเลี่ยงเนื่องจากเกิดการย่อยสลายพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic linkage) ทำให้โครงสร้างเสียสภาพได้ นอกจากนี้ Sephadex ยังสามารถทนอุณหภูมิและความดันสูงได้สามารถทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นานกว่า 30 นาที ที่สภาพพีเอชเป็นกลางได้

ตัวแลกเปลี่ยนประจุที่นิยมใช้อีกชนิดหนึ่ง คือ Sepharose เกิดจากการเชื่อมไขว้ระหว่าง agarose กับ 2,3-dibromopropanol และมีการดึงเอาหมู่ sulfate ออกจากโมเลกุลโดยการแยกสลายด้วยน้ำ ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง จากนั้นจึงเชื่อม DEAE- หรือ CM-group เข้ากับเจลด้วยพันธะอีเธอร์ ได้ DEAE Sepharose CL-6B และ CM- Sepharose CL-6B แสดงดังรูปที่ 16

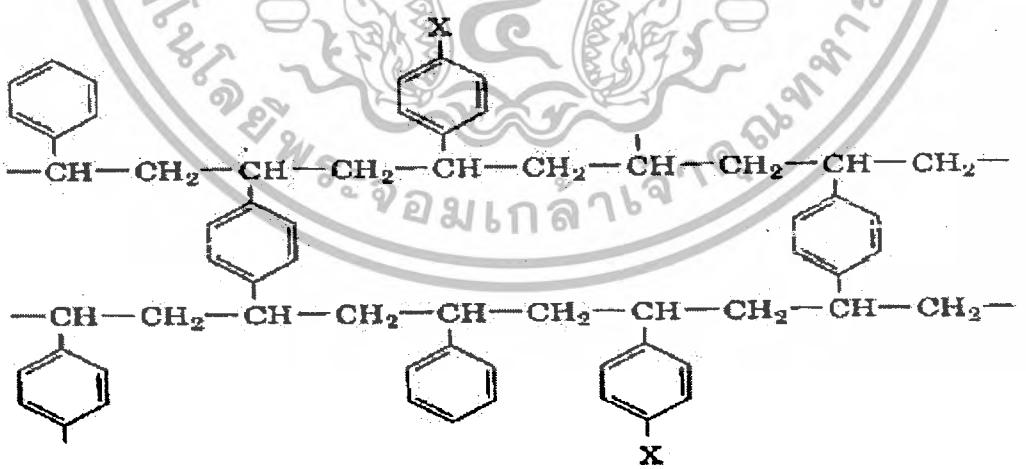
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ชื่อทางการค้าของตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก และลบ

	ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ	ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก
ชนิดที่ใช้ตัวกลางเป็นเซลลูโลส	DEAE[b,c]	CM[b, c]
	TEAE[b]	Phospho[b, c]
	QAE[b]	
Sephacel (ใช้ spherical cellulose beads เป็นตัวกลาง)	DEAE[a]	
Sephadex (ใช้ dextran beads เป็นตัวกลาง)	DEAE[a]	CM[a]
	QAE[a]	Sulfopropyl[a]
ใช้ตัวกลางเป็น agarose	DEAE[a,b]	CM[b, c]
	PEI (polybuffer exchanger)[a]	
ใช้พอลีเมอร์สังเคราะห์ (Trisacryl)	DEAE[d]	CM[d]

DEAE = diethylaminoethyl , TEAE = trimethylaminoethyl , QAE = diethyl-(2-hydroxypropyl)aminoethyl , PEI = polyethylene amino , CM = carboxymethyl , a = Pharmacia , b = Bio-Rad Laboratories , c = Whatman , d = LKB

ก.)

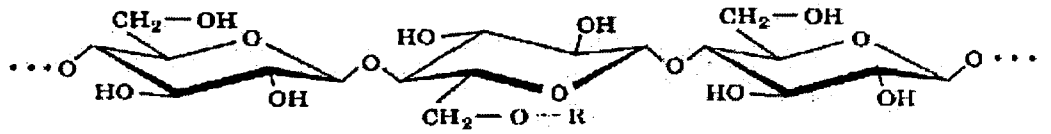


Dowex 50: X = $-SO_3^-$

Dowex 1: X = $-CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

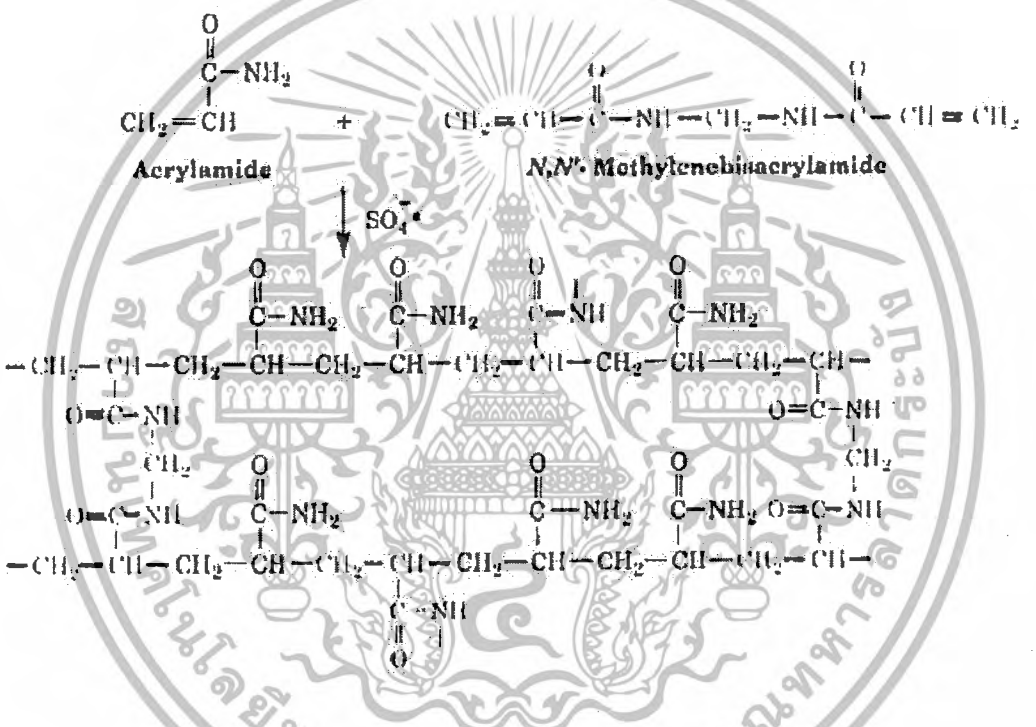
ข.)



DEAE: R = $-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}HC(CH_3)_2$

CM: R = $-CH_2-COO^-$

ค.)



รูปที่ 15 โครงสร้างของสารที่ใช้ในการทำเมตริกซ์ ก.) Divinylbenzene crosslinked polystylene ionexchanger resin ข.) Cellulose based ion exchanger ค.) Cross linked polyacrylamide.

ที่มา : Voet and Voet (1990)

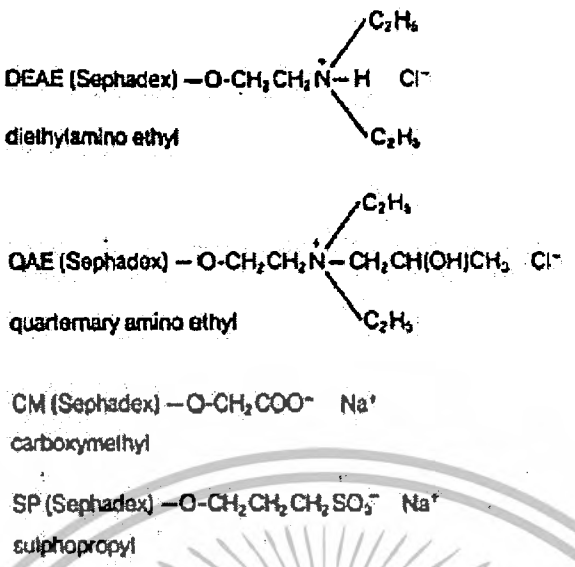
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 ชนิดและข้อบ่งใช้ของตัวแลกเปลี่ยนประจุทางการค้า

Name	Type	Ionizable Group	Remarks
Dowex 1	Strongly basic polystyrene resin	ϕ-$CH_2N^+(CH_3)_3$	Anion exchange
Dowex 50	Strongly basic polystyrene resin	ϕ-SO_3H	Cation exchange
DEAE-cellulose	Basic	Diethylaminoethyl -$CH_2CH_2N(C_2H_5)_2$	Used in fractionation of acidic and neutral protein
ECTEOLA-cellulose	Basic	Mixed amines	Used for chromatography of nucleic acids
CM-cellulose	Acidic	Carboxymethyl -CH_2COOH	Used for fractionation of basic and neutral protein
P-cellulose	Strongly and weakly acidic	Phosphate -OPO_3H_2	Dibasic binds basic proteins strongly
DEAE-Sephadex	Basic cross-linked dextran gel	Diethylaminoethyl -$CH_2CH_2N(C_2H_5)_2$	Combined chromatography and gel filtration of acidic and neutral proteins
CM-Sephadex	Acidic cross-linked dextran gel	Carboxymethyl -CH_2COOH	Combined chromatography and gel filtration of basic and neutral proteins
Bio-Gel CM 100	Acidic cross-linked polyacrylamide gel	-CH_2COOH	Combined chromatography and gel filtration of basic and neutral proteins

ที่มา : Voet and Voet (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 โครงสร้างของ Sephadex ion exchanger

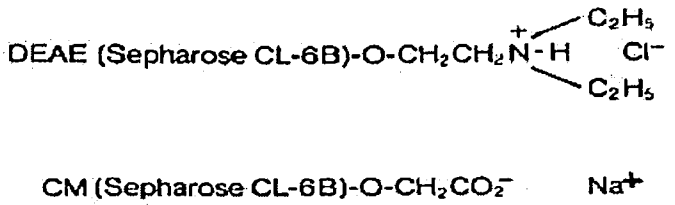
ที่มา : Pharmacia (1991b)

ตารางที่ 12 ชนิดและข้อบ่งใช้ของ Sephadex ion exchanger.

ชนิด	คุณลักษณะ	หมู่ฟังก์ชัน	Counter ion
DEAE-Sephadex A-25 A-50	Weakly basic anion exchanger	Diethylaminoethyl	Chloride
QAE- Sephadex A-25 A-50	Strongly basic anion exchanger	Diethyl-2(2-hydroxy-propyl)aminoethyl	Chloride
CM- Sephadex C-25 C-50	Weakly acidic cation exchanger	Carboxymethyl	Sodium
SP- Sephadex C-25 C 50	Strongly acidic cation exchanger	Sulphopropyl	Sodium

ที่มา : Sephdex (1991b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 โครงสร้างของ Sepharose ion exchanger.

ที่มา : Pharmacia (1991b)

คุณสมบัติของ Sepharose มีข้อดี คือมีความคงตัวทางเคมีสูงไม่ละลายในตัวทำละลายทุกชนิด มีความคงตัวในน้ำ สารละลายเกลือ และตัวทำละลายอินทรีย์ในช่วงพีเอช 3-10 นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในสารละลายในกลุ่มสารฟอกสีที่ไม่มีประจุ เช่น Ytition X-100 และยังใช้ในสภาพเกลือที่มีความเข้มข้นสูงได้ เช่น สารละลายเกลือยูเรียความเข้มข้น 7 โมลาร์ แต่ไม่คงตัวในในสภาพที่เป็นด่างแก่ อย่างไรก็ตาม Sepharose สามารถทนอุณหภูมิและความดันสูงได้ที่ระดับการฆ่าเชื้อที่ 110-120 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และในขณะปฏิบัติงานจริงสามารถทนอุณหภูมิสูงภายในคอลัมน์ได้ 70 องศาเซลเซียส

DEAE-Sephacel เป็นสารอีกชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุ ทำมาจากเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมเตรียมขึ้นจาก microcrystalline cellulose ที่มีความบริสุทธิ์สูง โดยที่เซลลูโลสเป็นพอลีเมอร์ของกลูโคสเชื่อมต่อด้วยพันธะ β-(1,4) glycosidic bonds ความแข็งแรงของเจลเกิดจากการเชื่อมไขว้กับ epichlorohydrin ด้วยพันธะไฮโดรเจน แสดงลักษณะโครงสร้างดังรูปที่ 18

รูปที่ 18 โครงสร้างของ DEAE-Sephacel

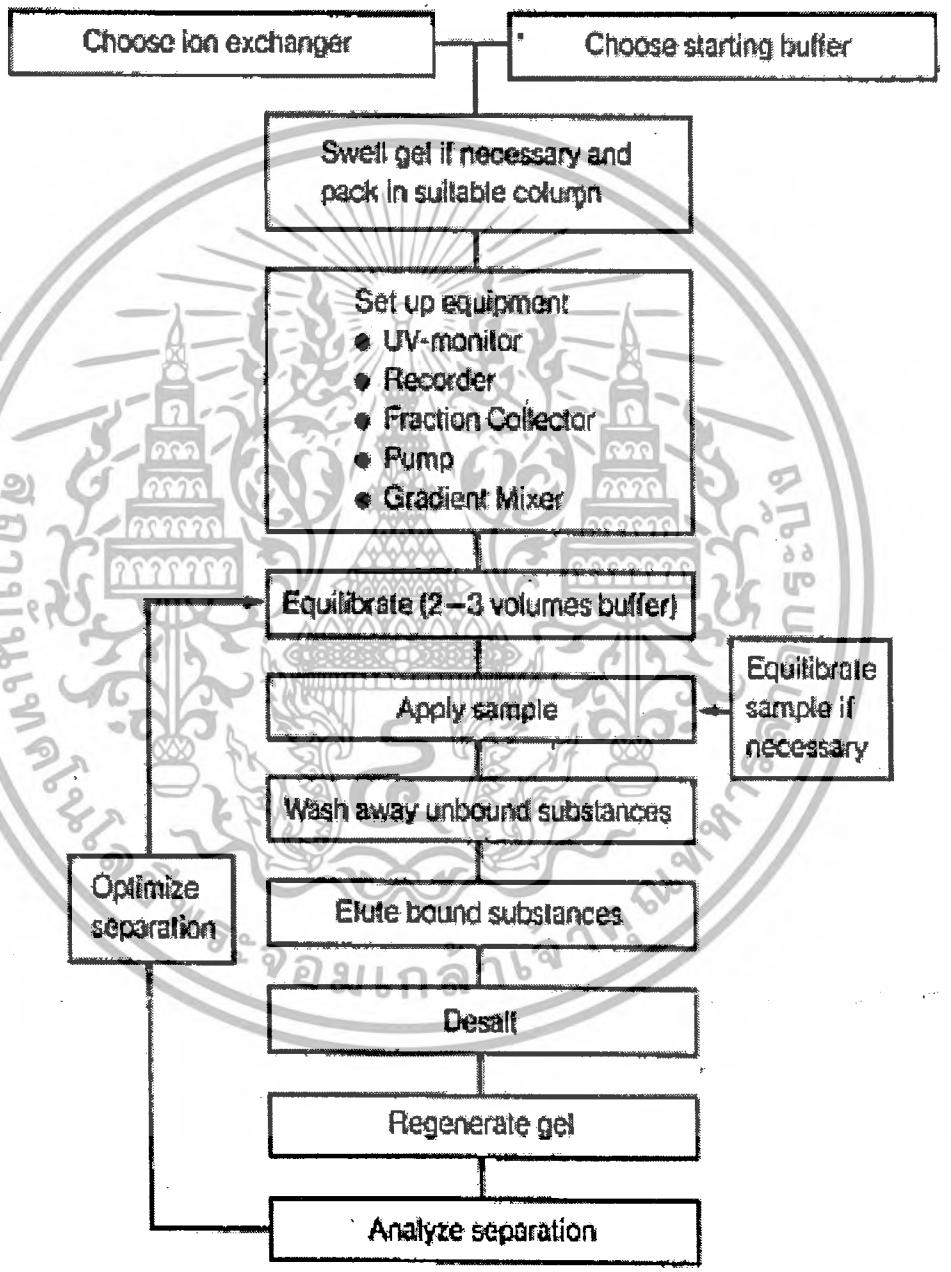
ที่มา : Pharmacia (1991b)

คุณสมบัติของ DEAE-Sephacel มีความคงตัวสูงในสารละลายพีเอช 2-12 แต่ในสภาวะที่เป็นกรดแก่เกิดการเสียสภาพได้เนื่องจากโครงสร้างส่วน macro molecule จะแตกออก นอกจากนี้ยังสามารถเกิดปฏิกริยาออกซิเดชันได้ภายใต้สภาพที่มีตัวออกซิไดซ์ที่แรง จึงควรหลีกเลี่ยงการใช้ DEAE-Sephacel ในกรณีดังกล่าว สำหรับความคงตัวทางกายภาพมีความคงตัวสูง สามารถฆ่าเชื้อภายใต้อุณหภูมิและความดันสูงได้ที่ 120 องศาเซลเซียส นานกว่า 30 นาที ที่พีเอช 7 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.5.3 ขั้นตอนในการแยกสารโดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

การออกแบบวิธีการแยกสารโดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ อาศัยความแตกต่างกันตามธรรมชาติของประจุสุทธิบนโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก สามารถสรุปเป็นขั้นตอนหลักได้ดังรูปที่ 19 จากแผนภาพในรูปที่ 19 เห็นได้ว่าขั้นตอนหลักของการทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุแบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน แต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้



รูปที่ 19 ขั้นตอนในการทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

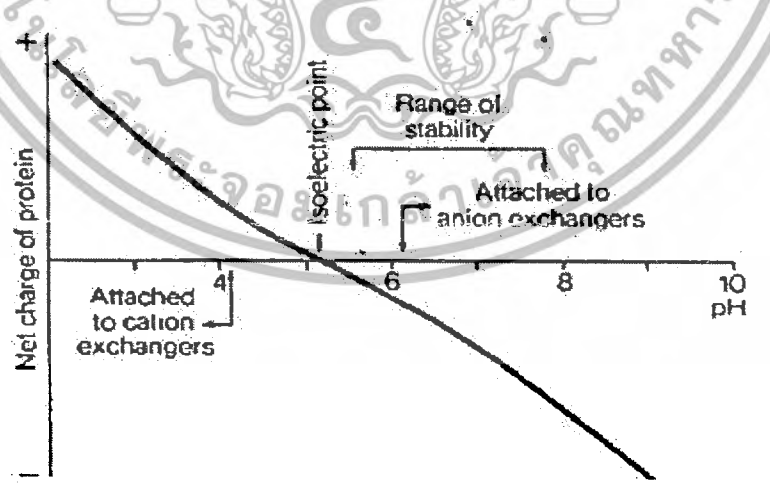
ที่มา : Pharmacia (1991b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 1) การเลือกชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุ การเลือกชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุมีข้อควรพิจารณา 3 ประการ คือ พิจารณาจากความคงตัวเมื่ออยู่ในสารละลายผสมของตัวอย่างที่ต้องการแยก ต้องไม่ทำปฏิกริยาใดๆในอันที่ทำให้สารตัวอย่างที่ต้องการแยกเกิดการเสียสภาพหรือเสียคุณสมบัติไป พิจารณาจากขนาดโมเลกุลของสารผสมในสารละลายตัวอย่าง และพิจารณาจากลักษณะการใช้งานที่จำเพาะกับประเภทของงานที่ใช้เช่นต้องการแยก หรือทำให้บริสุทธิ์เป็นต้น โดยทั้งสามส่วนมีรายละเอียดดังนี้

1.1 ความคงตัว เอนไซม์เป็นสารประกอบประเภท amphoteric polyelectrolytes สามารถเลือกจับได้ทั้งประจุบวกและลบขึ้นอยู่กับสภาพของสารละลาย และช่วงความคงตัวของเอนไซม์ที่ไม่เกิดการเสียสภาพ (enzymes stability) สารตัวอย่างเกิดการแลกเปลี่ยนประจุกับตัวแลกเปลี่ยนประจุก็ต่อเมื่อสารนั้นมีประจุตรงข้ามกับกลุ่มประจุบนตัวแลกเปลี่ยนประจุ สารบางชนิดสามารถแลกเปลี่ยนได้ทั้งประจุบวกและลบโดยขึ้นอยู่กับค่าพีเอชและค่า pI ของโปรตีนชนิดนั้นเพื่อให้แสดงลักษณะประจุบวกหรือลบ ดังสมการ

แสดงลักษณะของประจุสุทธิบนโมเลกุลโปรตีนที่เปลี่ยนไปตามค่าพีเอชดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 ประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนที่เปลี่ยนไปตาม pH ในการเลือกชนิดตัวแลกเปลี่ยนประจุ

ที่มา : Pharmacia (1991b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 20 แสดงแนวทางในการเลือกชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุได้ โดยพิจารณาจากช่วงความคงตัวของโปรตีนเป็นหลัก มีข้อควรพิจารณาดังนี้

1) กรณีที่โปรตีนไม่สลายตัวที่ pH > pI โปรตีนแสดงประจุสุทธิเป็นลบ เลือกใช้ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger) เช่น DEAE-Sephadex , QAE-Sephadex

2) กรณีที่โปรตีนไม่ไม่สลายตัวที่ pH < pI โปรตีนแสดงประจุสุทธิเป็นบวก เลือกใช้ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchanger) เช่น CM-Sephadex , SP-Sephadex

3)กรณีที่โปรตีนไม่สลายตัวที่ช่วงพีเอชมากกว่าหรือน้อยกว่าค่า pI 1 หน่วยพีเอช สามารถเลือกใช้ได้ทั้งตัวแลกเปลี่ยนประจุลบและบวก

1.2 ขนาดโมเลกุลของสารผสมในสารละลายตัวอย่าง สามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุได้ โดยพิจารณาจากส่วนต่างๆดังนี้

1)โมเลกุลขนาดเล็ก (MW < 10,000) เช่น นิวคลีโอไทด์ เปปไทด์ ควรเลือกใช้ Sephadex C-25 หรือ A-25 ให้ประสิทธิภาพทั้งด้านความจุ การแยกได้สูงสุด และมีราคาถูก

2)โมเลกุลขนาดกลาง (MW 10,000 - 100,000) เช่น โปรตีนทั่วไป (normal proteins) เลือกใช้ DEAE-Sephacel และ Sepharose ion exchanger เป็นต้น

3)โมเลกุลขนาดใหญ่ (MW > 100,000) เช่น โปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อน (proteins complex) กรดนิวคลีอิค เลือกใช้ DEAE-Sephacel หรือ Sepharose ion exchanger นอกจากนี้อาจใช้ Sephadex anion A-25 หรือ Sephadex cation C-25 เพราะมีขนาดเม็ดเจลเล็กทำให้มีความหนาแน่นของประจุบนพื้นที่ผิวสูง

4) ตัวอย่างที่ไม่ทราบขนาดโมเลกุล (Unknown MW) ควรเลือกใช้ DEAE-Sephacel หรือ Sepharose ion exchanger เพราะมีความจุของน้ำหนักโมเลกุลในช่วงกว้าง โดยเฉพาะ Sepharose ion exchanger ให้อัตราการไหลสูงเกิดการแยกได้เร็ว เหมาะสำหรับระบบที่มีขนาดใหญ่

1.3 ประเภทการใช้งานที่จำเพาะกับข้อบ่งใช้ พิจารณาได้จากปัจจัยแวดล้อมที่เกี่ยวข้องแบ่งเป็น 4 ประการดังนี้

1) ลักษณะธรรมชาติของสิ่งที่ต้องการแยก ควรแบ่งกลุ่มสารออกเป็นกลุ่มสารที่ต้องการแยกเก็บและกลุ่มสารที่ไม่ต้องการ โดยอาจเลือกให้สารที่สนใจถูกยึดจับไว้ในคอลัมน์หรือให้หลุดออกมาก่อนก็ได้ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุ และชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

2) อัตราการไหลของบัฟเฟอร์ ถ้าต้องการแยกสารที่มีปริมาตรมากควรพิจารณาให้มีอัตราการไหลเร็วที่สุด โดยเลือกชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุที่เหมาะสมกับขนาดปริมาตรของสารในการแยก เช่น การแยกสารขนาดใหญ่โดย Sephadex ion exchanger ให้อัตราการไหลสูงสุด

3) ความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) ราคา พิจารณาประกอบกับค่าความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) ในการทำงานของตัวแลกเปลี่ยนประจุ

ขั้นตอนที่ 2) การเลือกบัฟเฟอร์

2.1 ชนิดของบัฟเฟอร์ ถ้าไอออนของบัฟเฟอร์มีประจุตรงข้ามกับหมู่ฟังก์ชันของตัวแลกเปลี่ยนประจุ ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนประจุกับส่วน counter ion ได้ส่งผลให้พีเอชของสารละลายเปลี่ยนแปลงไปทำให้โปรตีนที่ถูกยึดจับไว้มีการเปลี่ยนแปลงของประจุสุทธิบนโมเลกุลถูกชะหลุดออกมาจากคอลัมน์ได้ การเปลี่ยนแปลงดังกล่างเกิดได้ 2 กรณี คือ

1)ใช้ cationic buffer กับตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ

2)ใช้ anionic buffer กับตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก

ตัวอย่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้งานทั่วไปแสดงในตารางที่ 13 และ 14

ตารางที่ 13 บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

ชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุ	ชนิดของไอออนในบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้	พีเอชเริ่มต้นของบัฟเฟอร์
ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ	ไอออนบวก เช่น alkylamines , aminoethyl alcohol , ammonium ethylenediamine , imidazole , Tris , pyridine เป็นต้น	1 หน่วยพีเอช เหนือค่า pI ของโปรตีน
ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก	ไอออนลบ เช่น acetate , barbiturate , citrate , glycine , phosphate เป็นต้น	1 หน่วยพีเอช ต่ำกว่าค่า pI ของโปรตีน

2.2 การเลือกช่วงพีเอชของบัฟเฟอร์และความแรงประจุ (ionic strength) ในกรณีตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger) เลือกพีเอชเริ่มต้นประมาณ 1 หน่วยพีเอช เหนือค่า pI และช่วงพีเอชต่ำกว่าค่า pI 1หน่วยพีเอช เมื่อเลือกใช้ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchanger) เพื่อให้หมู่ ฟังก์ชันที่แสดงประจุบนโมเลกุลณปรตีนสามารถแสดงประจุได้อย่างเต็มที่ แต่การเลือกช่วงพีเอชดังกล่าวต้องพิจารณาถึงความคงตัวของโปรตีนและตัวแลกเปลี่ยนประจุด้วย ช่วงพีเอชที่นิยมใช้กับตัวแลกเปลี่ยนประจุทั้งสองชนิดแสดงดังตารางที่ 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 ชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุและบัฟเฟอร์ที่ใช้

ตัวแลกเปลี่ยนประจุ	บัฟเฟอร์
<u>ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ</u>	<u>บัฟเฟอร์ที่มีประจุบวก</u>
DEAE-Sephadex	Alkyl amines, aminoethyl alcohol , ammonia ,
QAE-Sephadex	barbital (pH<7.5) ,ethylene diamine , imidazole
	Pyridine , Tris.
<u>ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก</u>	<u>บัฟเฟอร์ที่มีประจุลบ</u>
CM-Sephadex	Acetate , barbital , citrate , glycine , phosphate.
SP-Sephadex	

ตารางที่ 15 ช่วงพีเอชที่เลือกใช้กับตัวแลกเปลี่ยนประจุแต่ละชนิด

ตัวแลกเปลี่ยนประจุ	ช่วงพีเอชที่ใช้
DEAE-Sephadex	2 – 9
QAE-Sephadex	2 – 10
CM-Sephadex	6 – 10
SP-Sephadex	2 – 10

วิธีการหาพีเอชเริ่มต้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้สามารถทำการทดสอบเบื้องต้นได้โดยใช้ วิธีการที่เรียกว่า Test tube trial and error method มีวิธีการดังนี้

1) เตรียมหลอดทดลองขนาด 10 x 15 มล. เติม 0.1 กรัมของตัวแลกเปลี่ยนประจุ เช่น Sephadex ion exchanger หรือ 1.5 มล. ของ Sepharose หรือ Sephacel ion exchanger ลงไป

2) ทำเจลในแต่ละหลอดให้อิ่มตัวด้วย 0.5 โมลาร์ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ตามชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุที่เลือกใช้ โดยแบ่งช่วงพีเอชจาก 5 ถึง 9 สำหรับตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ และพีเอช 4 ถึง 8 สำหรับตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก โดยให้มีช่วงห่างของแต่ละหลอดทดลองเท่ากับ 0.5 หน่วยพีเอช วิธีการทำเจลให้อิ่มตัวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทำได้โดยการล้างเจลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 มล.

3) ทำการชะเจลแต่ละหลอดโดยใช้ 0.05 โมลาร์ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ สำหรับ Sephadex ส่วน Sepharose และ Sephacel ใช้ 0.01 โมลาร์ ในการชะ ทำโดยการล้างเจลด้วยบัฟเฟอร์ 10 มล. ที่พีเอชเดียวกันกับข้อ 2 ทำการล้างทั้งหมด 5 ครั้ง

4) เติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงไป ผสมให้เข้ากับเจลทิ้งไว้ 5 - 10 นาที

5) ทิ้งให้เจลเกิดการเซทตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) ตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์หรือโปรตีน ในส่วนสารละลายใส

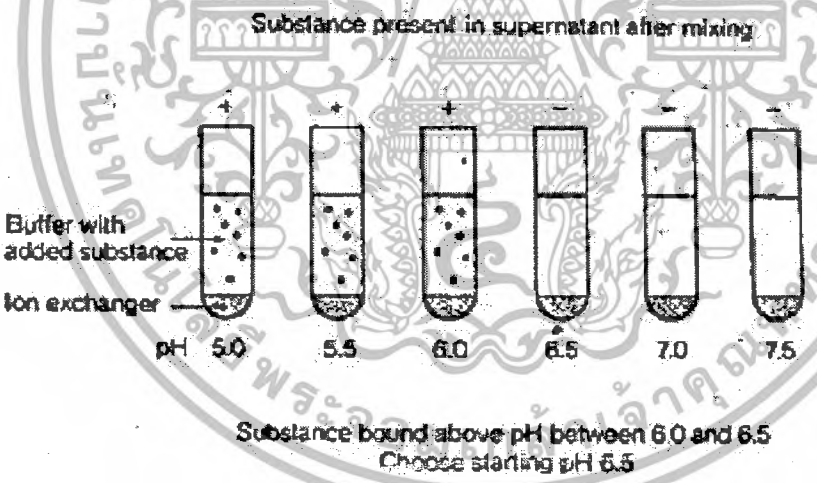
จากขั้นตอนการทดลองเบื้องต้นทั้ง 6 ขั้นตอนแสดงผลที่เกิดขึ้นดังรูปที่ 20 จากรูปเลือกใช้พีเอช 6.5 เป็นพีเอชที่สารตัวอย่างเกิดการแลกเปลี่ยนประจุ

สำหรับวิธีการตรวจสอบค่าความแรงไอออนเริ่มต้นที่เหมาะสมในการใช้ชะไล่สารออกจากคอลัมน์มีวิธีการทดสอบดังนี้

1) ทำการทดลองเตรียมเจลเหมือนวิธีการหาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม จากนั้นจึงชะเจลให้อิ่มตัวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมจากการทดลองแรก 10 มล. จำนวน 10 ครั้ง

2) ในกรณีที่ใช้ Sephadex ion exchager ให้แปรความแรงไอออนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่ จาก 0.05 โมลาร์ ไปเป็น 0.5 โมลาร์ สำหรับ Sepharose ion exchager ให้แปรความเข้มข้นเกลือจาก 0.01 โมลาร์ ไปเป็น 0.3 โมลาร์ ที่พีเอชคงที่ ทำการล้างทั้งหมด 5 ครั้งๆ ละ 10 มล. การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือให้เพิ่มทีละ 0.05 โมลาร์

3) เติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงไป ตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์หรือโปรตีนที่สนใจในส่วนสารละลายใส เหมือนกับวิธีการหาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม



รูปที่ 21 การเลือกพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการทำโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุโดยวิธี Test tube trial and error.

ที่มา : Pharmacia (1991b)

2.3 การเติมเจลลงในคอลัมน์ ตัวแลกเปลี่ยนประจุที่ผ่านการทำให้อิ่มตัวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เริ่มต้นมีลักษณะข้นหนืด (slurry) และเรียงตัวเป็นชั้นหนา ดังนั้นต้องระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นในระหว่างการเทเจลลงในคอลัมน์ ลำดับขั้นตอนในการเติมเจลลงในคอลัมน์มีดังนี้

1) ตั้งคอลัมน์ เช็คว่าตั้งฉากกับพื้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) เติมบัฟเฟอร์เริ่มต้นลงไปพอประมาณ นำสำลีหรือใยแก้วรองไว้ที่ก้นคอลัมน์พร้อมกับใช้แท่งคนยาวๆ กดไล่ฟองอากาศออกจากสำลีหรือใยแก้วให้หมด

3) เทเจลที่เตรียมไว้ลงไปในคอลัมน์ผ่านกรวยแก้ว โดยมีการกวนตลอดเวลา (รูปที่ 22) โดยระมัดระวังให้ชั้นเจลที่กำลังเรียงตัวต้องอยู่ต่ำกว่าระดับบัฟเฟอร์อย่างน้อย 1 ซม. ตลอดเวลาในขณะเทเจลระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นอย่างเด็ดขาด

4) ปล่อยให้เม็ดเจลเกิดการเรียงตัวตามแรงโน้มถ่วงของโลก ทิ้งไว้ 5 - 10 นาที

5) ชะบัฟเฟอร์เริ่มต้นลงไปในคอลัมน์และต่อเปิดด้านบนของคอลัมน์เข้ากับภาชนะบรรจุบัฟเฟอร์

6) ปรับปลายด้านล่างของคอลัมน์ให้มีอัตราการไหลออกของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความดัน 1 ซม.ของน้ำ ต่อความสูงของชั้นเจล 1 ซม. หรือควบคุมความดันในขณะเม็ดเจลเกิดการเรียงตัวให้คงที่ในช่วง 0.13 - 0.34 bar

7) ปล่อยให้เกิดการเรียงตัวของชั้นเจลภายใต้ pressure head คงที่ตามข้อ 6 ทิ้งไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง ระมัดระวังให้มีสารละลายบัฟเฟอร์ท่วมเหนือชั้นเจลอย่างน้อย 1 นิ้ว

2.4 การเติมสารตัวอย่างลงในคอลัมน์ ทำการลดระดับสารละลายบัฟเฟอร์ลงมาจนเท่ากับระดับชั้นเจลที่เรียงตัวอยู่ โดยใช้ปิเปต หรือ syringe ดูดออก แน่ใจว่าปลายล่างของคอลัมน์ปิด จากนั้นจึงทำการปิเปตตัวอย่างใส่ลงบนผิวหน้าของชั้นเจล เปิดปลายล่างของคอลัมน์ เมื่อตัวอย่างผ่าน เข้าไปในชั้นเจลจนหมดให้ดูดสารละลายบัฟเฟอร์เริ่มต้นปริมาตรเล็กน้อยชะไล่สารตัวอย่างลงมา จากนั้นจึงต่อปลายด้านบนของคอลัมน์เข้ากับอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดลักษณะ gradient ต่อไปแสดงดังรูปที่ 22 ปัญหาที่มักเกิดขึ้นระหว่างการเติมสารตัวอย่างลงไปในชั้นเจล เกิดจากการเรียงตัวของชั้นเจลที่ไม่สม่ำเสมอและ อัตราการไหลของการชะตัวอย่างมีอัตราเร็วไม่สม่ำเสมอ แสดงข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นภายในคอลัมน์ดังรูปที่ 24

2.5 การชะสารตัวอย่างโดยการทำให้เกิด Elution Gradient หลังจากปล่อยให้สารตัวอย่างเกิดการแลกเปลี่ยนประจุกับตัวแลกเปลี่ยนประจุแล้ว วิธีการชะไล่สารตัวอย่างที่ต้องการออกมาจากคอลัมน์สามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้

1) เปลี่ยนพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะไล่สาร โดยปรับพีเอชให้เข้าใกล้ค่า pI ทำให้ประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนเป็นกลางทางไฟฟ้า จึงหลุดออกจากตัวแลกเปลี่ยนประจุ

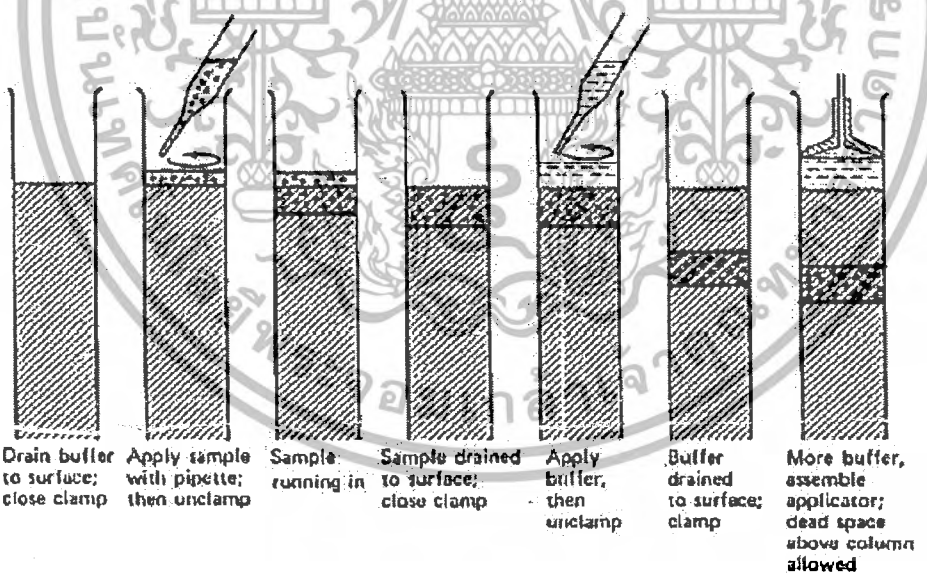
2) เปลี่ยนความแรงประจุ (ionic strength) โดยที่ความแรงประจุต่ำ การแข่งขันของกลุ่มที่มีประจุในสารละลายบัฟเฟอร์แย่งจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุได้ไม่ดี ทำให้สารตัวอย่างสามารถจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุได้ดี เมื่อเพิ่มความแรงของประจุมากขึ้นกลุ่มสารที่มีประจุในสารละลายบัฟ-เฟอร์จะเกิดการแข่งขันจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุได้ดียิ่งขึ้น เกิดการแทนที่สารตัวอย่างที่บริเวณผิวของตัวแลกเปลี่ยนประจุ ทำให้สารตัวอย่างหลุดออกมาจากคอลัมน์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการชะสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ทำได้ 2 แบบ คือ เพิ่มความแรงประจุแบบลำดับขั้น (Stepwise elution) และการเพิ่มความแรงประจุแบบต่อเนื่อง (Continuous gradients) แบบแรกสามารถทำได้โดย

รูปที่ 22 การเติมตัวแลกเปลี่ยนประจุลงในคอลัมน์

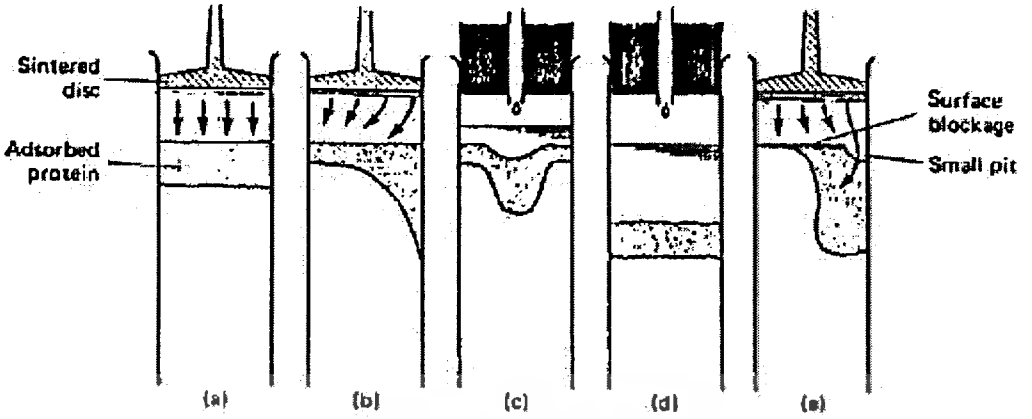
ที่มา : Scopes (1988)



รูปที่ 23 การเติมสารตัวอย่างลงในคอลัมน์

ที่มา : Scopes (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 24 ปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการชะสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ a) สภาวะปกติ b) มีช่องว่างด้านข้างของคอลัมน์ c) เกิดการไหลลงตรงกลางชั้นเจลมากเกินไป d) สภาวะปกติ e) อนุภาคบางชนิด ในสารตัวอย่างเกิดการอุดตัน (clogging) บริเวณผิวของชั้นเจลด้านซ้ายมือของคอลัมน์

ที่มา : Scopes (1988)

การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ทราบความแรงประจุชะไล่สารตัวอย่างออกมา โดยค่อยๆเพิ่มความแรงประจุเป็นแบบลำดับขั้น ความสัมพันธ์ระหว่างการปรับพีเอชและการปรับค่าความแรงประจุแสดงดังตารางที่ 16 และรูปที่ 25

วิธีการชะสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ทำได้ 2 แบบ คือ เพิ่มความแรงประจุแบบลำดับขั้น (Stepwise elution) และการเพิ่มความแรงประจุแบบต่อเนื่อง (Continuous gradients) แบบแรกสามารถทำได้โดยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ทราบความแรงประจุชะไล่สาร ตัวอย่างออกมาโดยค่อยๆเพิ่มความแรงประจุเป็นแบบลำดับขั้น ความสัมพันธ์ระหว่างการปรับ พีเอชและการปรับค่าความแรงประจุแสดงดังตารางที่ 16 ในการทำให้เกิด continuous gradients สามารถทำได้ 2 แบบ โดยมีภาชนะบรรจุ limiting buffer และบัฟเฟอร์เริ่มต้นอยู่ โดย limiting buffer เป็นบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่ำ ส่วนบัฟเฟอร์เริ่มต้นมีพีเอชสูงกว่า ดังรูปที่ 24 เมื่อปล่อยให้ limiting buffer ผสมกับบัฟเฟอร์เริ่มต้นแล้วผ่านลงไปในคอลัมน์ทำให้เกิดความแตกต่างของ พีเอช จากสูงไปต่ำตามความยาวของคอลัมน์ อีกกรณีหนึ่งทำได้โดยให้ทั้ง limiting buffer และ บัฟเฟอร์เริ่มต้นมี พีเอชเท่ากัน แตกต่างกันที่ใน limiting buffer มีความเข้มข้นของสารละลายที่มีสารที่ให้ประจุสูงอยู่ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าบัฟเฟอร์เริ่มต้น ตัวอย่างของสารที่มีประจุสูงได้แก่ สารละลายเกลือ เมื่อปล่อยให้ limiting buffer ผสมกับบัฟเฟอร์เริ่มต้นแล้วผ่านลงไปในคอลัมน์ ทำให้เกิดความแตกต่างของอิออน (ionic gradients) จากค่าความแรงอิออนต่ำไปสูงตามความยาวของคอลัมน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างการปรับค่าพีเอช และการปรับค่าความแรงประจุในการชะสารตัวอย่าง

ตัวแลกเปลี่ยนประจุ	ทิศทางการเปลี่ยนแปลงของ	
	พีเอช	ค่าความแรงประจุ
ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ	ลดลง	เพิ่มขึ้น
ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก	เพิ่มขึ้น	ลดลง

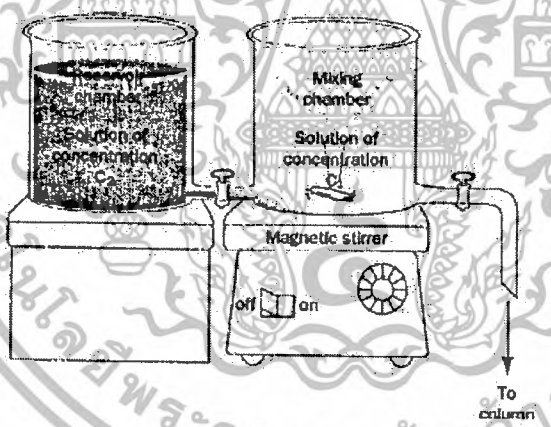
2.6 การประยุกต์ใช้งาน การนำเอาเทคนิคโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุมาใช้งาน สามารถสรุปประเภทของการใช้งานได้ดังนี้

1) การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ เช่นการแยกเอนไซม์ dehydrogenase โดยใช้ anion exchanger Sephadex A-50 พบว่าสามารถแยกเอนไซม์ได้ 5 isozymes แสดงดังรูป 25

2) การประยุกต์ใช้กับการทดสอบชนิดของฮอร์โมน

3)การมชี้แยกกรดนิวคลีอิค และนิวคลีโอไทด์

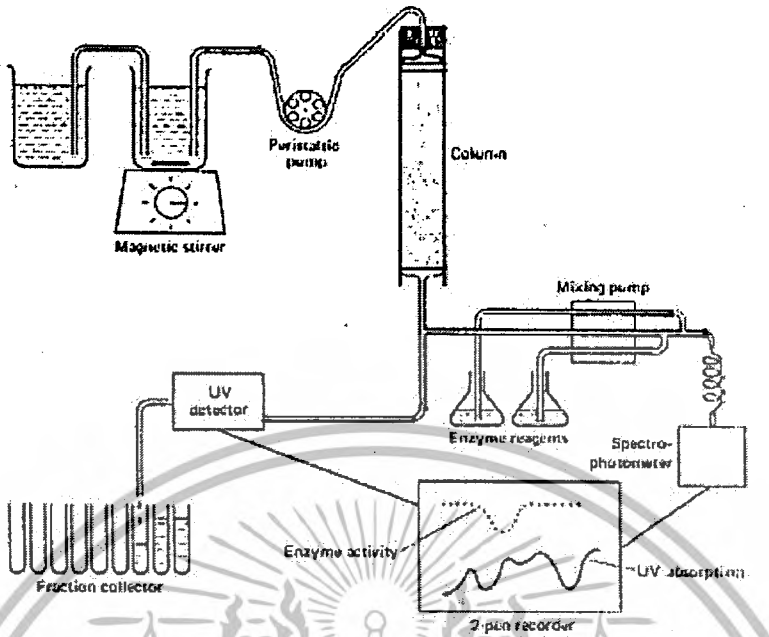
4)การแยกสารคาร์โบไฮเดรต



รูปที่ 25 อุปกรณ์ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของพีเอช หรือสารละลายเกลือ

ที่มา : Voet และ Voet (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 26 อุปกรณ์ในการทำโครมาโตรกราฟีแลกเปลี่ยนประจุแบบอัตโนมัติ
ที่มา : Scopes (1988)

2.6 คุณลักษณะของเอนไซม์ไซลาเนส

2.6.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส

การเปลี่ยนแปลงพีเอชหรือความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน ทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงหรือเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการแตกตัวของเอนไซม์และของสับสเตรต ซึ่งมีผลต่อการจัดรูปร่าง และสภาวะอิออนของเอนไซม์และสับสเตรต นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงพีเอชมากๆ อาจทำให้โปรตีนเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนสภาพธรรมชาติ ซึ่งจะมีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชหนึ่งหรือช่วงพีเอชหนึ่ง เรียกว่า พีเอชที่เหมาะสมที่สุด (optimum pH) ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 17

พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสมีการศึกษาและรายงานจาก Vichien, *et al.* (1984) ทำการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Humicola lanuginose* ซึ่งทำการหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยทำการวัดกิจกรรมที่พีเอช 4.0 ถึง 8.0 พบว่ามีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ พีเอช 6.0 และมีค่าความคงตัวที่พีเอช 5 ถึง 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isao, *et al.* (1995) ทำการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus sojae* ซึ่งมาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสองชนิดคือ X-I และ X-II-B ได้รายงานว่ามีพีเอชที่เหมาะสมที่พีเอช 5.0 และ 5.5 ตามลำดับ และมีค่าความคงตัวที่พีเอชในช่วงพีเอช 5.0 ถึง 8.0 ทั้งคู่

Masanobu, *et al.* (1997) รายงานพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเห็ดราที่ทนความร้อนสายพันธุ์ HG-1 ในช่วงพีเอช 4.5 ถึง 5.0 และค่าความคงตัวที่พีเอชในช่วงพีเอช 2 ถึง 12 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Linssen, *et al.* (1997) ได้ทำการรายงานพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Humicola insolens* โดยมีการผลิตเอนไซม์ เอนโดไซลาเนส ชนิด xyl1 และ xyl2 ทำการวัดกิจกรรมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 3 ถึง 10 พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสทั้งสองชนิดคือ พีเอช 6 ถึง 6.5 และในสภาวะที่เป็นด่าง xyl2 มีความคงตัวมากกว่า (15 ชั่วโมง ที่ พีเอช 6 ถึง 9) ซึ่ง xyl1 จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไปร้อยละ 15 และร้อยละ 46 ที่พีเอช 8 และ 9 ตามลำดับ

Claudio, *et al.* (1999) รายงานพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 5.5 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และได้รายงานว่าเท่ากับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus sydowii* MG49 (Ghosh, *et al.*, 1994) และ *Aspergillus niger* (Wong, *et al.*, 1988)

Ufuk, *et al.* (2001) ทำการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* ATCC 9363 ทำการวัดกิจกรรมที่พีเอช 3.5 ถึง 5.5 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าที่พีเอช 4.8 เป็นพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อชนิดนี้

Anthony, *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติเกี่ยวกับพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* AR1 โดยทำการเปรียบเทียบเอนไซม์ไซลาเนสจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน คือ ไซโลส และไซแลน ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ภายในมีอาหาร CD (CD medium) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าที่ 160 รอบต่อนาที ที่พีเอช 5.0 (ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน) และพีเอช 9.0 (ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน) เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสจากไซโลสมีค่าความคงตัวได้ดีกว่าเอนไซม์ไซลาเนสจากไซแลน โดยที่บ่มเป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์ไซลาเนสจากไซโลสยังคงมีกิจกรรมอยู่ประมาณร้อยละ 95 ในช่วงพีเอช 4.0 ถึง 9.0 ขณะที่เอนไซม์ไซลาเนสจากไซแลนมีกิจกรรมลดลงร้อยละ 30 ที่พีเอช 4.0 และมีกิจกรรมมากว่าร้อยละ 90 ที่พีเอช 6.0 ถึง 9.0 ในกรณีที่บ่มเป็นเวลา 90 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากไซแลนหายไปร้อยละ 20 ถึง 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 17 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	ไซลาเนส	พีเอช[1]	เอกสารอ้างอิง
Acrophialophora nainiana		6.5	Orlando, *et al.* (2003)
Aspergillus fumigatus Fresennius		5.5	Claudio, *et al.* (1999)
Aspergillu niger	xyl I	6.0	Frederick, *et al.* (1985)
	xyl II	5.5	
Aspergillu niger		4.0	Haltrich, *et al.* (1996)
Aspergillu niger		5.0	Ricardo, *et al.* (1985)
Aspergillu niger		4.9	Shei, *et al.* (1985)
Aspergillu niger		5.5	Wong, *et al*
(1988)*Aspergillus sojae*	X-I	5.5	Isao, *et al.* (1995)
	X-II	5.5	
Humicola insolens	xyl I	6.0-6.5	Linssens, *et al.* (1997)
	xyl II	6.0-6.5	
Humicola lanuginose		6.0	Vichien, *et al.*
(1984)*Rhizopus oryzae* ATTC 9363		4.5	Ufuk, *et al.*
(2001)Thermophilic Fungus Strain HG-1		4.5-5.0	Masanobu,*et al.* (1997)

พีเอช[1] หมายถึง พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

2.6.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส

การเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งทำให้เพิ่มขึ้นหรือลดลง เพราะอุณหภูมิที่สูงจะช่วยเร่งอัตราเร็วของปฏิกิริยา ขณะเดียวกันอุณหภูมิที่สูงมากๆ ทำให้เอนไซม์เสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturation) ส่งผลให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลง จึงมีอุณหภูมิหนึ่งเท่านั้นที่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเรียกว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด (optimum temperature) ถ้าสูงกว่า อุณหภูมินี้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่าง แสดงดังตารางที่ 18

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส มีการรายงานจาก Vichien, *et al.* (1984) ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยทำการวิเคราะห์กิจกรรมที่อุณหภูมิในช่วง 45 ถึง 75 องศาเซลเซียส พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในการทำปฏิกิริยา และมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isao, *et al.* (1995) รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus sojae* ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสองชนิดคือ X-I และ X-II-B พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 60 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีค่าความคงตัวที่ 50 องศาเซลเซียส ทั้งคู่ และได้รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อนี้มีค่าใกล้เคียงกับเชื้อ *Aspergillus* sp. ต่างๆ เช่น *Aspergillus awamori* (45 ถึง 50 องศาเซลเซียส) *Aspergillus kawachii* (60 55 และ 50 อาศาเซลเซียส) *Aspergillus niger* (50 องศาเซลเซียส) และ *Aspergillus terrius* (45 องศาเซลเซียส)

Masanobu, *et al.* (1997) รายงานการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและค่าความคงตัว ของเอนไซม์ไซลาเนสจากเห็ดราทนความร้อนสายพันธุ์ HG-1 ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 70 องศาเซลเซียส และค่อนข้างทนความร้อน

Linssen, *et al.* (1997) ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Humicola insolens* ซึ่งผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสองชนิดคือ xyl1 และ xyl2 ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 35 ถึง 70 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6 พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสทั้งสองชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมที่ 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส และศึกษาค่าความคงตัวโดยนำมาบ่มก่อนทำการวิเคราะห์กิจกรรมที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 ถึง 7 ชั่วโมง ซึ่งพบว่า xyl2 สูญเสียกิจกรรม อย่างสิ้นเชิงหลังบ่ม 45 นาที ที่ 60 องศาเซลเซียส และในสภาวะเดียวกัน xyl1 ยังคงมีกิจกรรม อยู่ร้อยละ 50

Anthony, *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติเกี่ยวกับพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* AR1 โดยทำการเปรียบเทียบเอนไซม์ไซลาเนสจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน คือ ไซโลส และไซแลน ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ภายในมีอาหาร CD (CD medium) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าที่ 160 รอบต่อนาที ที่พีเอช 5.0 (ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน) และพีเอช 9.0 (ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน) เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจาก crude enzyme ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ไซลาเนสมีกิจกรรมสูงสุดอยู่ที่อุณหภูมิ 60 ถึง 65 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการเปรียบเทียบกันพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากไซแลนจะค่อยเพิ่มขึ้น ซึ่งต่างจากเอนไซม์ไซลาเนสจากไซโลสที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และทำการทดสอบผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส โดยนำเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสมที่พีเอช 6.0 มาบ่มที่อุณหภูมิ 40 50 55 60 และ 70 องศาเซลเซียส มาบ่มในเวลาต่างๆ กันแล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสจากไซแลนมีค่าความคงตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมเอนไซม์จะค่อยๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที ที่อุณหภูมิสูงกิจกรรมจะลดลงอย่างรวดเร็ว เอนไซม์ไซลา-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนสจากไซโลสมีค่าความคงตัวที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิต่ำ แต่จะสูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 18 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	ไซลาเนส	อุณหภูมิ[1]	เอกสารอ้างอิง
Acrophialophora nainiana		55	Orlando, *et al.* (2003)
Aspergillus fumigatus Fresennius		55	Claudio, *et al.* (1999)
Aspergillus niger		45	Frederick, *et al.* (1985)
Aspergillus niger		50	Gorbacheve, *et al.* (1977)
Aspergillus niger		50	Haltrich, *et al.* (1996)
Aspergillus niger		40-45	Ricardo, *et al.* (1985)
Aspergillus niger		45	Shei, *et al.* (1985)
Aspergillus sojae	X-I	60	Isao, *et al.* (1995)
	X-II	50	
Humicola insolens	xyl1	55-60	Linssens, *et al.* (1997)
	xyl2	55-60	
Humicola lanuginose		65	Vichien, *et al.*
(1984)*Rhizopus oryzae* ATTC 9363		55	Ufuk, *et al.* (2001)
Thermophilic Fungus Strain HG-1		70	Masanobu, *et al.* (1997)

อุณหภูมิ[1] หมายถึง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

2.7 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในระดับอุตสาหกรรม

2.7.1 การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการฟอกเยื่อกระดาษ เพื่อกำจัดลิกนินและลดการใช้คลอรีน

การฟอกเยื่อไม้เพื่อผลิตกระดาษมีปริมาณมากที่สุดถึง 160 ล้านเมตริกตันต่อปีทั่วโลก ในขณะเดียวกันก็เป็นการกำจัดลิกนินที่ก่อให้เกิดสีน้ำตาลเข้มในกระบวนการฟอกเยื่อไม้ ซึ่งมีการ ใช้สารเคมีพวกคลอรีน (chlorine) ในการช่วยฟอกลิกนินที่ละลายน้ำที่เกิดจากการผลิตทำให้น้ำมีสี เข้มขึ้นและก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้นยังพบสารพิษไดออกซิน (dioxin) ในน้ำเสียที่เกิดจากการฟอกเยื่อไม้อีกด้วย จึงมีการคิดค้นหาวิธีที่จะลดปริมาณการใช้คลอรีนในการ ฟอกเยื่อไม้ลง

Viikari (1986) เป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่ใช้วิธีการ biobleaching โดยใช้เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตเป็นทางการค้าจากเชื้อราและแบคทีเรีย เอนไซม์ไซลาเนสที่มีกิจกรรมสูงและมีความเสถียรภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ๆ ได้จากจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(thermophillic microorganism) พวกแอคติโนมัยสีท (Actinomyces) เป็นแหล่งเอนไซม์ไซลาเนสที่สำคัญ และมีรายงานว่ามีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Streptomyces mesohilic* เพื่อใช้ในการฟอกเยื่อไม้

Buchert (1994) ได้ทำการทดลองศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ พบว่ามีปัญหาที่เกิดจากการใช้คลอรีน ในอุตสาหกรรมฟอกขาวของกระดาษ คือ คลอรีนส่วนหนึ่งจะกลายเป็นก๊าซและบางส่วนจะกลายเป็นคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) ซึ่งเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงได้นำเอนไซม์ไซลาเนสมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกขาวแทนคลอรีน ซึ่งจะไม่เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

เอนไซม์ไซลาเนสได้นำมาใช้ในการฟอกขาวของอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ เพื่อลดการใช้คลอรีน การทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสจะช่วยในการย้ายลิกนิน (lignin) ออกจากเยื่อซึ่งจะทำให้การฟอกขาวง่ายขึ้น เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อราและแบคทีเรียจะทำงานที่ pH 10 และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

2.7.2 การผลิตและการนำเซลลูโลติกเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในการไฮโดรไลซิสของเสียทางการเกษตร

ของเสียทางการเกษตรเช่น ฟางข้าว รำข้าวสาลี ฟางข้าวสาลี ผงเซลลูโลส กระดาษ หางนม และอื่นๆ อีกมากมายที่สามารถนำมาใช้เป็นสับสเตรตในการผลิตเอนไซม์ แต่มีปัญหาตรงที่กระบวนการแปรสภาพวัตถุดิบให้สามารถนำมาใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์นั้น ต้องใช้ต้นทุนสูง ดังนั้นจึงต้องใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก รำข้าวสาลีและฟางข้าวซึ่งเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งที่ได้จากการเกษตรและมีปริมาณมาก สามารถนำมาใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และดี-ไซลาเนส โดยใช้จุลินทรีย์พวกเซลลูโลไลติกเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น *Aspergillus ustus Trichoderma sp. Botrytis sp.* และ *Sporotrichum pulverulentum* เป็นต้น

การย่อยสลายมวลชีวภาพของพืชในธรรมชาติเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ จากการศึกษาการใช้เชื้อผสมระหว่างจุลินทรีย์ 2 ชนิด เพื่อดูกิจกรรมของเบต้า-ดี-กลูโคซิเดส พบว่า ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ได้ เพราะว่าผลผลิตจากการเมแทโบไลต์ของจุลินทรีย์ชนิดแรกจะยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ฟางข้าวเป็นสับสเตรตที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและดี-ไซลาเนส จากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส พบว่าโปรตีนที่ได้จากฟางข้าวเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 3 เป็นร้อยละ 7 ในขณะ ที่รำข้าวสาลีมีปริมาณโปรตีนลดลงจากร้อยละ 14 เหลือร้อยละ 10 เป็นไปได้ที่จุลินทรีย์ใช้ โปรตีนในรำข้าวสาลีเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโต โปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายนี้ สามารถนำไปใช้เลี้ยงสัตว์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3 ใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสเพื่อแก้ปัญหาทางด้านพลังงานและการขาดแคลนอาหาร

การย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญกระบวนการหนึ่งทางเทคโนโลยีชีวภาพและสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้ผลิตสารละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล หรือโปรตีนเซลล์เดียว เพื่อเป็นการแก้ปัญหาทางด้านพลังงานและการ ขาดแคลนอาหาร โดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเพื่อ เปลี่ยนของเสียทางการเกษตรให้เป็นสารละลายน้ำตาล

ของเสียทางการเกษตรสามารถเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาลได้ โดยเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสจากจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ *Sporotrichum pruinosum* และ *Arthrographis sp.* โดย *Sporotrichum pruinosum* สามารถเกิดไฮโดรไลซิสได้สูงสุดประมาณร้อยละ 15.1 และ *Arthrographis sp.* ร้อยละ 7.5 โดยใช้เปลือกแตงโมเป็นสับสเตรต การทำสับสเตรตให้มีสภาพ เป็นด่างสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่ละลายน้ำ ได้ใช้วิธี HPLC โดยจะพบกลูโคสมากที่สุดและไซโลโบโอสในปริมาณเล็กน้อย ส่วนผลผลิต พวกไซลา-โนไลติคส่วนมากจะเป็นพวกไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนไซโลไบโอสจะพบไซโลส และอะราบิ-โนสในปริมาณน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ

3.1.1 จุลินทรีย์

ใช้เชื้อ *Aspergillus niger* ที่ได้จากการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์จากดินในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยโดย เรวดี ปรีบัว (2547)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.2.1 อาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อราเพื่อเป็น stock culture (ภาคผนวก ก)

3.1.2.2 อาหารเหลวใช้เลี้ยงเชื้อในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ประกอบด้วย

KH_2PO_4	2.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.3	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.3	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2HPO_4$	1.4	กรัมต่อลิตร
ยูเรีย	0.45	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	0.25	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	0.05	กรัมต่อลิตร
Tween 80	ร้อยละ 0.1	

3.1.3 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ การหาปริมาณโปรตีน การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ดูในภาคผนวก ก และ ข

3.2 อุปกรณ์

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

เครื่องเขย่าหลอด (vortex mixer)

เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)

สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้องจุลทรรศน์

ชุดอัลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration)

ชุดกำจัดเกลือ (desalting column)

ชุดเก็บตัวอย่าง (fraction collector)

เครื่องกวน (magnetic stirrer)

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ

3.3 วิธีการ

3.3.1 การวิเคราะห์

3.3.1.1 การนับสปอร์ของเชื้อรา เจือจางสปอร์เชื้อราด้วยน้ำที่ผสม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 หยดลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ นับจำนวนสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

3.3.1.2 โปรตีน วิเคราะห์ตามวิธีของ Lowry, *et al.* (1984) ดูในภาคผนวก ข

3.3.1.3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส วิเคราะห์ตามวิธีของ Tang, *et al.* (1987)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายไซแลน (oat spelt xylan) ในซิเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid,DNS) 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นทันที เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทำการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเทียบค่าปริมาณไซโลสจากกราฟมาตรฐานไซโลส (ภาคผนวก ข) คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์มีหน่วยเป็น ยูนิต โดยที่

1 ยูนิต (IU) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.3.1.4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมธิลเซลลูเลส (CNCase) วิเคราะห์ตามวิธีของ Mandles และ Weber (1969)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายคาร์บอกซิเมธิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose, CMC) ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ใน ซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นทันที เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทียบค่าปริมาณกลูโคสจากกราฟมาตรฐานกลูโคส (ภาคผนวก ข) คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วยยูนิต โดยที่

1 ยูนิต (IU) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรต ให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้วิธีการวิเคราะห์แบบมาตรฐาน

3.3.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์

3.3.2.1 การเตรียมเอนไซม์จากเชื้อรา

1. การเตรียมสปอร์จากเชื้อรา

จากเชื้อรา *Aspergillus niger* ในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นเอียง PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เชื้อราสร้างสปอร์ ให้เทคนิคปลอดเชื้อทำการแยกสปอร์ โดยใช้สารละลาย tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้เข็มเขี่ยเชื้อขูดสปอร์ให้หลุดจากเส้นใยเชื้อรา และเจือจางสปอร์ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2. การเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* ในอาหารเหลวสูตร Xylan medium ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นำไปทำการเขย่าตลอดเวลาที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

3. การเก็บเกี่ยวเอนไซม์

ทำการกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเส้นใยรา และส่วนที่ไม่ละลายออก นำส่วนที่กรองได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้ (crude enzyme) นำ crude enzyme มาศึกษาคุณลักษณะต่างๆ และนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

3.3.2.2 การแยกและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้ คือ

1. การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำ crude enzyme ที่ได้มาทำ salt fractionation เพื่อหาช่วงความอิ่มตัวที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละดังนี้ 0-20, 20-40, 40-60 และ60-80 เมื่อได้ช่วงที่เหมาะสม นำข้อมูลที่ได้มาหาช่วงที่เหมาะสมให้แคบลง โดยในแต่ละระดับจะเติมแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยๆ โดยใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่กำหนดไว้(ภาคผนวก ก) ขณะที่เติมจะกวนช้าๆ ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนที่ได้แต่ละครั้งมาละลายด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.8 โดยใช้บัฟเฟอร์ปริมาณเล็กน้อย ทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เซลลูเลส และปริมาณโปรตีนละลายได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การกำจัดเกลือ

ทำการกำจัดเกลือด้วยชุดกำจัดเกลือ โดยใช้หลอดฉีดยาดูดสารละลายเอนไซม์ครั้งละ 1.5 มิลลิลิตร และซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดียวกันปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ทำการเก็บสารละลายเอนไซม์ลงหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เพื่อดูว่าหลอดทดลองไหนมีโปรตีนอยู่ เก็บหลอดที่มีโปรตีนมารวมกัน ทำการชะเกลือออกจากคอลัมน์ด้วยเอธานอล 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์

3. การทำเอนไซม์ให้เข้มข้นโดยการผ่านอัลตราฟิวเตรชัน

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไป ผ่านอัลตราฟิวเตรชัน โดยใช้แผ่นเมมเบรนที่มีขนาดของ molecular weight cut off เท่ากับ 10,000 ดาลตัน เพื่อทำให้สารละลายเอนไซม์เข้มข้นขึ้น แล้วนำสารละลายไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ไซลาเนส และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

3.3.2.3 การศึกษาคุณลักษณะบางประการของเอนไซม์ไซลาเนส

1. พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

นำ crude enzyme ที่มีความเข้มข้นอย่างเหมาะสมทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีการวิเคราะห์ที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสใช้สารละลายไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 ในบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ คือ ใช้บัฟเฟอร์ชนิดซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 และใช้บัฟเฟอร์ชนิดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 และ 8.0 จากนั้นนำไปคำนวณค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ไซลาเนสในรูปกิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity)

2. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

นำ crude enzyme ที่มีความเข้มข้นอย่างเหมาะสมทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีการวิเคราะห์ที่กล่าวไว้ข้างต้นใน การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยทำการบ่มเอนไซม์ที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปคำนวณค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ไซลาเนสในรูปกิจกรรมสัมพันธ์

3. ผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส

นำ crude enzyme มาบ่มที่พีเอชต่างๆ คือ ใช้บัฟเฟอร์ชนิดซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 3.0 4.0 5.0 และ 6.0 และใช้บัฟเฟอร์ชนิดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 และ 8.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม ก่อนนำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรตที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่พีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองพีเอชที่เหมาะสม จากนั้นนำไปคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในรูปกิจกรรมที่เหลือ (residual activity)

4. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส

นำ crude enzyme มาบ่มที่ อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 30 60 90 และ 120 นาที แล้วนำไปทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส จากนั้นนำไปคำนวณหาค่า กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในรูปกิจกรรมที่เหลือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เอนไซม์จากเชื้อรา

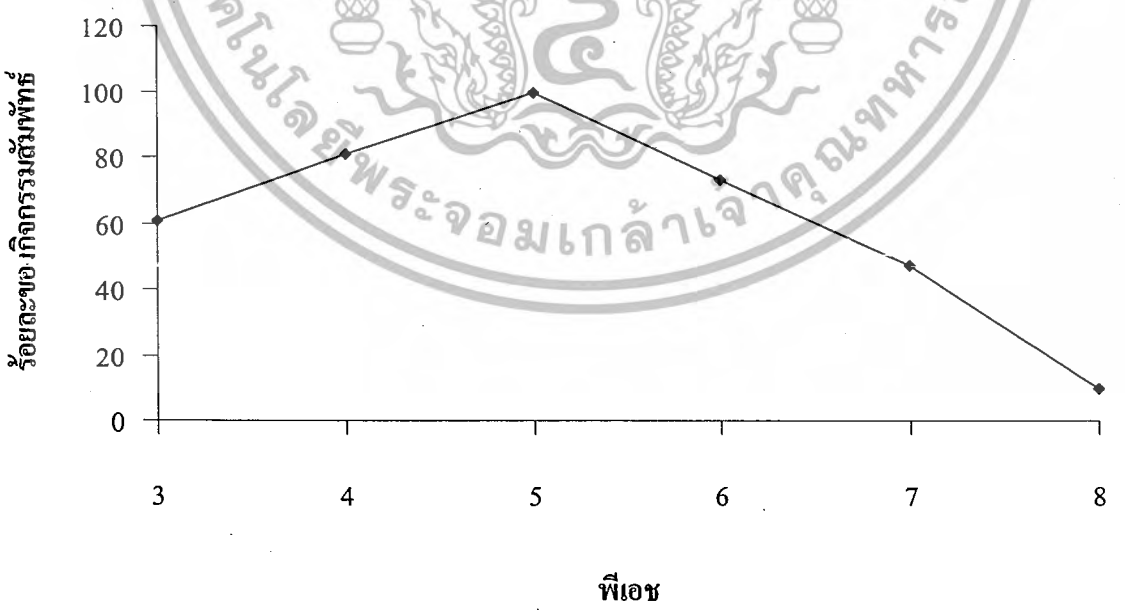
ผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยการหมักในอาหารเหลว ในสภาวะเขย่า (shake flask fermentation) มีค่ากิจกรรม (activity) เท่ากับ 158.49 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนส (specific activity) เท่ากับ 0.645 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ค่ากิจกรรมรวมของเอนไซม์ไซลาเนส (total activity) เท่ากับ 45,936 ยูนิต มีปริมาณโปรตีนรวม (total protein) เท่ากับ 245.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. คุณลักษณะของเอนไซม์ไซลาเนส

นำเอนไซม์ที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ ไซลาเนสในขั้นตอนต่อไปนี้

2.1 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์

เมื่อตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในช่วงพีเอชต่าง ๆ กัน คือ 3.0 ถึง 8.0 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 5.0 โดยที่พีเอช 3.0 เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็นร้อยละ 60.69 ที่พีเอช 4.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์ร้อยละ 80.80 และเมื่อเพิ่มพีเอชสูงกว่า 5.0 ขึ้นไปเอนไซม์มีกิจกรรมลดลงจนถึงพีเอช 8.0 เอนไซม์มีกิจกรรม สัมพัทธ์เพียงร้อยละ 9.85 (รูป 27)



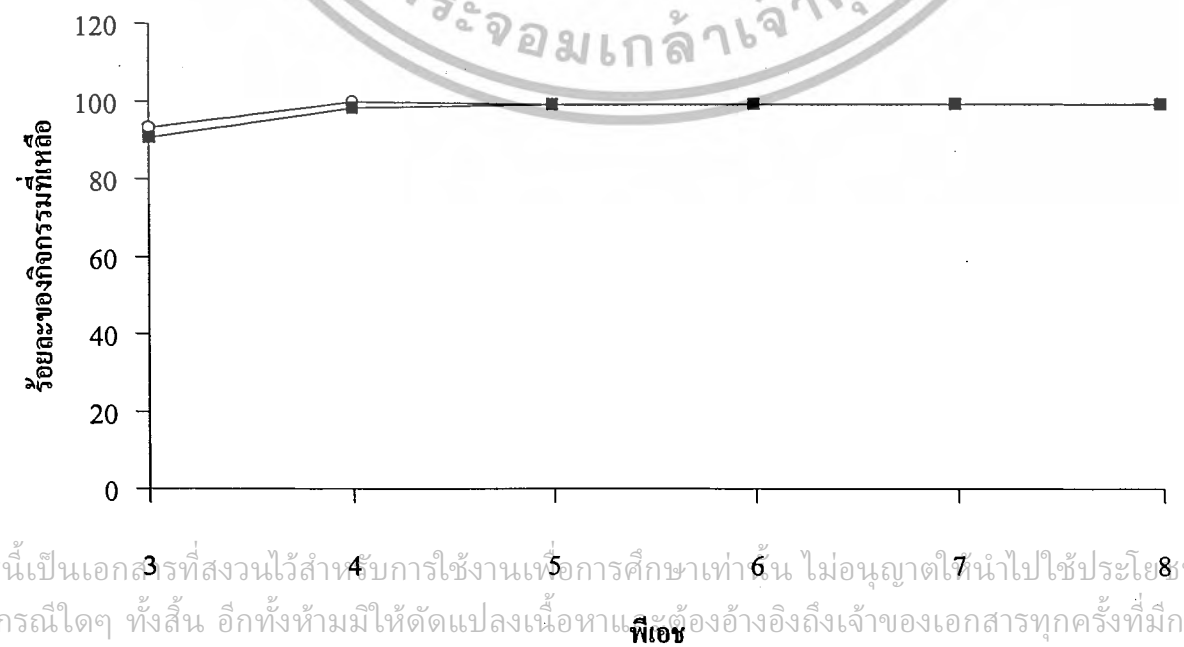
รูปที่ 27 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรายงานการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส พบว่า เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 5.5-6.0 (Frederick, *et al.* 1985) แต่จากการศึกษาของ Haltrich, et al. (1996) พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* คือ 4.0 และRicardo, *et al.* (1985) รายงานว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* คือ 5.0 แต่จากการศึกษาของ Shie, *et al.* (1985) พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* คือ 4.9 และWong, *et al.* (1988) รายงานว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* คือ 5.5 จะเห็นว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วงค่อนข้างเป็นกรด ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ ซึ่งพบว่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus niger* คือ 5.0 จึงอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลาเนสจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา

2.2 ผลของพีเอชต่อค่าความคงตัวของเอนไซม์

จากการทดลองเมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์ไซลาเนสในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่าง ๆ กันคือ 3.0 ถึง 8.0 แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์พบว่าการบ่ม เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมร้อยละ 100 ที่พีเอช 4.0 ขณะที่พีเอช 3.0 เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณร้อยละ 93.0 ส่วนช่วงพีเอช 5.0 ถึง พีเอช 8.0 เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณร้อยละ 99.0 และถ้าบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 5.0 ถึงพีเอช 8.0 โดยยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณร้อยละ 99.0 ขณะที่พีเอช 3.0 และ 4.0 เอนไซม์มีกิจกรรม เหลือประมาณร้อยละ 90.0 และ 98.0 ตามลำดับ (รูปที่ 28)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

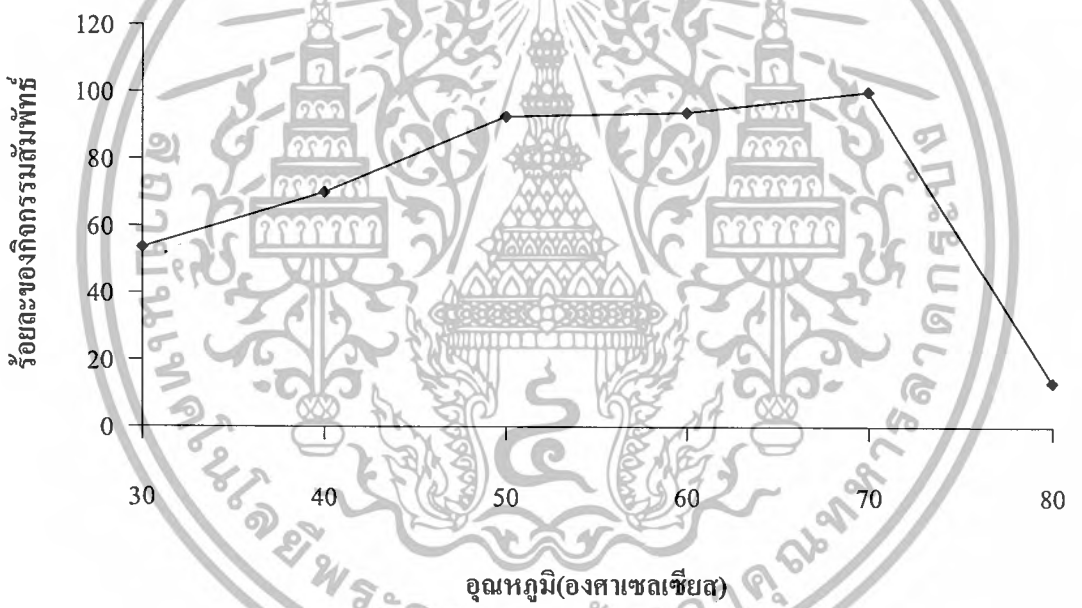
รูปที่ 28 ผลของพีเอชต่อค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*

—○— บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

—■— บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง

2.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันตั้งแต่ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส บ่มนาน 10 นาที โดยใช้บัฟเฟอร์พีเอช 5.0 จากผลการทดลอง 2.1 จะเห็นว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ก็จะเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน และพบว่าที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ประมาณ 53.0, 70.0, 92.0 และ 93.0 ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์สูงที่สุดคือร้อยละ 100 และ เอนไซม์จะมีกิจกรรมสัมพัทธ์ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 13.0 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (รูปที่ 29)



รูปที่ 29 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*

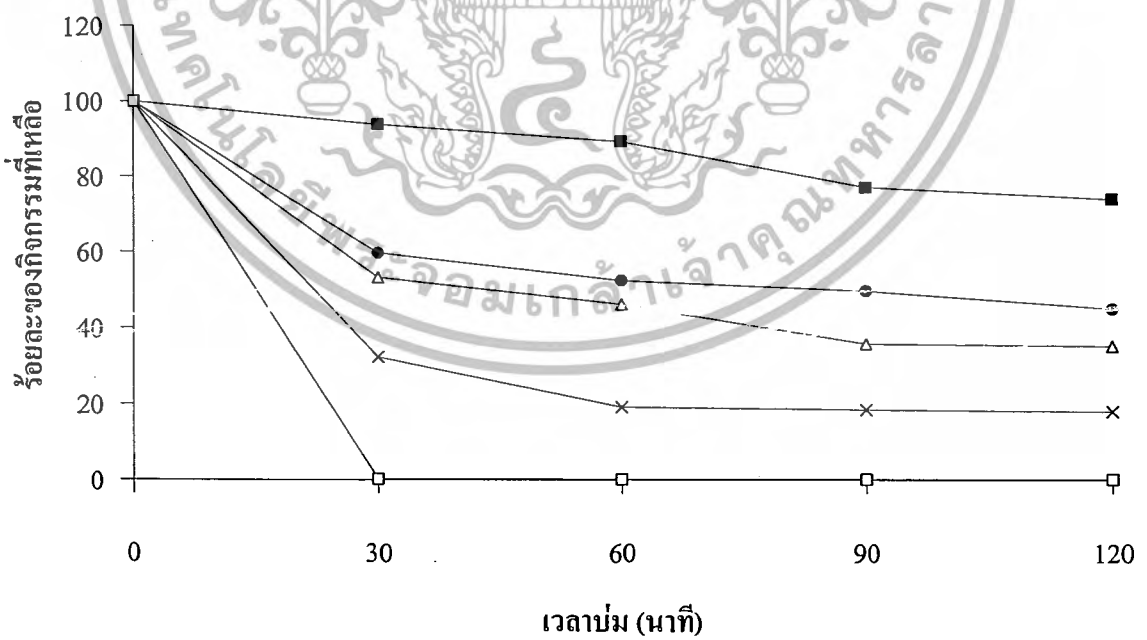
จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส พบว่า เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 45 องศาเซลเซียส (Frederick, *et al.* 1985) แต่จากการศึกษาของ Haltrich, *et al.* (1996) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* คือ 50 องศาเซลเซียส และ Ricardo, *et al.* (1985) รายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* อยู่ในช่วง 40-45 องศาเซลเซียส แต่จากการศึกษาของ Shie, *et al.* (1985) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* คือ 45 องศาเซลเซียส และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gorbacheve, *et al.* (1988) รายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* คือ 50 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 40-50 องศาเซลเซียส ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus niger* คือ 70 องศาเซลเซียส จึงใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลาเนสจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา

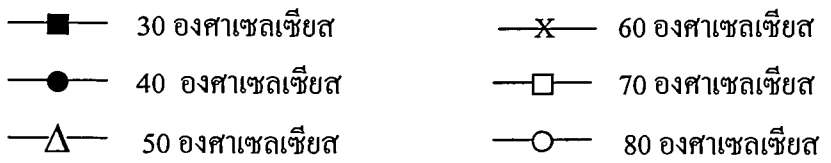
2.4 ผลของอุณหภูมิต่อค่าความคงตัวของเอนไซม์

เมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30, 60, 90 และ120 นาที ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวสูงในเวลา 60 นาที เอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 93.0 เมื่อบ่มนานขึ้นเป็น 120 นาที เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณร้อยละ 74.0 และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส บ่มนาน 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ประมาณร้อยละ 53.0 และลดลงเหลือประมาณร้อยละ 45.0 เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 นาที ขณะที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เอนไซม์มีกิจกรรมเหลือประมาณร้อยละ 32.0 และที่อุณหภูมิ 70 กับ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 30)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 30 ผลของอุณหภูมิต่อค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*



3. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน

3.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ขั้นแรกนำเอนไซม์ (crude enzyme) ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 158.49 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีน 245.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆ คือ ร้อยละ 40 , 40-45 , 45-50 , 50-55 , 55-60 และ 60-65 แยกตะกอนออกโดยการหมุนเหวี่ยง ละลายตะกอนที่ได้โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และปริมาณโปรตีนในแต่ละส่วน (ตารางที่ 19) จากผลการทดลองจะเห็นว่า เอนไซม์ไซลาเนสจะตกตะกอนได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 45-60 โดยเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสอยู่เล็กน้อย ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงร้อยละ 60-65 ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสตกตะกอนได้ดีที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 45-60

ดังนั้นจึงนำเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวที่ร้อยละ 45-60 แยกตะกอนโปรตีนออกโดยการหมุนเหวี่ยง ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ได้ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 283.92 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1.000 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน กิจกรรมรวมของเอนไซม์ 3407.04 ยูนิต และปริมาณโปรตีน 283.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความบริสุทธิ์เป็น 1.55 เท่า (ตารางที่ 20)

จากการศึกษาช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีรายงานว่า เอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus kawachii* มีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 60 (Ito, *et al.* 1992) ส่วนเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus ochraceus* (mutant) มีช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 30-60 (Biswas, *et al.* 1990) และเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus pullulans* Y-2311-1 มีช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 30-50 (Li, *et al.* 1993) จะเห็นว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 30-60 ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ ซึ่งพบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จาก *Aspergillus niger* มีช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 45-60 จึงอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลาเนสจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อัลตราฟิวเตรชัน

เมื่อกำจัดเกลือโดยการผ่านคอลัมน์และนำเอนไซม์มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการอัลตราฟิวเตรชัน ได้เอนไซม์มีปริมาตร 27 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 0.853 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.0033 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน กิจกรรมรวมของเอนไซม์ 214.956 ยูนิต ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 0.005 เท่า (ตารางที่ 20)

จากรายงานการศึกษาเมื่อนำเอนไซม์ไซลาเนสมาทำการอัลตราฟิวเตรชันแล้ว จะพบว่า มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสหลังจากการอัลตราฟิวเตรชันที่เพิ่มขึ้นจากก่อนการอัลตราฟิวเตรชัน แต่จากผลการทดลองพบว่า มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสหลังการอัลตราฟิวเตรชันที่ลดลง เป็นเช่นนี้เนื่องจากว่าเอนไซม์ไซลาเนสมีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ดังนั้นเอนไซม์ไซลาเนสที่มีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่า 10,000 ดาลตัน จึงสามารถหลุดออกไปได้ เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้หลังจากผ่านอัลตราฟิวเตรชันมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจึงพบว่ามีค่ากิจกรรมที่ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 19 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัวในช่วงต่างๆ ของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger*

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (U/ml)		Specific activity (U/mg)	
			CMCase	Xylanase	CMCase	Xylanase
Crude enzyme	290	245.50	0.215	158.49	0.0008	0.645
40%sat.$(NH_4)_2SO_4$	100	183.50	0.129	76.13	0.0007	0.419
40-45%sat.$(NH_4)_2SO_4$	100	162.33	0.131	133.60	0.0008	0.823
45-50%sat.$(NH_4)_2SO_4$	100	228.17	0.192	290.13	0.0008	1.272
50-55%sat.$(NH_4)_2SO_4$	100	258.67	0.181	269.73	0.0006	1.043
55-60%sat.$(NH_4)_2SO_4$	100	257.50	0.203	152.27	0.0007	0.591
60-65%sat.$(NH_4)_2SO_4$	100	228.33	0.168	8.53	0.0007	0.037

ตารางที่ 20 ผลการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไซลาเนส จากเชื้อ *Aspergillus niger*

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity(U/ml)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U)	Percent yield	Purification factor
Crude enzyme	290	245.50	158.49	0.645	45936	100	1.00
45-60%sat.$(NH_4)_2SO_4$ precipitate	12	283.89	283.92	1.000	3407.04	7.417	1.55
Ultrafiltration	27	252.0	0.853	0.0033	214.956	0.468	0.005

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. การเตรียมเอนไซม์

การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 5 วัน พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมจำเพาะของไซลาเนสเริ่มต้นเท่ากับ 0.645 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

2. คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* พบว่า พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส คือ พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอชที่มีผลต่อค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส คือ พีเอชช่วง 4.0-8.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยยังมีกิจกรรมที่เหลือประมาณร้อยละ 99.0 และมีความคงตัวที่ช่วงพีเอช 5.0-8.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยยังมีกิจกรรมที่เหลือประมาณร้อยละ 99.0 อุณหภูมิที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส คือ อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 นาที มีกิจกรรมเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 74.0

3. การทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน

เมื่อนำเอนไซม์ที่มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสเริ่มต้นเท่ากับ 0.645 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มาทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวที่ร้อยละ 45-60 จะได้ค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1.000 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 1.55 เท่า และนำเอนไซม์มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการอัลตราฟิวเตรชัน จะได้ค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.0033 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์ลดลงเป็น 0.005 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการแยกเอนไซม์ให้มีความบริสุทธิ์สูงควรคัดเลือกเจลและเรซินทั้งชนิดแอนไอออนเอ็กเชนเจอร์และแคทไอออนเอ็กเชนเจอร์ที่สามารถแยกเอนไซม์ออกจากกันได้ดี หรือควรผ่านคอลัมน์หลายๆ ครั้ง โดยใช้เจลและเรซินชนิดต่างๆ นอกจากนี้ในการแยกโดยใช้เรซิน การชะโปรตีนเอนไซม์ด้วยบัฟเฟอร์ การทำโซดียมคลอไรด์แกรเดียนท์อาจจะทำให้ได้พีค(peak)ของโปรตีนเอนไซม์ที่มีความชัดเจนขึ้น

2. เมื่อแยกได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ควรมีการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ ในการย่อยสลายสับสเตรตต่าง ๆ ซึ่งจะช่วยอธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์นั้น ๆ ได้ดียิ่งขึ้น

3. ในการทำเอนไซม์ให้เข้มข้นขึ้นโดยการอัลตราฟิวเตรชันควรเลือกขนาดของเมมเบรนให้เหมาะสมกับขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

พัชรา วีระกะลัส.2543.จลนศาสตร์ของปฏิกริยาเอนไซม์ที่มีสับสเตรตตัวเดียว.ใน เอนไซม์, 181-208 ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

เรวดี ปรีบัว. 2547. การแยกและการคัดเลือกเชื้อราจากดินในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมบัติ กิ่งเพ็ชรรุ่งเรือง และสมศักดิ์ เลิศทะนงศักดิ์.2537. การกำจัดทองแดงออกจากน้ำเสียโดยวิธี polyelectrolyte-enhanced ultrafiltration. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมรักษ์ พันธ์ผล. 2537. การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สุนีย์ โชตินีรนาท. 2539. การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์และอัลตราฟิวเตรชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อารี ฤทธิบูรณ์. 2547. การสกัด การแยก และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์. ใน เทคโนโลยีของเอนไซม์, 67-82.กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Anthony, T., Chandra, K. R., Rajendran, A. and Gunasekaran, P. 2003. High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. Enzyme. Microbiol. 32: 647-654.

Baraznenok, V.A., Becker, E.G., Ankudimova, N.V. and Okunev, N.N. 1999. Characterization of neutral xylanase from *Chaetomium cellulolyticum* and their biobleaching effect on Eucalyptus pulp. Enzyme Microb. Technol. 25, 651-659.

Biswas, S.R., Jana, S.C., Mishar, A.K. and Nanda, G. 1990. Production, purification, and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*. Biotechchnol. Bioeng. 35: 244-251.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protien utilizing the principle of protien dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Breccia, J.D., Sineriz, F., Baigori , M.D., Castro, G.R. and Hatti Kaul, R. 1998. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. Enzyme Microb. Technol. 22, 42-49.

Buchert, I., Tenkanen, M., Kantelinen, A. and Viikari, L. 1994. Application of xylanase in the pulp and paper industry. Biores. Technol. 50: 65-72.

Cesar, T. and Mrsa, V. 1996. Purification and properties of the xylanase produced by *Thermomyse lanuginosus*. Enzyme Microb. Technol. 19, 289-296.

Claudio, H. C. S., Jurgen, P., Marcelo, V. S. and Divaldo, X. F. F. 1999. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumicatus* Fresenius. Rev. Microbiol. 30 (2): 1-10.

David, J. H. and Hazel P. 1998. Analytical Biochemistry. Third edition. Longman. Singapore Publishers. (Pte) Ltd.

Dekker, R.F.H. 1985. Biodegradation of the hemicelluloses. *In*: T. Higuchi, Editor, Biosynthesis and biodegradation of wood components, Academic Press, Orlando, Florida, pp. 505-533.

Frederick, M. M., Kiang, C.H, Frederick, J.R. and Reilly, P.J. 1986. Purification and characterization of endoxylanase from *Aspergillus niger* I. two isozymes activity on xylan backbones near branch points. Biotechnol. Bioeng. 27: 252-532.

Ghareib, M. and Nour el Dein, M. M. 1992. Purification and general properties of xylanase from *Aspergillus terreus*. Zentralbl. Mikrobiol. 147: 569-576.

Ghosh, M. and Nanda, G. 1994. Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4620-463.

Gorbacheva, L. V. and Rodionova, N. A. 1977. Studies on xylan degrading enzymes I. Purification and charaterization of endo-1,4-β-xylanase from *Aspergillus niger* str. 14. Biochem. Biophys. Acta. 484: 79-93.

Grabski, A. and Jeffries, T.W. 1991. Production, purification and characterization of β-(1,4)-endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*. Appl. Environ. Microbiol. 57(4): 987-992

Haltrich, D., Laussamayer, B. and Steiner, W. 1994. Xylanase formation by *Sclerotium rolfsii* : Effect of growth substrates and development of a culture medium using statistically designed experiments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 522-530.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Haltrith, D., Nidetsky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W. and Zupancic, S. 1996. Production of fungal xylanases. Biores. Technol. 58: 137-161.

Hashimoto, S., Muramatsu, T. and Funatsu, M. 1971. Study on xylanase from *Trichoderma viride*. Part I: Isolation and some properties of crystalline xylanase. Agric Biol Chem. 35: 501-508.

Isao, K., Hiroyuki, S. and Shigeyuki, T. 1995. Purification and Characterization of Two Xylanases and an Arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. J. Ferment. Bioeng. 80 (4): 34-339.

Ito, K., Ogasawara, H., Sugimoto, T. and Ishikawa, T. 1992. Purification and properties of acid stable xylanase from *Aspergillus kawachii*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56(4): 547-550.

Kan, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S. Hong, S.I. and Kim, S.W. 2004. Production of cellulase by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulose biomass. Biores. technol. 91: 153-156.

Kolarova, N. and Farkas, V. 1983. Laminarinases, xylanases and amylases in the crude cellulolytic enzyme complex from *Trichoderma reseei*. Biologia (Bratislava). 38: 721-725.

Kormelink, F. J. M., Searle-van Leeuwen, M. J. F., Wood, T. M. and Voragen, A. G. J. 1993. The purification and characterization of three endo-1,4-β-xylanase and one β-xylosidase from *Aspergillus awamori*. J. Biotechnol. 27: 249-265.

Li, X.L.., Zhang, Z.Q., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L. and Ljungdahl, L.G. 1993. Purification and characterization of a new xylanase (APX-ll) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. Appl. Environ. Microbiol. 59(10): 3212-3218.

Linssen, V. A. J. M., Dusterhoft, E.-M., Voragen, A. G. J. and Beldman, G. 1997. Purification, characterization and properties of two xylanase from *Humicola insolens*. Enzyme and Microbiol. 20: 437-445.

Lowry, O.H., Roseebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Mandels, M. and Weber, J. 1969. The production ofcellulase, pp. 391-398. In R.E. Gould (eds.) Cellulase and Their Applications. Abvances in Chemistry Serology. Washington, D.C. : American Chemistry Society.

Masanobu, I., Shinkichi, T. and Seizen, T. 1997. Purification and Some Properties of a Thermostable Xylanase from Thermophilic Fungus Strain HG-1. J. Ferment Bioeng. 83(5): 478-480.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426-428.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Monti, R., Terenzi, H.F. and Jorge, J.A. 1991. Purification and properties of an extracellular xylanase from the thermophillic fungus Humicola grisea var. *thermoidea.* Can. J. Microbiol. 37,675-681

Orlando, A. V. C. and Edivaldo, X. F. F. 2003. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana.* FEMS Microbiol. Letts. 223: 309-314.

Panbangred, W., Shinmyo, A., Kinoshita, S. and Okada, H. 1983. Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*. Annual Reports of ICME. 6: 13-21.

Ricardo, F.A., Frederick, M.M., Frederick, J.R. and Reilly, P.J. 1985. Purification and characterization of endoxylanase from *Aspergillus niger*. III. An enzyme of PI 3.65. Biotechnol. Bioeng. 27: 539-546.

Roseli, G.M., Rogerio, H. and Edivaldo, X.F.F. 2003. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. International Biodeterioration & Biodegradation. 52, 97-100

Salles, B.C., Cunha, R.B, Fontes, W., Sousa, M.V. and Filho, E.X.F. 1999. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophara nainiana.* J. Biotechnol. 81, 199-204.

Scopes, R.K. 1978. Techniques for protein purification. *In* Techniques in the Sciences: Techniques and Enzymes. Biochemistry. (eds. Kornberg, H.L., Metcalfe, J.C., Northcote, D.H., Pogson, C.I. and Tipton, K.F.) pp. 1-42, Amsterdam: Elesevier/ North-Holland Biochemical Press.

Shei, J.C., Fratzke, A.R., Frederick, M.M., Frederick, J.R. and Reilly, P.J. 1985. Purification and characterization of endoxylanase fron *Aspergillus niger*. II. An enzyme of pl 4.5. Biotechnol. Bioeng. 27: 533-538.

Sunna, A. and Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. Crit. Rev. Biotechnol. 17: 39-67.

Stoll, V.S. and Blanchard, J.S. 1990. Buffer : principles and practice. *In* Method in Enzymology (ed. Deutscher, M.P.) Vol. 182, pp. 24-38, New York : Acedemic Press.

Tan, L.U.L., Wong, E.K.C. and Saddler, J.N. 1985. Purification and characterization of two D-xylanases from *Trichoderma harzianum*. Enzyme Microb Technol. 7: 425-430.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tang, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis-Seize, G.W. and Sanddler, J.W. 1987. Inexpensive, rapid procedure for bulk purification of cellolase-free beta, 1-4, D-xylanase for high specific activity. Biotechnol. Bioeng. 30: 96-406.

Ufuk, B., Sebnem, Y., Ferda, G. and Aysegul, E. 2001. An endo-β-1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. Enzyme. Microbiol. 29: 328-334.

Vichien, K., Mitsunori, H. and Shiro, N. 1984. Purification and Properties of Endo-1,4-Xylanase from *Humicola lanuginosa*. J. Ferment. Technol. 62(5): 415-420.

Viilkari, L., Tenkanen, M., Buchert, J. Ratto, M., Bailey, M., Siika-aho, M. and Linko, M. 1993. Hemicellulase for industrial appication, pp. 113-182. In J.N. Saddler and C.A.B. Wallingford. (eds.) Bioconversion of forest and agricultural plant residues. New York: International pubplic.

Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L. and Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of β-1,4-xylanases in microorganisms: functiom and applications. Microbiol. Revs. 52: 305-317.

www.gewater.com/library/tp/835_ultrafiltration_.jsphe par

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสาร

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar)

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

วิธีการเตรียม

มันฝรั่งหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปต้มในน้ำเดือด กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่ได้มาเติมน้ำตาลเดกซ์โทรสและผงวุ้น ต้มจนวุ้นละลายปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในหลอดขนาด 16x150 มิลลิลิตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที นำหลอดมาวางเอียงไว้ จนกระทั่งวุ้นแข็งตัวดี

2. การเตรียมซิเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer) ตามวิธีของ Lillie (1948 อ้างโดย Stoll and Blanchard,1990)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A : 0.1 M citric acid (21.01 กรัมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.1 M sodium citrate ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$ 29.41 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
46.5	3.5	3.0
43.7	6.3	3.2
40.0	10.0	3.4
37.0	13.0	3.6
35.0	15.0	3.8
33.0	17.0	4.0
31.5	18.5	4.2
28.0	22.0	4.4
25.5	24.5	4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

23.0	27.0	4.8
20.5	29.5	5.0
18.0	32.0	5.2
16.0	34.0	5.4
13.7	36.3	5.6
11.8	38.2	5.8
9.5	41.5	6.0
7.2	42.8	6.2

3. การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ตามวิธีของ Sorensen (1909) อ้างโดย Stoll and Blanchard (1990)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.2 M monobasic sodium phosphate (KH_2PO_4 27.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	46.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
13.0	87.0	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7.0	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตและร้อยละที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละอิ่มตัวที่ 0 องศาเซลเซียส)	ความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในสารละลาย 100 มิลลิลิตร)																	
	10	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	5.6	11.4	14.4	17.6	20.9	24.3	27.7	31.3	35.1	39.0	43.0	47.2	51.6	54.1	56.7	61.1	65.9	70.7
10		5.7	8.6	11.8	15.0	18.3	21.6	25.1	28.8	32.6	36.5	40.6	44.9	45.4	50.3	54.4	58.9	63.6
20			2.9	5.9	9.1	12.3	15.5	18.9	22.5	26.2	30.0	34.0	38.2	42.4	43.3	47.3	51.9	56.5
25				3.0	6.1	9.3	12.5	15.8	19.3	23.0	26.7	30.7	34.8	36.9	39.0	42.9	45.9	48.9
30					3.0	6.2	9.4	12.7	16.2	19.8	23.5	27.3	31.4	34.5	36.7	40.8	45.1	49.5
35						3.1	6.3	9.4	12.9	16.4	20.0	23.8	27.8	29.8	31.9	35.8	38.8	41.8
40							3.1	6.4	9.7	13.2	16.8	20.5	24.5	27.5	30.0	34.0	38.1	42.4
45								3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	21.0	23.1	25.0	29.2	32.3	35.2
50									3.3	6.6	10.1	13.7	17.6	20.4	23.3	27.2	31.2	35.3
55										3.3	6.7	10.3	13.7	17.1	20.5	23.9	27.3	30.7

60											3.4	6.9	10.5	13.5	16.6	20.4	24.2	28.3
65												3.2	6.6	10.3	13.7	17.1	20.5	23.9
70													3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	21.2
75														3.2	6.7	10.2	13.9	17.6
80															3.3	6.8	10.4	14.1
85																3.4	6.9	10.6
90																	3.4	7.1
95																		3.5
100																		0

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ภาคผนวก ข

1. การหาปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Lowry, *et al.* (1951)

สารเคมี

1. สารละลาย Na_2CO_3 ร้อยละ 2 ใน NaOH 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย $CuSO_4.5HO_2$ ร้อยละ 0.5 sodium potassium tartrate ร้อยละ 1.0
3. สารละลาย alkali copper เตรียมโดยผสมสารละลายในข้อ 1. 50 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ 2. 1 มิลลิลิตร (ควรเตรียมในวันที่ใช้)
4. สารละลาย Folin-ciocateus phenol reagent นำมาเจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ก่อนใช้

วิธีการ

1. ใส่สารตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย alkali copper 3.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. เติมสารละลาย Folin-ciocateus reagent 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

เตรียมโดยใช้ Bovine serum albumin ที่ระดับความเข้มข้น 25 , 50 , 100 , 150 , 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent ตามวิธีของ Miller (1959)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย

1. dinitrosalicylic (DNS) acid	ร้อยละ 1.0
2. phenol	ร้อยละ 0.2
3. sodium potassium tartrate (Rochelle salt)	ร้อยละ 20
4. Na_2SO_3	ร้อยละ 0.05
5. NaOH	ร้อยละ 1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียม DNS reagent

ละลาย NaOH ในน้ำตามปริมาตรที่ต้องการ แล้วจึงเติมสารละลายอื่นๆ ลงในสารละลาย NaOH

2.1 วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

2.1.1 เตรียม stock solution ของกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.2 ดูดสารละลายจากข้อ 2.1.1 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทน

2.1.3 เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร

2.1.4 นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบทำให้เย็น

2.1.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณกลูโคส

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

$$\text{ยูนิต/มิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของกลูโคส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

(กรัม/โมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

$$\text{ยูนิต/กรัม} = \frac{\text{ยูนิต/มิลลิลิตร} \times (\text{ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์}+\text{ปริมาตรที่เหลือจากการปรับความชื้น})}{\text{น้ำหนักซังข้าวโพดเริ่มต้น (กรัม)}}$$

2.2 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลสสำหรับวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับในข้อ 2.1 แต่ใช้สารละลายไซโลสแทนสารละลายกลูโคส นำข้อมูลเขียนกราฟมารตฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณไซโลส

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

$$\text{ยูนิต/มิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลไซโลส} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

(กรัม/โมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยูนิต/กรัม = ยูนิต/มิลลิลิตร × (ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์+ปริมาตรที่เหลือจากการปรับความชื้น)
น้ำหนักซังข้าวโพดเริ่มต้น (กรัม)

2.3 การคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของเอนไซม์

2.3.1 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity)

ยูนิต/มิลลิกรัม = ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)
ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

2.3.2 ค่ากิจกรรมรวมของเอนไซม์ (total activity)

ยูนิต = ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร) × กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)

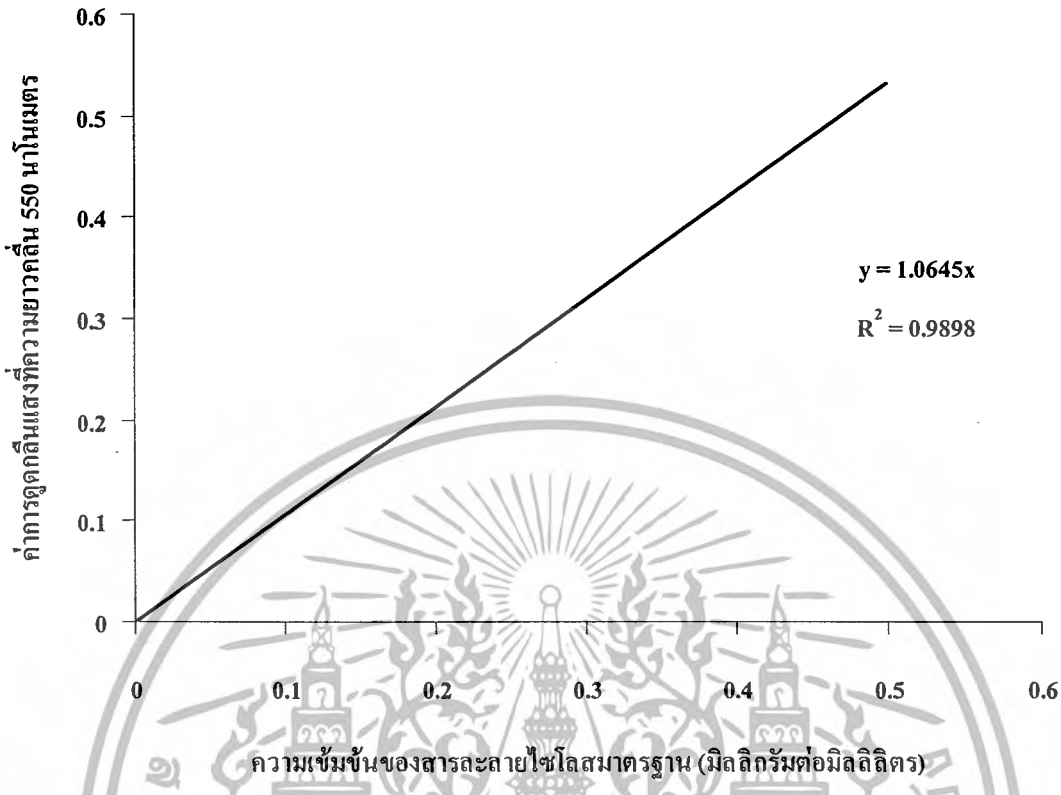
2.3.3 % Yield

% Yield = กิจกรรมรวมของเอนไซม์ × 100
กิจกรรมรวมของเอนไซม์เริ่มต้น

2.3.4 Purification factor

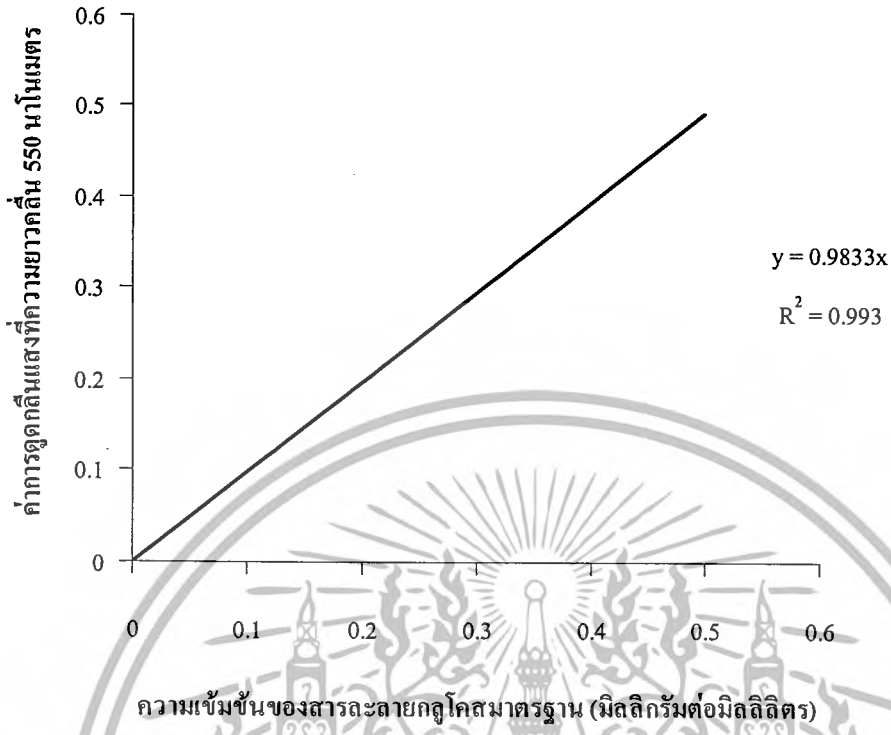
Purification factor = ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์
ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



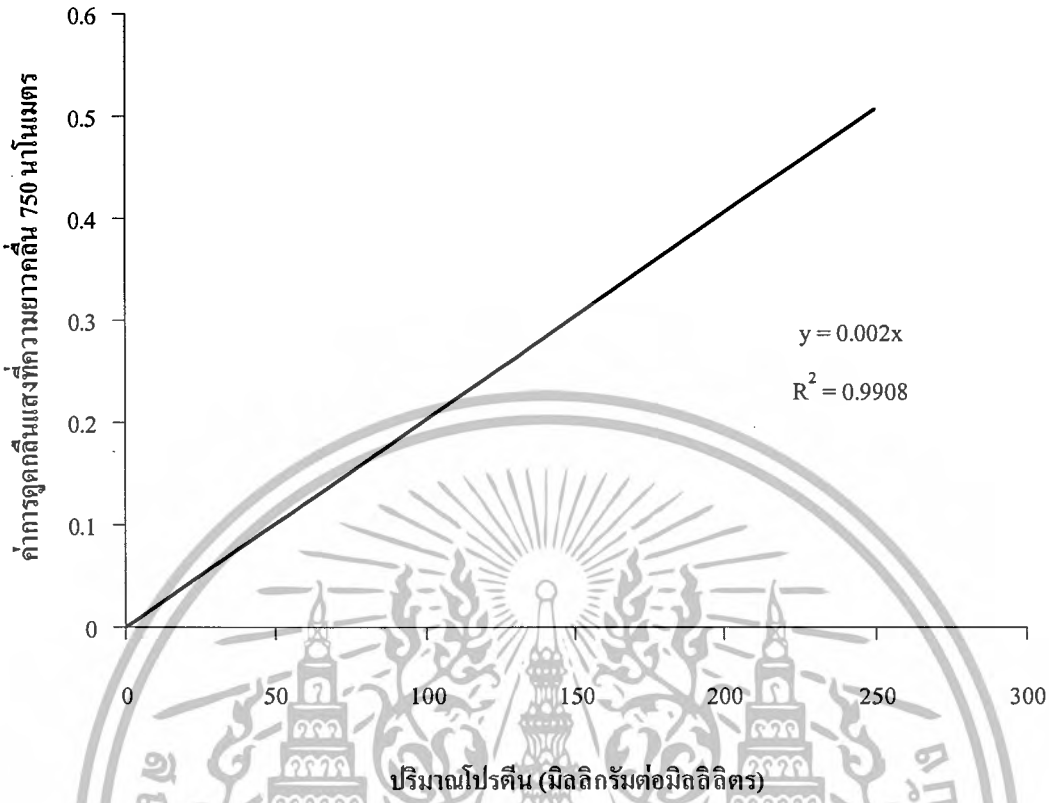
รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของไซโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้