

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลและกากน้ำตาลอันดับ 4 ของโลก ที่สามารถสร้างมูลค่าได้ปีละประมาณ 55,000 ล้านบาท (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล, 2551) อย่างไรก็ตาม ยังมีปัญหาขีดความสามารถในการแข่งขันต่ำ ได้แก่ การปลูกอ้อยมีต้นทุนสูง ในขณะที่ผลผลิตต่อไร่ต่ำ และปัญหาของผลผลิตน้ำตาลในโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น ซึ่งปัญหาสำคัญของผลผลิตน้ำตาลในโรงงานอุตสาหกรรมที่ทำให้ผลผลิตน้ำตาล (sucrose) ของโรงงานน้ำตาลลดลงที่สำคัญ เกิดจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อกระบวนการผลิตน้ำตาล เช่น ทำให้น้ำตาลซูโครสของอ้อยหายไปบางส่วนอันเกิดจากการใช้ของจุลินทรีย์ และจุลินทรีย์บางชนิดผลิตเมือก เดกซ์แทรน (dextran) ทำให้น้ำอ้อยข้นหนืด จับเกาะกับผิวของท่อส่งน้ำอ้อย เกิดการอุดตัน มีผลทำให้ลดประสิทธิภาพการทำใส (clarification) และการกรอง (filtration) ทำให้การระเหยของน้ำอ้อยในหม้อระเหยสุญญากาศช้า ยืดเวลาเคี้ยวน้ำตาล ทำให้น้ำตาลดิบที่ได้มีสีปนเปื้อนของโมลาส ทำให้ประสิทธิภาพโดยรวมในการผลิตน้ำตาลลดลง (ปรีชา, 2543) โรงงานต้องจ่ายเงินจำนวนมากเพื่อติดตั้งระบบน้ำร้อนเพื่อล้างระบบภายในโรงงาน หรือมีเงินก็ต้องเสียเงินเพื่อซื้อสารเคมี Biocide เพื่อใช้ทำความสะอาดระบบในโรงงานเป็นจำนวนมาก การกำจัดเดกซ์แทรนในกระบวนการผลิตน้ำตาลของโรงงานนิยมใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (dextranase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการสลายพันธะ  $\alpha$ -(1,6)-D-glucose ของเดกซ์แทรนพบว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากเชื้อรามีประสิทธิภาพสามารถลดเดกซ์แทรนและทำให้ผลผลิตน้ำตาลเพิ่มขึ้นได้ แต่เนื่องจากเอนไซม์มีราคาสูง คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ใช้เองภายในประเทศ โดยสามารถแยกเชื้อ *Aspergillus* sp.X26 ได้จากดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (extracellular dextranase) และสามารถทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยการใช้ Sephacryl S-300 จากโครงการวิจัยในหัวข้อ การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อราที่แยกได้ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 และการผลิตและทำเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อราที่แยกได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือในระดับขยายขนาด จากปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 ในงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยที่ต่อยอด เพื่อพัฒนา enzyme strip สำหรับใช้ตรวจสอบ dextran ที่ปนเปื้อนมากับน้ำอ้อยในอุตสาหกรรมน้ำตาล ซึ่งจะเป็วิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วและใช้ง่ายเมื่อเทียบกับวิธี Haze Method ที่โรงงานน้ำตาลใช้อยู่ ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยากและใช้เวลานานกว่า

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) ศึกษาการผลิต enzyme strip สำหรับตรวจสอบ dextran โดยใช้เอนไซม์ dextranase ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26
- 2) ศึกษาคุณสมบัติของ enzyme strip ในการวัดปริมาณ dextran และคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาการผลิต enzyme strip สำหรับตรวจสอบ dextran โดยใช้เอนไซม์ dextranase ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26 โดยทำการตรึงเอนไซม์ dextranase ด้วย Sephacryl S-300 และแผ่น nitrocellulose และศึกษาคุณสมบัติของ enzyme strip ในการตรวจสอบปริมาณ dextran และคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์

## 1.4 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เป็นวัตถุดิบหลักในอุตสาหกรรมน้ำตาล ประเทศไทยบริโภคน้ำตาลปีละ 1.6-1.7 ล้านตัน และมีการส่งออกมากกว่าปีละ 3 ล้านตัน ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลและกากน้ำตาลอันดับ 4 ของโลก ที่สามารถสร้างมูลค่าได้ปีละประมาณ 55,000 ล้านบาท (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล, 2551) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการปลูกอ้อยมากที่สุด คิดเป็น 43 เปอร์เซ็นต์ของทั้งประเทศ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2549)

ปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตน้ำตาลในกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาลคือการมี polysaccharide ซึ่ง polysaccharide ที่พบในน้ำอ้อยเกิดได้จาก 2 แหล่งใหญ่ คือ แป้ง(starch) ที่เกิดจากกิจกรรมการเจริญของพืชเอง และเดกซ์แทรน (dextran) จากกิจกรรมของจุลินทรีย์บางชนิด ซึ่งการปนเปื้อนจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มาจากวัตถุดิบอ้อยในกระบวนการผลิต (Bose และ Singh, 1981) เดกซ์แทรนมีลักษณะเป็นเมือก ทำให้น้ำอ้อยข้นหนืด จับเกาะกับผิวของท่อส่งน้ำอ้อย เกิดการอุดตัน มีผลทำให้ลดประสิทธิภาพการทำใส (clarification) และการกรอง (filtration) ทำให้การระเหยของน้ำอ้อยในหม้อระเหยสูญญากาศช้า ยืดเวลาเกี่ยวน้ำตาล ทำให้น้ำตาลดิบที่ได้มีสีปนเปื้อนของโมลาส ส่งผลให้ประสิทธิภาพโดยรวมในการผลิตน้ำตาลลดลง น้ำตาลดิบที่มี dextran ปนเปื้อนสูงกว่า 1,000 ppm จะมีผลไปเพิ่มความหนืดของ

น้ำอ้อย, น้ำเชื่อม (syrup), แมสคิวติ (massecuite), โมลาส (molasses) ทำให้ขัดขวางการทำไส การตกผลึกน้ำตาลซูโครส และการทำบริสุทธิ์น้ำตาลซูโครส (Meade และ Chen, 1997)

ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรนที่พบมากและก่อให้เกิดปัญหาในกระบวนการผลิตน้ำตาลได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Leuconostoc dextranicum* นอกจากนั้นยังพบจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ อีกเช่น *Aerobacter* sp., *Betabacterium dextranicum*, *Streptococcus* sp. จุลินทรีย์เหล่านี้พบได้ทั่วไปในไร่อ้อยหรือบริเวณที่มีน้ำอ้อย งานวิจัยของ Milintawisamai และคณะ (2009) ได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรนจากตัวอย่างน้ำอ้อยของโรงงานน้ำตาลมิตรภูเวียง อำเภอนองเรือ จังหวัดขอนแก่น พบว่าเป็น *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* และ *Lactobacillus fermentum*

Imrie และ Tilbury (1972) พบว่าอ้อยที่เผาไฟจะเกิดเดกซ์แทรนได้มากกว่าอ้อยสด เนื่องจากอ้อยไหม้ไฟมีโอกาสติดเชื้อง่ายโดยเฉพาะเชื้อ *L. mesenteroides* อันเนื่องมาจากบาดแผลที่เกิดขึ้น และเอนไซม์ในระบบป้องกันเชื้อโรคถูกทำลาย นอกจากนั้นความล่าช้าในการเก็บเกี่ยว การขนส่ง การเข้าคิวเพื่อขนถ่ายอ้อยเข้าส่งโรงงาน ก็เป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อยีสต์เจริญทำให้เกิดการสร้างเดกซ์แทรนด้วยเช่นกัน

เดกซ์แทรน (Dextran) มีโครงสร้างเป็น homopolysaccharide ของกลูโคส ซึ่งกลูโคสแต่ละโมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -(1,6)-glycosidic linkage (ประมาณ 90-95%) และมีแขนงย่อยเชื่อมต่อดด้วยพันธะ  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3) หรือ  $\alpha$ -(1,4)-glycosidic linkage (ประมาณ 5-10%) (Brown และ Inkerman, 1992) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรน โดยทั่วไปพบว่าจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากประมาณ  $10^6$ - $10^7$  ดาลตัน ทำให้ dextran มีคุณสมบัติเหนียวและมีความหนืดสูง ไม่ละลายในแอลกอฮอล์แต่สามารถละลายน้ำได้ดี จึงยากต่อการกำจัดออกจากกระบวนการผลิต

การกำจัดและการลดปริมาณเดกซ์แทรน Chen และ Rauh (1990) เสนอให้จัดระบบสุขาภิบาลหรือการทำความสะอาดที่ดีและใช้ biocide พบว่าจะช่วยควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดเดกซ์แทรนได้ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบก็ยังเป็นปัญหาต่อกระบวนการผลิตน้ำตาลอยู่

Imrie และ Tilbury (1972) พบว่าการใช้เอนไซม์ dextranase เพียง 3% สามารถกำจัด dextran ได้ถึง 68.5% ในเวลาเพียง 20 นาที ที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

การกำจัด dextran ในโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาลนิยมใช้เอนไซม์ dextranase ซึ่งจะได้ผลดีเมื่อเติม dextranase ลงในน้ำอ้อยทันทีหลังจากการหีบสกัด ทำให้ปัญหาความหนืดหมดไป ส่งผลดีต่อกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย ทำให้ลดการอุดตันและใช้พลังงานลดลง (Meade และ Chen, 1997)

จากบทความของ ปรีชา (2541) การใส่ dextranase ลงไปในน้ำอ้อยและน้ำเชื่อมที่กำลังเถียวให้ตกผลึก โดยของเหลวทั้งคู่ต้องมี pH อยู่ที่ 5-8 ทำให้ dextran ลดขนาดลง แต่การใช้เอนไซม์นี้มิได้ทำให้ dextran หดไป เพียงแต่ทำให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งยังคงทำให้การวิเคราะห์น้ำตาลซูโครส ผิดพลาดและความเหนียวข้นของน้ำอ้อยและน้ำเชื่อมยังคงมีอยู่

การกำจัดเดกซ์แทรนในโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาลนิยมใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ซึ่งจะได้ผลดีเมื่อเติมเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสลงในน้ำอ้อยทันทีหลังจากการหีบสกัด ทำให้ปัญหาความหนืดหมดไป ส่งผลดีต่อกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายทำให้ลดการการอุดตันและใช้พลังงานลดลง (Khalikova และคณะ, 2005) Eggleston และ Monge (2005) ศึกษาการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเกรดการค้า (commercial grade) ที่ผลิตจากเชื้อรา *Chaetomium gracile* และ *C. erraticum* ทั้งชนิดที่ทำให้เข้มข้นและไม่ได้ทำให้เข้มข้นในโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาล พบว่าที่ pH 5.4-5.8 เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่ 50°C โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงที่ความหวานของน้ำตาลเป็น 25-30°Brix และพบว่าการใส่เอนไซม์ในน้ำอ้อยช่วงหีบสกัดจะให้ผลดีกว่าการใส่เอนไซม์ในไซรัป (syrup) และพบว่าการใส่เอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้เข้มข้นในช่วงระเหยไซรัป (evaporator syrup) นั้นเป็นการสิ้นเปลืองเอนไซม์ อย่างไรก็ตามในกรณีที่ใช้ไซรัป มีปัญหามากในเรื่องเดกซ์แทรนก็สามารถใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสชนิดเข้มข้นที่ความเข้มข้น 10 ppm/solid (เทียบเท่ากับ 45 ppm/juice) ซึ่งสามารถกำจัดเดกซ์แทรนได้ประมาณ 37 เปอร์เซ็นต์ การใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสกับน้ำอ้อยที่มีอุณหภูมิ 50°C นอกจากจะเป็นการประหยัดเอนไซม์แล้วยังสามารถกำจัดเดกซ์แทรนได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 32°C ด้วย โดยพบว่าการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสชนิดไม่เข้มข้นในปริมาณ 10 ppm/solid เป็นเวลานาน 10 นาที ที่ 50°C สามารถกำจัดเดกซ์แทรนได้ประมาณ 46.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อุณหภูมิ 32°C จะกำจัดเดกซ์แทรนได้เพียง 13.6 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ในน้ำอ้อยที่มีสาร dithiocarbamate ซึ่งเป็นสาร biocide ที่มักใส่ลงไปในน้ำอ้อย โดยพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของเดกซ์แทรนที่อุณหภูมิ 50°C ด้วย

งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีผู้ศึกษาการทำบริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสทั้งในเชื้อราและแบคทีเรียหลายชนิด ตัวอย่างการศึกษาในเชื้อราได้แก่ Dipak และคณะ (1996) ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์ extracellular endo-dextranase จากเชื้อ *Penicillium lilacinum* โดยใช้วิธี calcium phosphate gel chromatography ได้เอนไซม์ที่มี specific activity 3893.10 U/mg มีมวลโมเลกุลประมาณ  $26,500 \pm 1,500$  Da ค่า Km เป็น 0.06  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งถือว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อเดกซ์แทรนสูง

วิธีการตรวจวิเคราะห์ dextran นั้น Rauh และคณะ (website1) รายงานว่ามีวิธีการวิเคราะห์ dextran อยู่หลายวิธี แต่ละวิธีมีความเร็วรวดเร็วและแม่นยำแตกต่างกันไป ได้แก่ Haze Method, Robert

Method, Gel permeation chromatography และการใช้ Antibody ซึ่งเป็นวิธีใหม่แต่ยังไม่แพร่หลาย วิธี Haze Method (Keniry และคณะ, 1969) และ Roberts Method (Roberts, 1983) เป็นวิธีมาตรฐานที่อุตสาหกรรมน้ำตาลใช้อยู่ประจำ เป็นการวัดการตกตะกอนของ dextran เมื่อละลายในแอลกอฮอล์ แต่ 2 วิธีนี้ไม่มีความจำเพาะ มีราคาที่สูง และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน (Kubik และคณะ, 1994; De Stefano and Irey, 1986; Curtin และ Cowage, 1986 และ Brown และ Inkerman, 1992)

Singleton และคณะ (2002) เสนอวิธีการวิเคราะห์ dextran และ sucrose วิธีใหม่ที่รวดเร็ว โดยใช้ Near Infrared Polarimeter (NIR) ร่วมกับการใช้เอนไซม์ dextranase ใช้เวลาวิเคราะห์ประมาณ 10 นาที และพบว่าสามารถวัดได้ทั้งในน้ำอ้อยและตัวอย่างน้ำตาล

เกษตรกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือบางส่วนยังมีการเก็บเกี่ยวโดยวิธีการเผาอ้อยอยู่ ซึ่งทำให้มีปัญหาเศษแทรนปนเปื้อนสูงในวัตถุดิบอ้อย โดยเฉพาะในฤดูหีบอ้อย การกำจัด dextran ในกระบวนการผลิตน้ำตาลในโรงงานอุตสาหกรรมกระทำได้ยาก เนื่องจาก dextran ละลายน้ำได้ดีมาก ในอุตสาหกรรมน้ำตาลนิยมใช้เอนไซม์ dextranase ในการย่อย dextran ดังนั้นการวางแผนการใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิตน้ำตาล จึงควรเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและคุ้มค่า ซึ่งในฤดูหีบหนึ่งๆ จะมีการตรวจพบ dextran สูงเป็นช่วงๆ และแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ พบมากในฤดูหีบที่มีอ้อยไฟไหม้ ดังนั้นวิธีการตรวจสอบ dextran ในวัตถุดิบด้วยวิธีการที่รวดเร็วจึงน่าจะมีความจำเป็นในการประเมินวัตถุดิบและผลกระทบต่อผลผลิตน้ำตาล และถ้าต้องการใช้ dextranase เพื่อกำจัด dextran จะต้องใช้ปริมาณเท่าใด ดังนั้นวิธีการตรวจวัดที่รวดเร็วจึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการวางแผนการควบคุม เพื่อควบคุมผลผลิตน้ำตาลทรายให้ได้ปริมาณสูงสุด ในปัจจุบันโรงงานน้ำตาลมิตรผลยังคงประสบปัญหาการปนเปื้อน dextran ในกระบวนการหีบอ้อย (milling process) อยู่ มีผลทำให้มีการสูญเสียปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำตาลทรายดิบ และมีผลกระทบต่อเนื่องไปถึงการผลิตน้ำตาลทรายขาว (refined sugar) และในการวิเคราะห์ปริมาณ dextran ในตัวอย่างน้ำอ้อยเป็นวิธีที่ซ้ำใช้เวลาหลายชั่วโมงต่อตัวอย่าง

นอกจากนั้น dextran ที่ปะปนอยู่ในน้ำอ้อยยังทำให้การวัดน้ำตาลในน้ำอ้อยโดยการใช้ Polarimeter ได้ค่าที่สูงกว่าปกติ ทั้งนี้เนื่องจาก dextran มีคุณสมบัติหมุนระนาบแสงได้มากกว่าน้ำตาลซูโครสถึง 3 เท่า ทำให้ค่าโพลาไรซ์ที่วัดได้ผิดไป (Clark และคณะ, 1997) ในกรณีประเทศไทยที่ยังมีเกษตรกรเผาอ้อย ทำให้อ้อยมีโอกาสดูดซับที่ผลิตเมือก (dextran) ได้ง่าย เนื่องจากปากแผลที่เกิดขึ้น ทำให้วัดค่า Pol และ CCS ได้สูงกว่าปกติ จึงอาจทำให้ไม่เกิดความเป็นธรรมในการซื้อขายตามมาตรฐาน

คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ใช้เองภายในประเทศ โดยสามารถแยกเชื้อ *Aspergillus* sp.X26 ได้จากดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงใน

การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (extracellular dextranase ) และสามารถทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยใช้ Sephacryl S-300 จากโครงการวิจัยในหัวข้อ การทำให้ บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อราที่แยกได้ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 และการผลิตและทำเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อราที่แยกได้จาก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือในระดับขยายขนาด จากปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 ในงานวิจัยนี้จึงเป็น งานวิจัยที่ต่อยอด เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดที่รวดเร็ว คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการวัดปริมาณ dextran โดยปรับใช้วิธีของ Singleton และคณะ (2002) ที่ใช้ Near Infrared Polarimeter (NIR) ร่วมกับการใช้เอนไซม์ dextranase โดยได้รับทุนจากบริษัทมิตรผลวิจัยและพัฒนาอ้อยจำกัด พบว่า วิธีนี้ก็สามารถใช้วัดปริมาณ dextran ในน้ำอ้อยได้ หากแต่เอนไซม์ที่ซื้อมามีราคาแพง และยัง ต้องการเครื่องมือ Near Infrared Polarimeter ซึ่งมีราคาแพง ไม่มีอยู่ตามโรงงาน คณะผู้วิจัยจึงได้ พัฒนา enzyme strip สำหรับใช้ตรวจสอบ dextran ที่ปนเปื้อนมากับน้ำอ้อยในอุตสาหกรรมน้ำตาล ซึ่งน่าจะเป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็ว และใช้ง่ายเมื่อเทียบกับวิธี Haze Method ตามที่โรงงาน น้ำตาลใช้อยู่ปัจจุบัน ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยากและใช้เวลานานกว่า

## บทที่ 2

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 2.1 แผนและทิศทางการดำเนินการวิจัย

- 2.1 การผลิตเอนไซม์และการทำบริสุทธิ์บางส่วน dextranase จาก *Aspergillus* sp. X26
- 2.2 การศึกษาการตรึงเอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26 และการศึกษาคุณสมบัติ immobilized sephacryl S-300 dextranase complex
- 2.3 การศึกษาการตรึงเอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26 บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธี Air Dry
- 2.4 การศึกษาการตรึงเอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Penicillium* sp. บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธีเคลื่อนย้าย จาก SDS-PAGE ด้วยกระแสไฟฟ้า

#### 2.2 เชื้อจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

เชื้อจุลินทรีย์คือเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26 ซึ่งแยกได้จากดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยผู้ร่วมวิจัย คือ ผศ.สุวรรณา เนียมสนธิ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ Fukumoto medium (2% Dextran T 2000, 0.3%  $\text{NaNO}_3$ , 0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1% Yeast extract, 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05% KCl, 0.001%  $\text{FeSO}_4$ ) (Fukumoto และคณะ, 1971)

สารเคมีที่ใช้เป็น analytical grade ยกเว้น Ammonium sulphate เป็น commercial grade dextranase standard จาก เชื้อรา *Penicillium* sp. (Sigma, D5884) และ standard protein marker คือ ( $\alpha$ -Lactalbumin, Trypsin inhibitor, Carbonic anhydrase, Ovalbumin, Albumin, Phosphorylase b)

#### 2.3 การผลิตเอนไซม์ dextranase จาก *Aspergillus* sp. X26

เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. X26 ในอาหาร Fukumoto stant บ่มที่อุณหภูมิ  $30^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 4-5 วัน จากนั้นทำ spore suspension โดยใช้น้ำกลั่นที่มี 0.1% Tween 80 นับสปอร์เชื้อราด้วย Haemocytometer แล้วใส่เชื้อให้มีปริมาณ  $10^6$  สปอร์/ml ในอาหาร Fukumoto ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มให้เชื้อเจริญด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 125 rpm ที่อุณหภูมิ  $30^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 9 วัน เมื่อสิ้นสุดการบ่มเขย่า นำสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 g เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนสารละลายอาหารคือ crude enzyme

## 2.4 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ dextranase

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ dextranase ทำโดยผสมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.1 ml สารละลายสับสเตรท 0.625% w/v dextran T2000 ปริมาตร 0.5 ml และ 0.05M citrate buffer pH 5.5 ปริมาตร 0.4 ml บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson วัดสีที่เกิดขึ้นด้วย Spectrophotometer ที่ A500 nm โดยใช้ reaction mixture : Somogyi-Nelson reagents = 1:2 โดยปริมาตร ใช้สารละลายกลูโคส 0-100  $\mu\text{g/ml}$  เป็นสารมาตรฐาน โดยกำหนดให้ 1 หน่วย ของเอนไซม์ คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose) 1  $\mu\text{mol}$  ใน 1 หน่วยเวลา (Wynter, 1997)

## 2.5 การวัดปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนใช้วิธีของ Lowry โดยใช้สารละลายโปรตีน BSA ความเข้มข้น 0 – 250  $\mu\text{g/ml}$  เป็นสารมาตรฐาน

## 2.6 การทำบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ dextranase ด้วย Sephacryl S-300

นำ crude enzyme 25 ml ผสมกับ Sephacryl S-300 25 g (น้ำหนักเปียก) เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 12,000g เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นสารละลาย ออกจากนั้น ล้างเอาโปรตีนอื่นออกจาก Sephacryl S-300 dextranase complex ด้วย 0.05 M citrate buffer, pH 5.0 ปริมาตร 20 ml เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 g, 5 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งไป จากนั้นนำ Sephacryl S-300 dextranase complex มาแยกเอา dextranase ออกด้วย 2% dextran T10 ปริมาตร 25 ml เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นแยกที่ 12,000 g, 5 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลายซึ่งมีเอนไซม์ dextranase

การแยกเอนไซม์ dextranase ออกจาก dextran T10 ทำโดยการใส่ centicon ที่มีเมมเบรนขนาด molecular weight cut off 50 kDa ซึ่ง dextran T10 มีขนาดเล็กเพียง 10 kDa จึงสามารถผ่านเมมเบรนได้ แต่เอนไซม์ dextranase มีขนาด MW 86-87 kDa (Milintawisamai et al, 2011) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเมมเบรน จึงไม่สามารถผ่านตัวกรองได้ ทำให้สามารถแยก dextran T10 ออกจากเอนไซม์ dextranase ได้

## 2.7 การศึกษาการผลิต enzyme strips แบบต่างๆ

### 2.7.1 Sephacryl S-300 dextranase complex

ได้ทำการศึกษาการเตรียม sephacryl S-300 dextranase complex เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณ dextran โดยใช้เอนไซม์ dextranase ที่ถูกตรึงอยู่บน sephacryl S-300 ซึ่งจะทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณ dextran โดยทำการเตรียม sephacryl S-300 dextranase complex จากสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อและศึกษาคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของ enzyme strips และการตรวจสอบปริมาณ dextran standard

#### 2.7.1.1 วิธีการเตรียม sephacryl S-300 dextranase complex

นำ crude enzyme 25 ml ผสมกับ Sephacryl S-300 25 g (น้ำหนักเปียก) ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดเจล เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 12,000g เป็นเวลา 5 นาที แยกเก็บส่วนที่เป็นเม็ดเจล จากนั้นล้างเอาโปรตีนอื่นออกจาก Sephacryl S-300 dextranase complex โดยใช้ 0.05 M citrate buffer, pH 5.0 ปริมาตร 20 ml เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไปปั่นแยกที่ 12,000 g, 5 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งไป ส่วนที่เหลือจะเป็นเจลของ Sephacryl S-300 dextranase complex ซึ่งจะถูกนำศึกษาสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ต่อไป

#### 2.7.1.2 การวัดความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

การศึกษาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา โดยผสม sephacryl S-300 dextranase complex ซึ่งมีลักษณะเป็นเจลปริมาตร 0.1 ml สารตั้งต้น 0.625% w/v dextran T2000 ปริมาตร 0.5 ml และ 0.05M citrate buffer pH 5.5 ปริมาตร 0.4 ml บ่มที่อุณหภูมิ 40°C แปรผันเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในช่วง 0 - 30 นาที จากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson ใช้สารละลายกลูโคส 0-100 ug/ml เป็นสารมาตรฐาน

#### 2.7.1.3 การศึกษาจลนพลศาสตร์ ( $K_m$ , $V_{max}$ )

การศึกษาจลนพลศาสตร์ของ sephacryl S-300 dextranase complex โดยการแปรผันความเข้มข้น dextran ซึ่งเป็นสับสเตรท ในช่วง 0-10,000 ppm เมื่อนำข้อมูลระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยาและความเข้มข้นของ substrate มาเขียนเป็นกราฟในรูปแบบของ Lineweaver-Burk Plot จะทำให้สามารถคำนวณหาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ได้

#### 2.7.1.4 การวัดปริมาณ dextran standard

ทำการวัดปริมาณ dextran standard ด้วย immobilized sephacryl S-300 dextranase complex ปริมาตร 0.1 ml 0.05M citrate buffer pH 5.5 ปริมาตร 0.4 ml และ dextran T2000 0.5 ml โดยแปรผันความเข้มข้น dextran ซึ่งเป็นสับสเตรท ในช่วง 0-10,000 ppm บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็น

เวลา 10 นาที จากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson ใช้สารละลาย กลูโคส 0-100 ug/ml เป็นสารมาตรฐาน

## 2.7.2 การตรึงเอนไซม์บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธี Air Dry

### 2.7.2.1 การเตรียมตรึงเอนไซม์บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธี Air Dry

การเตรียมตรึงเอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26 บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธีหดยดสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้น 0.1 U/ml ลงบนแผ่น nitrocellulose จากนั้นทำให้แห้ง โดยวิธี air dry ใน vacuum desiccator ที่อุณหภูมิ 30°C จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose ที่เคลือบด้วย เอนไซม์ dextranase ตัดแบ่งเป็น strip ให้มีขนาด 3 x 50 mm

### 2.7.2.2 วิธีการวัดปริมาณ dextran ด้วย enzyme strip

วัดปริมาณ dextran ด้วย enzyme strip ด้วยการทำปฏิกิริยากับ dextran โดยหดยดสารละลาย dextran T-2000 เข้มข้น 6000 ppm ปริมาตร 5 ul บนแผ่น nitrocellulose บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็น เวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS และ Somogyi-Nelson

## 2.7.3 การศึกษาการตรึงเอนไซม์บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธีเคลื่อนย้ายโปรตีนจาก SDS- PAGE ด้วยกระแสไฟฟ้า

### 2.7.3.1 การเตรียมตรึงเอนไซม์บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธีย้ายโปรตีนจาก SDS- PAGE

การศึกษาการตรึงเอนไซม์บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธีเคลื่อนย้ายจาก SDS-PAGE ลงสู่ แผ่น nitrocellulose โดยโหลดตัวอย่างสารละลาย จากเชื้อ เอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Penicilium* sp.(Sigma) ปริมาณ 3.76 ug (0.4 Unit) /well ทำการแยกแถบโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า 20 mA จากนั้นล้างเจลใน 1% (w/v) triton X 100 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้ายเจลไปยังแผ่น nitrocellulose โดยใช้กระแสไฟฟ้า 15V เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose ตัดแบ่งเป็น strip ให้มีขนาด 3 x 50 mm

### 2.7.3.2 วิธีการวัดปริมาณ dextran ด้วย enzyme strip

นำ enzyme strip มาตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ โดยแช่แผ่น nitrocellulose ที่มีเอนไซม์เกาะ อยู่ในสารละลายที่มี dextran T2000 ใน 0.05M citrate buffer เข้มข้น 0, 500, 1000, 2000 และ 6000 ppm บ่มที่ 40°C 45 นาที จากนั้นนำส่วนสารละลายมาวัดผลิตภัณฑ์คือน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Somogyi-Nelson

## 2.8 วิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยชุดตรวจสอบ

การทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ dextranase กับสับสเตรทคือ dextran ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งอาจจะเป็น oligosaccharide, disaccharide หรือ monosaccharide และปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้มีสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ dextran ดังนั้นการหาวิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ง่าย และรวดเร็วจึงเป็นประโยชน์อย่างมากที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากย่อยสลาย dextran ของเอนไซม์ dextranase ในขั้นตอนการทำ enzyme strip เพื่อตรวจปริมาณ dextran

### 2.8.1 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย glucose strip ร่วมกับ glucometer

หลักการของการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย glucose strip ร่วมกับ glucometer คือเอนไซม์ glucose dehydrogenase จะเปลี่ยนกลูโคสให้เป็น gluconolactone ปฏิกิริยานี้จะปล่อยอิเล็กตรอนออกมาทำปฏิกิริยากับ coenzyme electron acceptor ทำให้เกิดเป็นรูปรีดิวซ์ของสาร Hexacyanoferrate (III) แถบตรวจใช้หลักการปฏิกิริยาอิเล็กตรอนของ Biamperometry ตัวเครื่องนำพลังงานระหว่างขั้วไฟฟ้าที่เหมือนกัน 2 ขั้ว ไปเปลี่ยนรูปรีดิวซ์ของสาร Hexacyanoferrate (III) ให้กลับคืนเป็นรูปออกซิไดซ์อีกครั้ง ซึ่งจะทำให้เกิดกระแสแรงต่ำที่เครื่องใช้อ่านผล และเครื่องจะวัดการเปลี่ยนแปลงกระแสอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้น เปลี่ยนสัญญาณที่ได้รับเป็นน้ำตาลบนจอ

ขั้นตอนการทดลอง ผสมสารละลายเอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26 ที่แยกบริสุทธิ์โดย sephacryl S-300 และ centricon ตามวิธีการในข้อ 4 จำนวน 0.1 U, 0.05M citrate buffer pH 5.5 และ dextran T2000 ให้มีความเข้มข้นของ dextran ซึ่งเป็นสับสเตรท 600, 2400 และ 4200 ppm ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นต้มหยุดปฏิกิริยาและวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้ glucose strip ร่วมกับ glucometer

### 2.8.2 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย Color reagent

หลักการของการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย Color reagent คือกลูโคสจะถูกเอนไซม์ glucose oxidase ออกซิไดซ์ให้เป็น gluconic acid และ hydrogen peroxide ซึ่ง hydrogen peroxide นี้จะส่งผ่านออกซิเจนให้แก่สารประกอบ amino-4-antipyrine โดยการเร่งเอนไซม์ peroxidase ได้ phenazone ที่มีสีแดง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

ขั้นตอนการทดลอง ผสมสารละลายเอนไซม์ dextranase ที่แยกบริสุทธิ์โดย sephacryl S-300 และ centricon ตามวิธีการในข้อ 4 จำนวน 0.1 U, 0.05M citrate buffer pH 5.5 และ dextran T2000 ให้มีความเข้มข้นของ dextran ซึ่งเป็นสับสเตรท 600, 2400 และ 4200 ppm ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นต้มหยุดปฏิกิริยาและวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดย

ใช้ Color reagent โดยใส่ reaction mixture 10 ul แล้วใส่ Color reagent 2 ml ปั่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A515

### บทที่ 3

#### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

##### 3.1 การผลิตและ การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ dextranase จาก *Aspergillus* sp. X26

ทำการผลิตเอนไซม์ dextranase โดยเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. X26 ในอาหาร Fukumoto ปริมาตร 50 ml ในฟลาส ขนาด 250 ml ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 9 วัน จากนั้นนำสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยง ที่ 15,000 g เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกเซลล์ของเชื้อออก ส่วนสารละลายอาหารที่ได้คือ crude enzyme ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์ทั้งหมด 78.23 U จากนั้นนำมาทำบริสุทธิ์โดยใช้ Sephacryl S-300 พบว่าได้ yield 29.53% เหลือปริมาณเอนไซม์ 23.10 U และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการแยก dextran T10 ซึ่งใช้เป็นตัวชะออกโดยการ centricon เมมเบรนขนาด molecular weight cut off 50 kDa พบว่าได้ yield 13.73% ดังแสดงในตารางที่ 1 ตารางที่ 1 แสดงผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26

| Purification step | Total protein (mg) | Total unit activity(U) | Specific activity (U/mg ) | Purification (-fold) | Yield(%) |
|-------------------|--------------------|------------------------|---------------------------|----------------------|----------|
| Crude             | 11.83              | 78.23                  | 6.62                      | 1                    | 100      |
| Sephacryl S-300   | 2.60               | 23.10                  | 8.87                      | 1.3                  | 29.53    |
| Centricon         | 1.01               | 10.74                  | 10.63                     | 1.6                  | 13.73    |

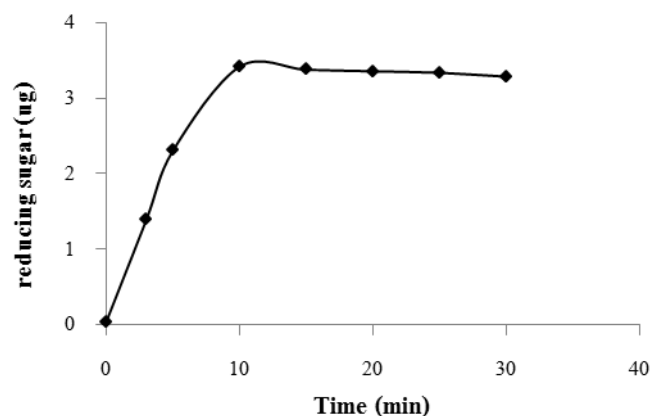
##### 3.2 การศึกษาคุณสมบัติ immobilized sephacryl S-300 dextranase complex

จากการศึกษาการตรึงเอนไซม์ dextranase ที่จับ sephacryl S-300 เป็น immobilized sephacryl S-300 dextranase complex เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณ dextran ในสารละลายผลการทดลองพบว่า สามารถผลิต immobilize sephacryl S-300 dextranase complex ได้โดยนำ crude enzyme ผสมกับ Sephacryl S-300 สัดส่วน 1:1 โดยปริมาตร เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 12,000g เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นสารละลายออก จากนั้นล้างเอาโปรตีนอื่นออกจาก Sephacryl S-300 dextranase complex โดยการใช้ 0.05 M citrate buffer, pH 5.0 เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไปปั่นแยกที่ 12,000 g, 5 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งไป ส่วนที่เหลือจะเป็น immobilized Sephacryl S-300 dextranase complex พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ 0.02 U/ml แล้วได้ทำการศึกษาสมบัติทางจลนพลศาสตร์ พบว่า

###### 3.2.1 ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

จากการศึกษาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา พบว่า immobilized Sephacryl S-300 dextranase complex 0.002 U/reaction วัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยวิธี Somogyi-Nelson โดยใช้ reaction mixture 0.5 ml และ Somogyi-Nelson reagents ปริมาตร 1 ml วัดที่ A500 nm พบว่ามีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเป็น

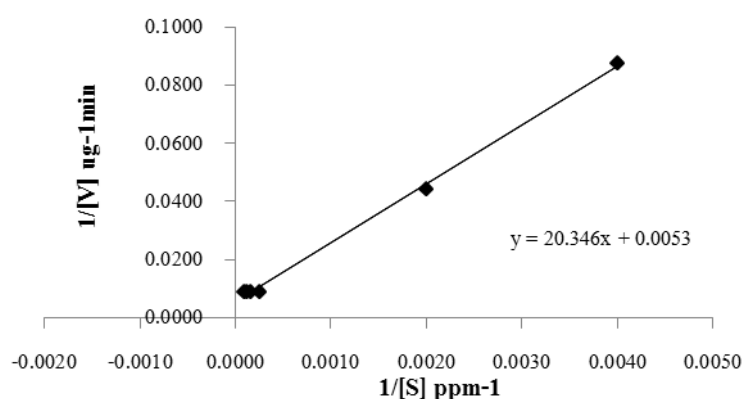
เส้นตรงที่เวลา 0- 10 นาที และมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดที่เวลา 10 นาที อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะมีค่าคงที่ ที่เวลา 10 – 30 นาที ดังแสดงรูปที่ 1



**รูปที่ 1** แสดงอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาที่เวลา 0-30 นาที ของ immobilized sephacryl S-300 dextranase complex จากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26

### 3.2.2 การศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ ( $K_m$ , $V_{max}$ )

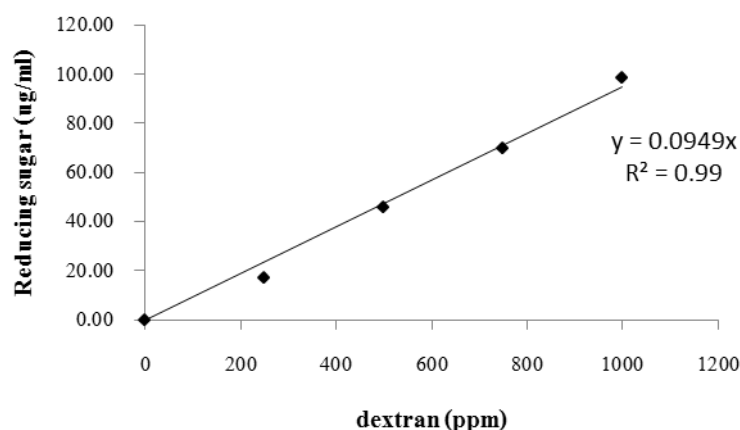
จากการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของ immobilized sephacryl S-300 dextranase complex 0.002 U/reaction วัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยวิธี Somogyi-Nelson โดยใช้ reaction mixture 0.5 ml และ Somogyi-Nelson reagents ปริมาตร 1 ml วัดสีที่ A500 nm โดยใช้ความเข้มข้นสับสเตรท dextran T2000 ในช่วง 0-10,000 ppm เมื่อนำข้อมูลระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยาและความเข้มข้นของ substrate มาเขียนกราฟในรูปแบบของ Lineweaver-Burk Plot ทำให้สามารถคำนวณหาค่า  $K_m$  ได้จากจุดตัดแกน x และ  $V_{max}$  ได้จากจุดตัดแกน y พบว่าเอนไซม์มีค่า  $K_m$  เท่ากับ 3846 ppm และ  $V_{max}$  เท่ากับ 188 ug/min ดังแสดงในรูปที่ 2



**รูปที่ 2** แสดงอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาที่ความเข้มข้น substrate ในช่วง 0-10,000 ppm ของ immobilized sephacryl S-300 dextranase complex จากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26

### 3.2.3 การวัดปริมาณ dextran ด้วย immobilized sephacryl S-300 dextranase complex

การวัดปริมาณ dextran T2000 ที่อยู่ในสารละลายด้วย immobilized sephacryl S-300 dextranase complex ปริมาณ 0.002U/reaction และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายด้วยวิธี Somogyi-Nelson โดยใช้ reaction mixture 0.5 ml และ Somogyi-Nelson reagents ปริมาตร 1 ml วัดสีที่ A500 nm พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นของสัสดรทในช่วง 0-1000 ppm ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่3 แสดงการวัดปริมาณ dextran T2000 standard (0 – 1000 ppm) ด้วย immobilized sephacryl S-300 dextranase complex จากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26

### 3.3 การศึกษาการตรึงเอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26 บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธี Air Dry

จากการทดลองศึกษาการตรึงเอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26 บนแผ่น nitrocellulose โดยหดยดสารละลายเอนไซม์ dextranase ลงบนแผ่น nitrocellulose จากนั้นทำให้แห้งโดยวิธี air dry ใน vacuum desiccator ที่อุณหภูมิ 30°C แล้วทดสอบการทำปฏิกิริยากับ dextran T2000 โดยหดยดสารละลายลงบนแผ่น nitrocellulose และตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS และ Somogyi-Nelson โดยหดยดสารละลายลงบนแผ่น nitrocellulose เช่นกัน พบว่าไม่พบความแตกต่างของสีที่เกิดขึ้นระหว่างชุดทดลองที่เติม dextran และชุดควบคุมที่ไม่เติม dextran ดังแสดงดังรูปที่ 4 ซึ่งอาจเกิดจากการที่เอนไซม์ dextranase ที่อยู่บนแผ่น nitrocellulose ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ dextran จนเกิดผลิตภัณฑ์ได้

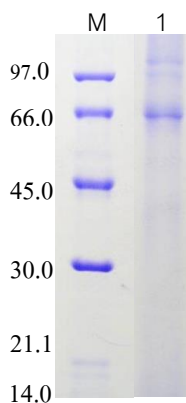


รูปที่4 แสดงผลการตรวจวัด dextran โดยใช้ enzyme strip จาก *Aspergillus* sp. X26 ที่เตรียมโดยวิธี Air dry (A) ตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และ (B) ตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

ได้ทำการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ที่ตรึงอยู่บนแผ่น nitrocellulose จากการทดลองที่ผ่านมาเมื่อทดลองใช้เอนไซม์ dextranase ซึ่งอยู่บนแผ่น nitrocellulose ทำปฏิกิริยากับ dextran และตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS และ Somogyi-Nelson พบว่าไม่พบความแตกต่างระหว่างชุดทดลองที่เติม dextran และชุดควบคุมที่ไม่เติม dextran จึงทำการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์บนแผ่น nitrocellulose เพื่อดูว่าเอนไซม์ dextranase เสื่อมสภาพหรือไม่ โดยจุ่มแผ่น nitrocellulose ลงในสารละลาย dextran T2000 ความเข้มข้น 6000 ppm บ่มที่ 40°C 10 นาที เพื่อให้เอนไซม์ที่อยู่บนแผ่น nitrocellulose ทำปฏิกิริยากับ dextran ในสารละลาย จากนั้นวัดผลิตภัณฑ์คือน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Somogyi-Nelson จากการทดลองพบว่าไม่สามารถตรวจพบน้ำตาลรีดิวซ์ จึงสรุปได้ว่าไม่สามารถใช้วิธีตรึงเอนไซม์บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธี Air Dry เพื่อใช้ในการตรวจวัด dextran ได้

### 3.4 การศึกษาการตรึงเอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Penicillium* sp. บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธีเคลื่อนย้ายจาก SDS-PAGE ด้วยกระแสไฟฟ้า

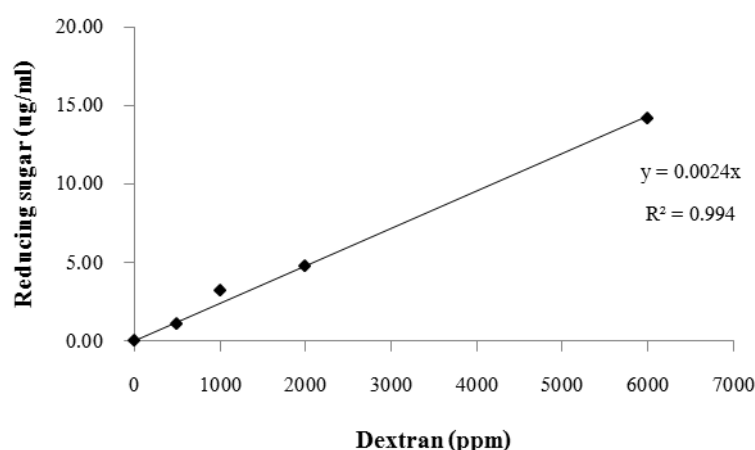
ได้ทดลองศึกษาการตรึงเอนไซม์บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธีเคลื่อนย้ายเอนไซม์ dextranase จากเชื้อรา *Penicillium* sp. (Sigma) จาก SDS-PAGE ไปแผ่น nitrocellulose ด้วยกระแสไฟฟ้าโดยโหลดตัวอย่างเอนไซม์ปริมาณ 3.76 ug (0.4 Unit) /well พบแถบโปรตีนเข้มที่ขนาด 66 kDa ดังรูปที่ 5 ซึ่งคาดว่า เป็นเอนไซม์ dextranase มีขนาดแตกต่างจากเอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26 ที่มีขนาด 86-87 kDa ล้างเจลใน 1% (w/v) triton X 100 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเจลไปยังแผ่น nitrocellulose โดยใช้กระแสไฟฟ้า 15V



รูปที่ 5 แสดงแถบโปรตีนของเอนไซม์ dextranase เมื่อแยกด้วย 12% SDS-PAGE ;lane M = marker และ lane 1= เอนไซม์ dextranase จาก *Penicillium* sp.

จากการทดลองนั้นนำแผ่น nitrocellulose ที่ได้มาตัดเป็น strip ขนาด 3 x 50 mm ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ 0.002 U/strip มาตรวจวัดปริมาณ dextran T2000 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลาย โดยการแช่แผ่น nitrocellulose ด้านที่มีเอนไซม์เกาะอยู่ในสารละลาย dextran T2000 ปริมาตร 2 ml บ่มที่ 40°C 45 นาที

จากนั้นวัดผลิตภัณฑ์คือน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากส่วนของสารละลายด้วยวิธี Somogyi-Nelson พบว่าสามารถตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ dextranase กับ dextran ดังแสดงในรูปที่ 6 จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าการตรึงเอนไซม์ dextranase บนแผ่น nitrocellulose โดยวิธีเคลื่อนย้ายจาก SDS-PAGE ทำให้เอนไซม์ dextranase ยังสามารถทำงานได้ และอาจสามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้ทำแผ่นตรวจวัด dextran ได้



รูปที่ 6 แสดงการวัดปริมาณ dextran T2000 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยเอนไซม์ dextranase จาก *Penicillium* sp. ที่ตรึงบนแผ่น nitrocellulose

### 3.5 การศึกษาวิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยชุดตรวจสอบ

การทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ dextranase ที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วย sephacryl S-300 และกำจัด dextran T10 ออกตามวิธีในข้อ 4 กับสับสเตรทคือ dextran ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งอาจจะเป็น oligosaccharide, disaccharide หรือ monosaccharide และปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้มีสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ dextran ดังนั้นการหาวิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ง่าย และรวดเร็วจึงเป็นประโยชน์อย่างมากที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากย่อยสลาย dextran ของเอนไซม์ dextranase ในขั้นตอนการทำ enzyme strip เพื่อตรวจปริมาณ dextran การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในชุดทดสอบนั้น เป็นการอาศัยหลักการการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งนำมาทดสอบ 2 แบบ ให้ผลการทดลองดังนี้ คือ

#### 3.5.1 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย glucose strip

จากการศึกษาการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย glucose strip พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ dextran T2000 ซึ่งเป็นสับสเตรท ปริมาณกลูโคสที่ตรวจวัดไม่เพิ่มขึ้นตามปริมาณ dextran ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งอาจเกิดจากข้อจำกัดของเครื่องมือที่วัดปริมาณกลูโคสได้จำกัด อีกทั้งใน reaction mixture อาจมีสารที่รบกวนการทำงานของเครื่อง จึงไม่สามารถใช้ glucose strip มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ dextranase กับ dextran ได้

**ตารางที่ 2** แสดงผลที่ได้จากการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ dextranase บริสุทธิ์บางส่วนจากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26 กับ dextran T2000 ด้วย glucose strip ร่วมกับ glucometer

| การทดลองที่ | Dextran (ppm) | สารละลายเอนไซม์ (U) | ค่าที่อ่านได้จากเครื่อง (mg/dl) |
|-------------|---------------|---------------------|---------------------------------|
| 1           | 600           | 0.1                 | 159                             |
| 2           | 2400          | 0.1                 | 152                             |
| 3           | 4200          | 0.1                 | 148                             |

### 3.5.2 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย Color reagent

จากการศึกษาการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ dextranase และ dextran T10 ด้วย Color reagent พบว่าไม่สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นได้ ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งอาจเกิดจาก Color reagent เป็นสารที่เฉพาะสำหรับการตรวจวัดกลูโคสเท่านั้น แต่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ dextranase กับ dextran อาจจะได้ oligosaccharide เป็นส่วนใหญ่ มีกลูโคสเกิดขึ้นน้อยจึงไม่สามารถตรวจพบกลูโคสได้

**ตารางที่ 3** แสดงผลการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ dextranase บริสุทธิ์บางส่วนจากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26 กับ dextran T2000 Color reagent

| การทดลองที่ | Dextran (ppm) | สารละลายเอนไซม์ (U) | ค่าที่วัดได้ |
|-------------|---------------|---------------------|--------------|
| 1           | 600           | 0.1                 | 0            |
| 2           | 2400          | 0.1                 | 0            |
| 3           | 4200          | 0.1                 | 0            |

## บทที่ 4

### สรุปผลการวิจัย

1.สามารถผลิต Sephacryl S-300 dextranase complex ได้จากการใช้เอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Aspergillus* sp. X26 ในส่วนของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงขั้นตอนเดียว พบว่า Sephacryl S-300 dextranase complex มีกิจกรรมของเอนไซม์ 0.02U/ml ในสารละลาย 0.05M citrate buffer pH 5.5 ที่มี 0.625% w/v dextran T2000 บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 10 นาที มีค่า  $K_m$  app และ  $V_{max}$  app เท่ากับ 3846 ppm (dextran) และ 188 ug (reducing sugar)/min ตามลำดับ

2. สามารถใช้ Sephacryl S-300 dextranase complex วัดปริมาณ dextran ในสารละลาย แล้วตรวจปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในสารละลายด้วยวิธี Somogyi-Nelson โดยใช้ reaction mixture 0.5 ml และ Somogyi-Nelson reagents ปริมาตร 1 ml วัดสีที่ A500 nm พบว่า Sephacryl S-300 dextranase complex 0.002 U/reaction สามารถวัดปริมาณ dextran มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ( $R^2 = 0.99$ ) อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-1000 ppm

3. การใช้ชุดตรวจสอบน้ำตาลกลูโคส ยังมีความไม่เหมาะสมในการใช้ตรวจสอบปริมาณ dextran ได้

4. สามารถผลิตenzyme strip จากการใช้เอนไซม์ dextranase จากเชื้อ *Penicilium* sp.(Sigma) บนแผ่น nitrocellulose โดยใช้กระแสไฟฟ้า ได้ Enzyme strip ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 0.002U/strip (ขนาด 3 x 50 mm)

5. สามารถใช้ enzyme strip วัดปริมาณ dextran ในสารละลาย แล้วตรวจปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในสารละลายด้วยวิธี Somogyi-Nelson โดยใช้ reaction mixture 0.5 ml และ Somogyi-Nelson reagents ปริมาตร 1 ml วัดสีที่ A500 nm พบว่า enzyme strip 0.002 U/strip สามารถวัดปริมาณ dextran มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ( $R^2 = 0.994$ ) อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-6000 ppm

### บรรณานุกรม

- ปรีชา สุริยาพันธุ์ (2541) ปัญหาของ dextran ในขบวนการผลิตน้ำตาล. วารสารอ้อยและน้ำตาลไทย ปีที่ 5 ฉบับที่ 2 ประจำเดือนสิงหาคม 2541. หน้า 11-14.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2549. รายงานผลการสำรวจพื้นที่ปลูกอ้อยด้วยข้อมูลดาวเทียมปีการผลิต 2548/49 (110 หน้า)
- Bose, S. and Singh, L. (1981). Problems associated with dextran, the major microbiological cause of sucrose loss and their remedies. *Indian Sugar, December*: 603-608
- Brown, C. F. and P. A. Inkerman. 1992. Specific method for quantitative measurement of the total dextran content of raw sugar. *J. Agric. Food Chem.* 40:227-233.
- Chen, J. C. P. and Rauh, J. S. (1990). Technical and Economic Justification for the Use of Sugar Process Chemicals. 49th Annual Conference of the Hawaiian Sugar Technologists, pp. F48-57.
- Clarke, M.A., L.A. Edye, F. Cole and J. Kitchar, 1997, Sugarcane factory trials with dextranase Enzyme. *Sugar Journal*, 60:20-22.
- Curtin, J. H. and McCowage, R. J. 1986. Dextran measurement in cane products. *Proc. ISSCT*. 19:755-764.
- DeStefano, R. P. and Irely, M. S. 1986. Measuring dextran in raw sugars – historical perspective and state of the art. *J. Am. Soc. Cane Technol.* 6:112-120
- Eggleston, G. and A. Monge. 2005. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. *Process Biochem.* 40: 1881-1894.
- Imrie, F.K.E., and Tilbury R.H. (1972) Polysaccharides in sugar cane and its products, *Sugar Technology Reviews*, 1:291-361.
- Keniry, J.S., Lee, J. B. and Mahoney, V. C. 1969. Improvements in the dextran assay of sugar cane materials. *Int. Sugar J.* 71:230-233.
- Khalikova, E., P. Susi, and T. Korpela. 2005. Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications. *Microbiol. Molec. Biol. Reviews*. 69: 306-325.
- Kubik, C., Galas, E. and Sikoro, B. 1994. Determination of dextran in raw beet juices by the Haze. Enzymatic method. *Int. Sugar J.* 96(1149):358-360.
- Meade, G.P. and J.C.P. Chen. (1997). *Cane Sugar Handbook*. 10<sup>th</sup> ed. John Wiley & Son, Inc., New York. 947p.
- Milintawisamai N., S. Netsopa, S. Khueychai, and S. Niamsanit. 2011. Dextranase from *Aspergillus* sp. X 26. The Second International Conference on Applied Science

and The Third International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region. Luang Prabang, Lao People's Democratic Republic. Mar 24-25, p40 (Abstract).

Rauh, J. S., Cuddihy, J. A., and Falgout, R. N. Analyzing Dextran in the Sugar Industry: A Review of Dextran in the Factory and a New Analytical Technique. Midland Research Laboratories, Inc.

(website 1 : <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/dexreview.pdf>)

Roberts, E. J. 1983. A quantitative method for dextran analysis. *Int. Sugar J.* 85: 10-13.

Singleton, V., Horn, J., Buche, C., and Adlard, M. (2002). A New Polarimetric Method for The Analysis of Dextran and Sucrose. *Journal American Society of Sugarcane Technologists.* 22, 112-119