

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลและกากน้ำตาลอันดับ 4 ของโลก รายได้ปีละกว่า 20,000 ล้านบาท 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 ยืดเวลาดื่ยวน้ำตาล ทำให้น้ำตาลดิบที่ได้มีสีปนเปื้อนของโมลาส ทำให้ประสิทธิภาพโดยรวมในการผลิตน้ำตาลลดลง โรงงานต้องจ่ายเงินจำนวนมากเพื่อติดตั้งระบบน้ำร้อนเพื่อล้างระบบภายในโรงงาน หรือมีฉะนั้นก็ ต้องเสียเงินเพื่อซื้อสารเคมี Biocide เพื่อใช้ทำความสะอาดระบบในโรงงานเป็นจำนวนมาก การกำจัดเดกซ์แทรนในกระบวนการผลิตน้ำตาลของโรงงานนิยมใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (dextranase) พบว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ที่ผลิตจากเชื้อรามีประสิทธิภาพสามารถลดเดกซ์แทรนและทำให้ผลผลิตน้ำตาลเพิ่มขึ้นได้ แต่เนื่องจากเอนไซม์มีราคาสูงคณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาการผลิตเอนไซม์ใช้เองภายในประเทศ ซึ่งผู้ร่วมวิจัย ผศ. สุวรรณา เนียมสนิท สามารถแยกเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26 จากดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่ามีการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสสูง

#### 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp.X26
- 2) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

### 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

เพื่อให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่มีกิจกรรมสูง จากเชื้อรา *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ X26 ซึ่งแยกได้จากดิน ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดย และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ได้แก่ อุณหภูมิ, pH ที่เหมาะสม ความเสถียร ความจำเพาะ และการทดสอบการย่อยเดกซ์แทรน (dextran) ในน้ำอ้อยในสภาวะที่เลียนแบบกระบวนการหีบสกัดของโรงงานน้ำตาล

### 1.4 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมน้ำตาลทราย ประเทศไทยบริโภคน้ำตาลปีละ 1.6-1.7 ล้านตัน เป็นมูลค่า 17,000-19,000 ล้านบาท และมีการส่งออกมากกว่าปีละ 3 ล้านตัน เป็นมูลค่า 20,000-30,000 ล้านบาท ทำให้ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลอันดับ 4 ของโลก ปริมาณผลผลิตอ้อยในแต่ละปีไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับพื้นที่ปลูกและผลผลิตต่อไร่ ในปี 2548/2549 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 ทำให้น้ำอ้อยข้นเหนียว จับเกาะกับผิวของท่อส่งน้ำอ้อย เกิดการอุดตัน มีผลทำให้ลดประสิทธิภาพการทำไต (clarification) และการกรอง (filtration) ทำให้การระเหยของน้ำอ้อยในหม้อระเหยสูญญากาศช้า ยืดเวลาเกี่ยวน้ำตาล ทำให้น้ำตาลดิบที่ได้มีสีปนเปื้อนของโมลาส ส่งผลให้ประสิทธิภาพโดยรวมในการผลิตน้ำตาลลดต่ำลง Chen และ Rauh (1990) เสนอให้จัดระบบสุขาภิบาลหรือการทำมาสะอาดที่ดี และใช้ biocide พบว่าจะช่วยควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดเดกซ์แทรน ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบก็ยังเป็นปัญหาต่อกระบวนการผลิตน้ำตาลอยู่

ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรนที่พบมากและก่อให้เกิดปัญหาในกระบวนการผลิตน้ำตาลได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Leuconostoc dextranicum* นอกจากนั้นยังพบจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ อีกเช่น *Aerobacter* sp., *Betabacterium dextranicum*, *Streptococcus* sp. จุลินทรีย์เหล่านี้พบได้ทั่วไปในไร้อ้อยหรือบริเวณที่มีน้ำอ้อย งานวิจัยของ Milintawisamai และคณะ (2009) ได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรนจากตัวอย่างน้ำอ้อยของโรงงานน้ำตาลมิตรภูเวียง อำเภอนหนอง

เชื้อ จังหวะคอนแกน พบว่าเป็น *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* และ *Lactobacillus fermentum*

Imrie และ Tilbury (1972) พบว่าอ้อยที่เผาไฟจะเกิดเดกซ์แทรนได้มากกว่าอ้อยสด เนื่องจากอ้อยไหม้ไฟมีโอกาสดูดเชื้อง่าย โดยเฉพาะเชื้อ *L. mesenteroides* อันเนื่องมาจากบาดแผลที่เกิดขึ้น และเอนไซม์ในระบบป้องกันเชื้อโรคถูกทำลาย นอกจากนั้นความล่าช้าในการเก็บเกี่ยว การขนส่ง การเข้าคิวเพื่อขนถ่ายอ้อยเข้าส่งโรงงาน ก็เป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อยีส์เจริญทำให้เกิดการสร้างเดกซ์แทรนด้วยเช่นกัน

เกษตรกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือบางส่วนยังมีการเก็บเกี่ยวโดยวิธีการเผาอ้อยอยู่ ซึ่งทำให้มีปัญหาเดกซ์แทรนปนเปื้อนสูงในวัตถุดิบอ้อย

เดกซ์แทรน (Dextran) มีโครงสร้างเป็น homopolysaccharide ของกลูโคส ซึ่งกลูโคสแต่ละโมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -(1,6)-glycosidic linkage (ประมาณ 90-95%) และมีแขนงย่อยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -(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

การกำจัดเดกซ์แทรนในโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาลนิยมใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ซึ่งจะได้ผลดีเมื่อเติมเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสลงในน้ำอ้อยทันทีหลังจากการหีบสกัด ทำให้ปัญหาความหนืดหมดไป ส่งผลดีต่อกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายทำให้ลดการการอุดตันและใช้พลังงานลดลง (Khalikova และคณะ, 2005) Eggleston and 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 อย่างไรก็ตามในกรณีที่ไซรัป มีปัญหาในเรื่องเดกซ์แทรนก็สามารถใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสชนิดเข้มข้นที่ความเข้มข้น 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 ที่มักใส่ลงไปน้ำอ้อย โดยพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของเดกซ์แทรนที่อุณหภูมิ 50°C ด้วย

Cuddihy และคณะ (เวปไซต์ 1 และ 2) รายงานว่ามีการนิยมนำเอนไซม์ 2 ชนิดในกระบวนการผลิตน้ำตาล คือ amylase เพื่อย่อยแป้ง และเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เพื่อย่อยเดกซ์แทรน ซึ่งจะช่วยลดความหนืดในกระบวนการผลิตได้

จากบทความของ ปรีชา (2541) การใส่เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ลงไปในน้ำอ้อยและน้ำเชื่อมที่กำลังเคี้ยวให้ตกผลึก โดยของเหลวทั้งคู่ต้องมี pH อยู่ที่ 5-8 ทำให้เดกซ์แทรนลดขนาดลง แต่การใช้เอนไซม์นี้มิได้ทำให้เดกซ์แทรนหมดไป เพียงแต่ทำให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งยังคงทำให้การวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสผิดพลาดและความหนืดของน้ำอ้อยและน้ำเชื่อมยังคงมีอยู่

Imrie และ Tilbury (1972) พบว่าการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเพียง 3% สามารถกำจัดเดกซ์แทรนได้ถึง 68.5% ในเวลาเพียง 20 นาที ที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

การกำจัดเดกซ์แทรนในกระบวนการผลิตน้ำตาลในโรงงานอุตสาหกรรมกระทำได้อย่างเนื่องจากเดกซ์แทรนละลายน้ำได้ดีมาก ในอุตสาหกรรมน้ำตาลนิยมนำเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในการย่อยเดกซ์แทรน เอนไซม์ดังกล่าวมีราคาแพง เช่น ราคาของ Sigma ใน พ. ศ. 2549 เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสปริมาณ 390 mg ราคา 13,630 บาท

เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (Dextranase; EC.3.2.1.11,  $\alpha$ -1,6-glucose-6-glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่สลายพันธะ  $\alpha$ -(1,6)-glycosidic ภายในของโมกุลเดกซ์แทรน พบทั้งในแบคทีเรียและรา สามารถผลิตได้ทั้ง extracellular และ intracellular เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสมีการผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Lipomyces* sp. และ *Chaetomium gracile* ในอุตสาหกรรมน้ำตาลจะใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ได้จากราเป็นแหล่งผลิต (ปรีชา, 2541)

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

Lloyd และคณะ (1975) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของ extracellular dextranase จากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate และ anion exchange column chromatography พบว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่แยกบริสุทธิ์ได้มี specific activity 2778 U/mg มีน้ำหนักโมเลกุล 39,000 เอนไซม์มีกิจกรรมส่วนมากอยู่ที่ pH 5.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 55°C เอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งด้วย EDTA หรือ iodoacetate ค่า  $K_m$  เท่ากับ  $1.1 \times 10^{-4}$  M เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 10,000

Wilfred และคณะ (1998) ทำการแยกบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา *Sporothrix schenckii* โดยวิธีการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate DEAE Bio-Gel และ HPLC พบว่าเอนไซม์นี้เป็นโปรตีนขนาดเดี่ยวที่มีมวลโมเลกุล 79 kDa มี pH ที่เหมาะสมที่ 5.0 และมีความสามารถที่จะย่อยเดกซ์แทรนขนาด 170 kDa ที่ได้จากแบคทีเรียซึ่งทำให้ได้สารผสมของ glucose (38%), isomaltose (38%) และ oligosaccharide ที่มีกิ่ง (24%) ในสารละลาย 200 mM sodium acetate buffer pH 5.0 เอนไซม์มีค่า  $K_m$  ต่อการย่อยสลายเดกซ์แทรนเป็น  $0.067 \pm 0.03\%$  (w/v) เกลือของ  $Hg^{2+}$ ,  $(UO_2)^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  และ  $Zn^{2+}$  มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยส่งผลกระทบต่อทั้งค่า  $V_{max}$  และ  $K_m$  เอนไซม์มีความเสถียรอยู่ในช่วง pH 4.50 และ 4.75 โดยมีครึ่งชีวิตที่ 55°C เป็น 18 นาที และพลังงานความร้อนที่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้อยู่ที่ 99 kcal/mol เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการเสถียรภาพของสายเดกแทรนใน Sephadex G-50 จนถึง Sephadex G-200 ซึ่ง Sephadex G-200 เป็นสารตั้งต้นที่ดีสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ 20°C ยังพบว่าเอนไซม์นี้สามารถสลายสายเดกแทรนที่มี cross-linked สูง เช่น Sephadex G-10 และ G-25 ได้ด้วย

Elvira และคณะ (2003) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินในธรรมชาติที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ พบว่าเป็นเชื้อ *Paenibacillus illinoisensis* ได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของเชื้อดังกล่าว ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือและ PEG การสกัดแบบ two-phase extraction และ DEAE-Sepharose chromatography พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มถึง 733 เท่า โดยมี total yield เป็น 19% ของทั้งหมด เอนไซม์ที่ได้มี 3 isoform ที่มีมวลโมเลกุลเป็น 76, 89 และ 110 kDa และค่า pI ที่ 4.95, 4.2 และ 4.0 ตามลำดับ สารละลายผสมของเอนไซม์ทั้ง 3 isoform มีช่วง pH ที่เหมาะสมที่ประมาณ 6.8 และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 50°C ลำดับของ N-terminnal (Ala-Ser-Thr-Gly-Lys) เหมือนกันทั้ง 3 isoform โดยลำดับกรดอะมิโนที่ทราบนี้ไม่พบว่ามีลักษณะเหมือนกับที่รู้จักในข้อมูลของ protein data bank

ตัวอย่างการศึกษาในแบคทีเรีย ได้แก่ John และคณะ (1987) ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของเชื้อ *Streptococcus sorbrinus* ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ (extracellular) ด้วยวิธีตกตะกอนโปรตีนในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 70% ammonium sulfate

ตามด้วย Hemoglobin-Sepharose 4B และ Ultrogel AcA-34 gel filtration column chromatography พบว่ามีเอนไซม์เคซซินเนส 2 ชนิดคือที่น้ำหนักโมเลกุล 175,000 และ 160,000 เอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 3,189 เท่า และ 2,331 เท่า ตามลำดับ ปริมาณโปรตีนที่ได้มี yield recovery เป็น 65% อุณหภูมิที่เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดอยู่ที่ 36°C และทนอุณหภูมิได้ถึง 44°C เอนไซม์มีค่า pH optimum เป็น 5.4 และ 5.2 และมีค่า Km เป็น 1.1 และ 1.25 mM ของสารตั้งต้น เคซซินเนส T-2000 สำหรับเอนไซม์ขนาด 175,000 และ 160,000 ตามลำดับ

Wynter และคณะ (1997) ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เคซซินเนสที่ทนร้อนจากเชื้อ *anaerobic thermophilic bacterium* Rt364 เอนไซม์ถูกทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ตามด้วย DEAE-Trisacryl , Phenyl sepharose และ Ultrogel AcA44 gel filtration column chromatography เอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 140 kDa มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 80°C มี optimum pH ที่ 5.5 เอนไซม์มีความเสถียรสูงมาก โดยไม่เสียความสามารถทำงานได้มากกว่า 12 ชั่วโมง ที่ 75°C แต่มี specific activity น้อยมากอยู่ที่ 10 U/mg เอนไซม์สามารถย่อยสลายเคซซินเนส แป้ง amylose และ amylopectin ได้

ต่อมา Wynter (1997) ศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เคซซินเนสที่ทนร้อนจากเชื้อ *anaerobic thermophilic bacterium* Rt364 เพื่อการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมน้ำตาล โดยการดูดซับบน Sephacryl S-300 แล้วชะเอนไซม์ออกด้วยสารตั้งต้นเคซซินเนส 2% T10 เอนไซม์ที่ได้มีปริมาณ recovery ประมาณ 47% มีความบริสุทธิ์ขึ้นประมาณ 25 เท่า มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 80°C เอนไซม์เคซซินเนสนี้สามารถสลายได้ทั้งพันธะ  $\alpha$ -(1,6) และ  $\alpha$ -(1,4)-glucosidic ถือว่าการดูดซับด้วย Sephacryl S-300 เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถประยุกต์ใช้ในการทำให้เข้มข้นและทำบริสุทธิ์เอนไซม์จากแบคทีเรียที่สามารถสลายเคซซินเนสได้