

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380211

ชื่อโครงการ: การตรึงแอลฟา-อะไมเลสบนเส้นใยเซลลูโลสสำหรับการย่อยแป้ง

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ดร.สันติ ตั้งประภา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

อีเมล: tsanti@mut.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 15 มิ.ย. 53 – 14 มิ.ย. 55

บทคัดย่อ:

จากการศึกษาการตรึงเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสบนเส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต (Electrospinning) โดยใช้สารละลายเซลลูโลสอะซิเตทที่มีความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ โดยศึกษาตัวเชื่อมประสาน (Coupling agent) สองชนิด คือ อีพิคลอโรไฮดริน (Epichlorohydrin) และไซยานูริกคลอไรด์ (Cyanuric chloride) พบว่าปริมาณโปรตีน (แอลฟา-อะไมเลส) ที่เกาะอยู่บนเส้นใยเมื่อใช้มีค่าเท่ากับ 77.29 และ 120.82 มิลลิกรัมเอนไซม์ต่อกรัมเส้นใย เมื่อใช้อีพิคลอโรไฮดรินและไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานตามลำดับ เมื่อนำมาศึกษาการนำมาใช้ในปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้งพบว่าค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงสูงสุดคือ 7 และ 50 องศาเซลเซียส โดยให้แอกทิวิตีเท่ากับ 6.55 และ 6.74 ยูนิตต่อกรัมเส้นใย เมื่อใช้อีพิคลอโรไฮดรินและไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานตามลำดับ และสามารถนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเส้นใยมาใช้ซ้ำได้สามครั้งจนกว่าแอกทิวิตีจะหมด

คำหลัก : Electrospinning, alpha-amylase, immobilized enzyme

Abstract

Project Code : MRG5380211

Project Title : Immobilization of α -amylase onto cellulose fibers for starch hydrolysis

Investigator : Dr. Santi Tungprapa , Mahanakorn University of Technology

E-mail Address : tsanti@mut.ac.th

Project Period :

Abstract:

The study of immobilization of alpha-amylase onto cellulose fibers with the covalent binding method from electrospinning process was carried out. In this study, the concentration of cellulose acetate solution was kept constant at 16 % w/v. Two types of coupling reagents included epichlorohydrin and cyanuric chloride were used. The experimental results show that the amounts of alpha-amylase on cellulose acetate are 77.63 and 121.40 milligram enzyme per gram fiber when using epichlorohydrin and cyanuric chloride as coupling reagent, respectively. For a starch hydrolysis, the maximum condition was observed at pH 7.0 and temperature at 50°C in which the highest specific activities of enzyme at 6.85 and 7.97 unit per milligram fiber are achieved when using epichlorohydrin and cyanuric chloride as coupling reagent, respectively. To determine the reusability of the immobilized enzyme, the activity was measured sequentially three times.

Keywords : Electrospinning, alpha-amylase, immobilized enzyme

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตทเป็นเส้นใยเซลลูโลส
2. เพื่อศึกษาการตรึงแอลฟา-อะไมเลสบนผิวของเส้นใยเซลลูโลสด้วยกระบวนการเกิดพันธะเคมี
3. เพื่อศึกษาความสามารถในการนำเส้นใยที่ทำการตรึงแอลฟา-อะไมเลสมาใช้งานซ้ำในปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้ง

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเส้นใยด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

1.1 ชั่งผงเซลลูโลสอะซิเตทแล้วนำไปละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตนกับไดเมทิลอะเซตาไมด์ ในอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร โดยในการทดลองทำการเตรียมสารละลายเซลลูโลสอะซิเตทที่มีความเข้มข้นร้อยละ 12-20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

1.2 นำสารละลายเซลลูโลสอะซิเตทใส่ลงในหลอดฉีดยาซึ่งมีเข็มโลหะติดอยู่ที่ปลายหลอด ให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ระบบที่ 15 กิโลโวลต์ โดยให้มีระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับอยู่ที่ 15 เซนติเมตร โดยจะทำการปั่นเส้นใยแต่ละความเข้มข้นประมาณ 10 นาที

1.3 นำเส้นใยที่ปั่นได้ในแต่ละความเข้มข้นไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เลือกลักษณะของเส้นใยที่เหมาะสมในการนำมาปั่นเป็นเส้นใยเพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการตรึงเอนไซม์

2. การเปลี่ยนเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตทให้เป็นเส้นใยเซลลูโลส

2.1 นำเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตทที่ปั่นได้มาตัดให้ได้ขนาดประมาณ 2x2 นิ้ว จากนั้นนำมาแช่ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยมีตัวทำละลายเป็นเอทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง

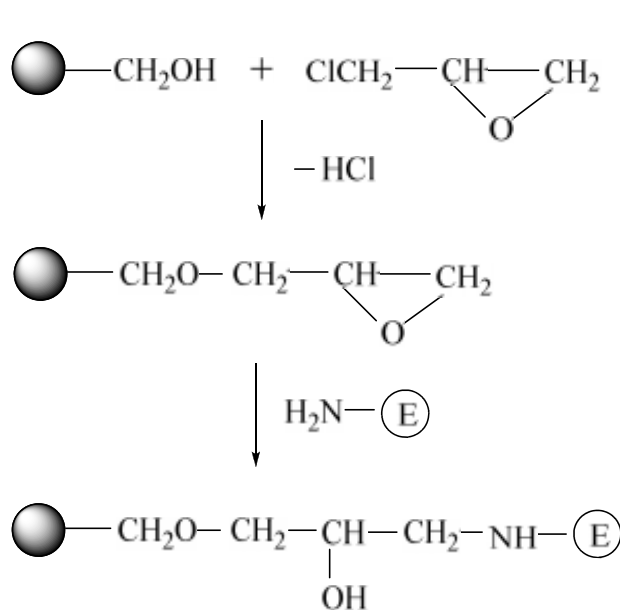
2.2 นำเส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากข้อ 2.1 ไปตรวจสอบลักษณะของหมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (FT-IR) เทียบกับเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตท

3. การตรึงเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสลงบนเส้นใยเซลลูโลส

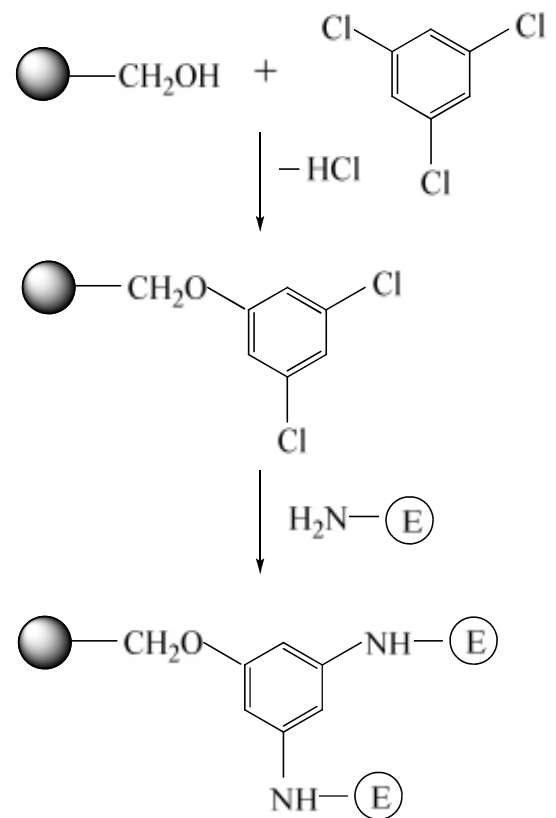
3.1 ชั่งน้ำหนักเส้นใยเซลลูโลสที่ได้

3.2 นำเส้นใยเซลลูโลสไปแช่ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ซ้ำอีกครั้งให้ชุ่ม เพื่อกระตุ้นหมู่ไฮดรอกซิลให้เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์

3.3 นำเส้นใยจากข้อ 3.2 มาแช่ลงในสารละลายอีพิกโลโรไฮดรินและสารละลายไซยาไนด์คลอไรด์เพื่อให้เป็นตัวเชื่อมประสานระหว่างเอนไซม์กับเส้นใย



ก. อีพิกลอโรไฮดริน



ข. ไซยานูริกคลอไรด์

รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์โดยใช้ตัวเชื่อมติด ก. อีพิกลอโรไฮดริน และ ข. ไซยานูริกคลอไรด์

3.4 นำเส้นใยที่ได้จากข้อ 3.3 มาแช่ลงในสารละลายแอลฟา-อะไมเลสที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นตัวทำละลาย แช่ในเครื่องช่วยเขย่าเป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง

3.5 นำสารละลายแอลฟา-อะไมเลสมาวัดปริมาณเอนไซม์ก่อนตรึงด้วยวิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford's Method) โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายมาตรฐาน และหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ก่อนตรึงโดยใช้มอลโตสเป็นสารละลายมาตรฐาน

4. การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Bovine serum albumin

4.1 เตรียมสารละลาย Bradford reagent โดยการเตรียม Coomassie Brilliant Blue ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์ กรดฟอสฟอริก และน้ำ ในอัตราส่วน 1:2:1 โดยปริมาตร

4.2 เตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ น้ำ เป็นตัวทำละลาย

4.3 ปิเปตสารละลายแต่ละชนิดโดยมีปริมาตรตามตารางที่ 1 ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 อัตราส่วนสารละลายชนิดต่างๆ ในการทำกราฟมาตรฐาน BSA

หลอดที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BSA (mL)	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
Bradford Reagent (mL)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
น้ำกลั่น (mL)	0.40	0.35	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.00

4.4 สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

5. การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมอลโตส

5.1 เตรียมสารละลายมอลโตสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

5.2 เตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid, DNS) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์เป็นตัวทำละลาย

5.3 ปิเปตสารละลายแต่ละชนิดโดยมีปริมาตรตามตารางที่ 2 นำสารละลายไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที เติมน้ำกลั่นอีก 4 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

5.4 สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของมอลโตสกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

ตารางที่ 2 อัตราส่วนสารละลายชนิดต่างๆ ในการเตรียมกราฟมาตรฐานมอลโตส

หลอดที่	1	2	3	4	5	6
DNS (mL)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
สารละลายมอลโตส (mL)	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
น้ำกลั่น (mL)	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25

6. การหาปริมาณโปรตีน

6.1 เตรียมสารละลายแอลฟา-อะไมเลสเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6.2 นำสารละลายแอลฟา-อะไมเลสมาผสมกับสารละลาย Bradford reagent ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ตามภาคผนวก จ

6.3 นำสารละลายในข้อ 6.2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

6.4 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA

7. การหาแอกทिवิตีบนแผ่นเส้นใย

7.1 เตรียมสารละลายผสมของน้ำแป้งเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก น้ำกลั่น และสารละลาย บัฟเฟอร์ pH 5.0 ที่ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 1.5 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ในหลอดทดลอง

7.2 นำหลอดทดลองในข้อ 7.1 ตั้งไว้ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเส้นใยเซลลูโลสที่ตรึงแล้วใส่ลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

7.3 เตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid, DNS) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์เป็นตัวทำละลาย

7.4 ปิเปตสารละลายผสมจากหลอดทดลองในข้อ 7.2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน DNS 0.5 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ในข้อ 7.3

7.5 นำสารละลายไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที เติมน้ำกลั่น อีก 4 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

7.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของมอลโตส โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานมอลโตส

7.7 ทำการทดลองในข้อ 7.1 ถึง ข้อ 7.6 ซ้ำ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ตามลำดับ

7.8 ทำการทดลองในข้อ 7.1 ถึง ข้อ 7.7 ซ้ำ โดยปรับอุณหภูมิที่ 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

1. การเตรียมสารละลายของเซลลูโลสอะซีเตต

สารละลายของเซลลูโลสอะซีเตตเตรียมได้จากระบบของตัวทำละลายผสมด้วยอัตราส่วน 2:1 (v/v) acetone –DMAc ที่ความเข้มข้น 12-20 % (w/v) โดยสารละลายที่เตรียมได้จะต้องวัดค่าความหนืด แรงตึงผิวและการนำไฟฟ้า ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าความหนืด แรงตึงผิวและการนำไฟฟ้าของสารละลายเซลลูโลสอะซีเตตในระบบตัวทำละลายผสมระหว่าง acetone-DMAc (2:1 v/v)

Sample	Concentration (%(w/v))	Shear viscosity (mPa s)	Surface tension (mN m ⁻¹)	Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$)	Fiber diameter (μm)
2:1 (v/v) acetone-DMAc	12	155.0	28.0	4.83	0.14 $\pm$ 0.31
	14	260.0	28.3	4.81	0.23 $\pm$ 0.25
	16	390.0	29.9	5.61	0.26 $\pm$ 0.20
	18	545.0	29.7	5.51	0.33 $\pm$ 0.34
	20	928.0	30.0	5.48	0.37 $\pm$ 0.28

จากผลการทดลองพบว่าค่า shear viscosity ของสารละลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายมากขึ้น เนื่องจากเกิดการพันกันของสายโซ่พอลิเมอร์ (chain entanglement) มากขึ้น เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น

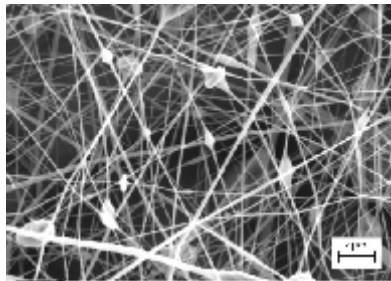
2. การเตรียมเส้นใยที่จะใช้เป็นขั้วสเตรทในการตรึงเอนไซม์

ทำการปั่นเส้นใยจากสารละลายเซลลูโลสอะซีเตต โดยการนำเซลลูโลสอะซีเตตมาละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างอะซีโตนและไดเมทิลอะซิเตตในอัตราส่วน 2:1 v/v จากนั้นปั่นเส้นใยโดยใช้

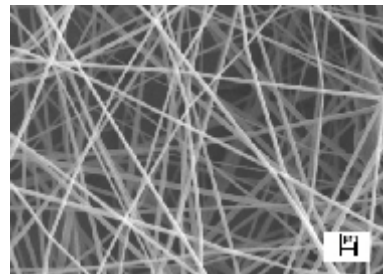
สารละลายความเข้มข้นระหว่าง 12- 20% w/v ที่ความต่างศักย์ 15 kV และมีระยะห่างระหว่างปลายเข็มฉีดกับฉากรับ 15 เซนติเมตร โดยจะทำการปั่นเส้นใยแต่ละความเข้มข้นประมาณ 10 นาที

3. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใย

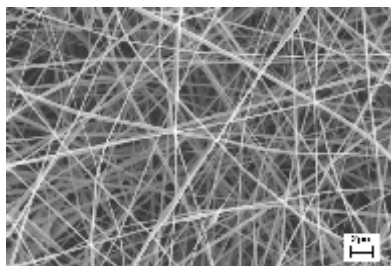
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความหนาแน่นของเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตตทำได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM, JEOL JSM-6400)



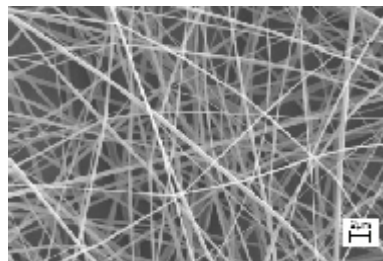
12 %



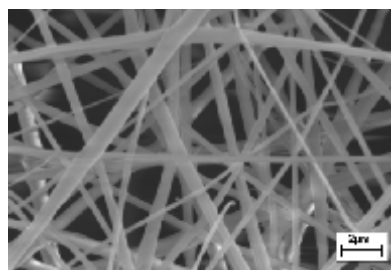
14 %



16 %



18 %



20%

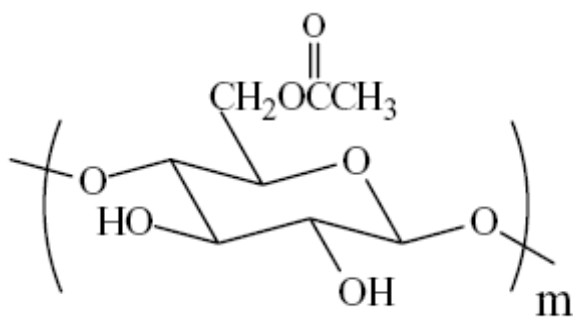
รูปที่ 2 แสดงภาพจาก SEM ของเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตตที่ความเข้มข้นต่าง 12-20 % (w/v) โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมของ acetone – DMAc ที่ 2:1 (v/v)

จากรูปที่ 2 ลักษณะสัญญาณวิทยาที่ได้พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำ (12 %w/v) มีเม็ดปม (bead) เกิดขึ้นทั่วไปบนเส้นใยเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นเม็ดปมจะหายไป (14-18 % w/v) แต่เมื่อสารละลายมีความเข้มข้นสูง จะทำให้ขนาดของเส้นใยใหญ่และขนาดไม่สม่ำเสมอ ส่งผลให้มีพื้นที่ผิวของเส้นใยลดลง จากนั้นปั่นเส้นใยโดยใช้ความเข้มข้นที่เลือกไว้ให้ได้ปริมาณเส้นใย ขนาด และความหนาที่พอเหมาะ

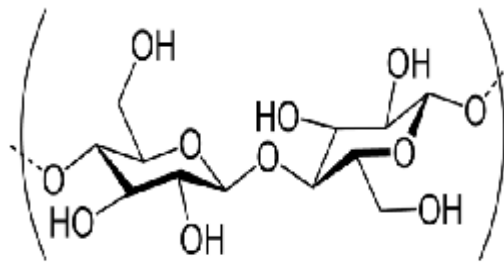
นำเส้นใยที่ปั่นได้มาแช่ในสารละลาย 0.1 M NaOH โดยเตรียมจากตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำและเอทานอลในอัตราส่วน 3:1 v/v เพื่อกำจัดหมู่อะเซตในเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตต ทำให้ได้เส้นใยของเซลลูโลส นำไปวิเคราะห์ลักษณะรูปร่างและยืนยันผลด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น SEM และ FT-IR ตามลำดับ

4. ผลการเปลี่ยนเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตตเป็นเส้นใยเซลลูโลส

จากการเตรียมเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตตโดยใช้กระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตที่ความเข้มข้นของสารละลายเซลลูโลสอะซิเตตร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตนกับไดเมทิลอะเซตาไมด์ที่อัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร จะได้เส้นใยเซลลูโลสอะซิเตตซึ่งยังไม่สามารถนำไปตรึงเอนไซม์ได้ทันที จะต้องทำการเปลี่ยนจากเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตตเป็นเส้นใยเซลลูโลสก่อน โดยโครงสร้างของเซลลูโลสอะซิเตตและเซลลูโลสแสดงดังรูปที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

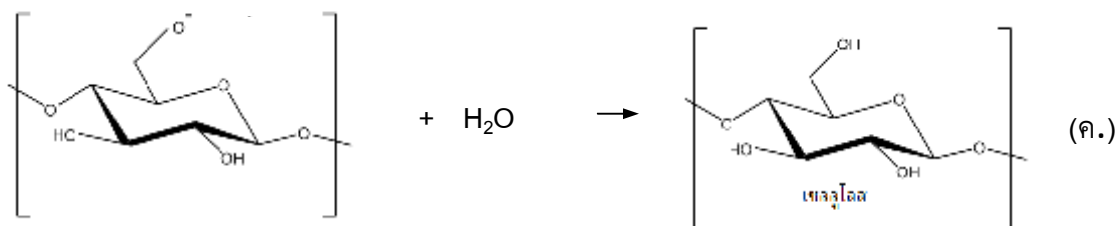
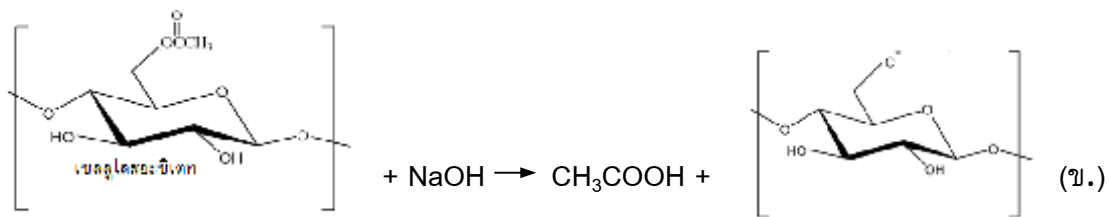
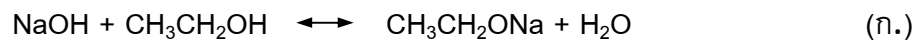


รูปที่ 3 โครงสร้างของเซลลูโลสอะซิเตต



รูปที่ 4 โครงสร้างของเซลลูโลส

จากรูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าในโครงสร้างของเซลลูโลสอะซิเตทจะมีหมู่อะซิติกอยู่ซึ่งต้องทำการกำจัดหมู่อะซิติกนี้ออกเสียก่อน เพื่อให้ได้เส้นใยเซลลูโลสซึ่งมีโครงสร้างตามรูปที่ 4 โดยการนำเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตทไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยมีตัวทำละลายระหว่างเอทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร ซึ่งจะมีขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังสมการที่ (ก.) ถึง (ค.) ดังนี้

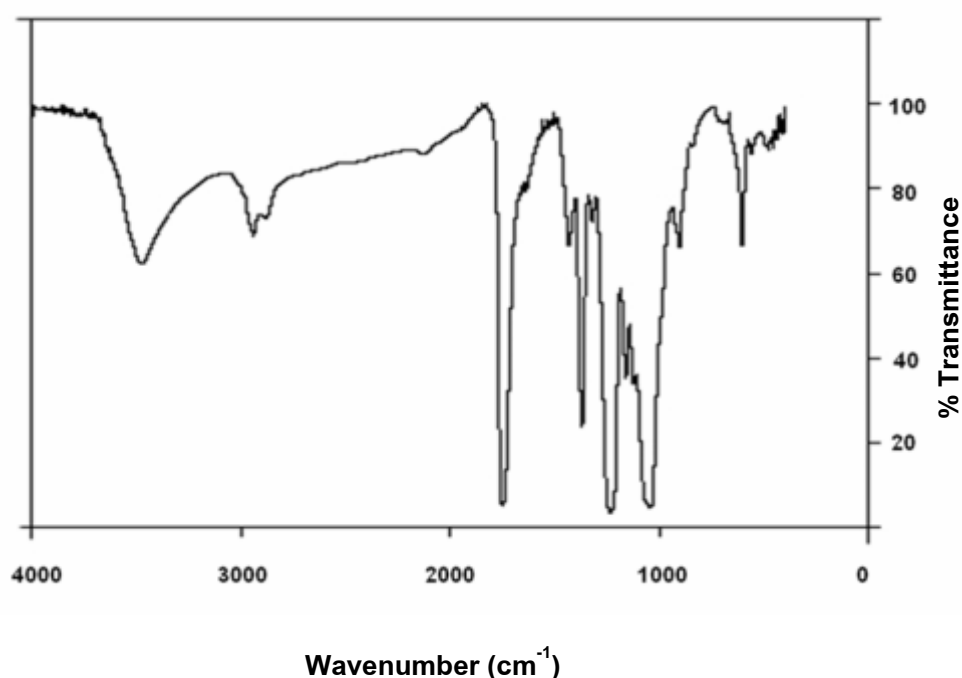


สมการ (ก.) แสดงขั้นตอนการแตกตัวของตัวทำละลายผสมระหว่างโซเดียมไฮดรอกไซด์กับเอทานอล ซึ่งสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะแตกตัวเป็นเป็นหมู่ไฮดรอกซิลแล้วเข้าไปจับกับอะตอมไฮโดรเจนของเอทานอลกลายเป็นโมเลกุลของน้ำ

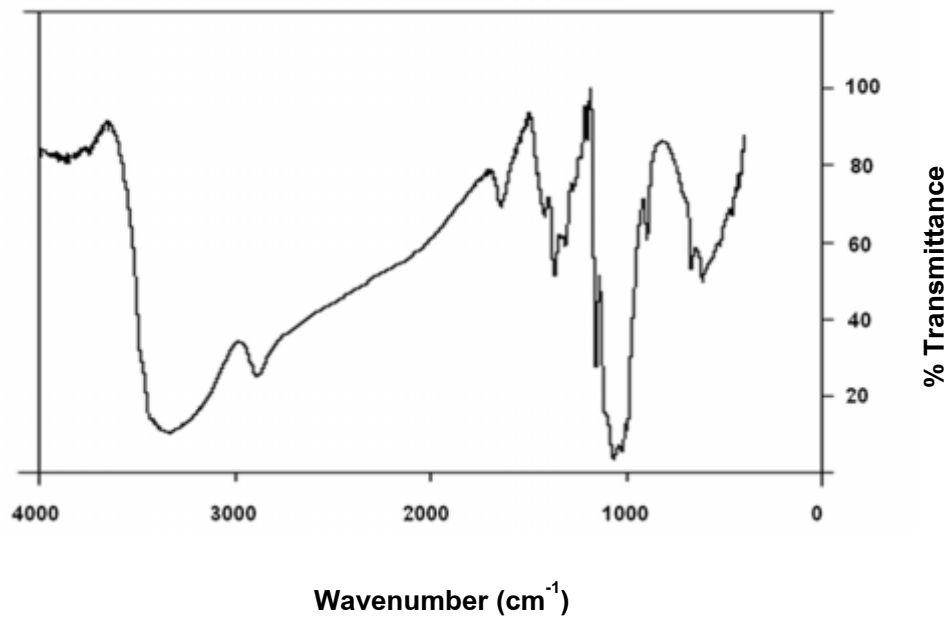
สมการที่ (ข.) แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของโซเดียมไฮดรอกไซด์ในสมการที่ (ก.) แตกตัวเป็นไฮดรอกไซด์ไอออนซึ่งทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ (Nucleophile) จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับอะตอมคาร์บอนของหมู่เอซิดิลตามสมการที่ (ข.) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นอิเล็กโตรไฟล์ (Electrophile) เกิดปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ (Nucleophilic substitution) ทำให้หมู่เอซิดิลหลุดออกไปในรูปของกรดอะซิดิก (CH_3COOH) เกิดเป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) ของเซลล์ูโลสอะซิเตทซึ่งมีอะตอมของออกซิเจนที่พร้อมจะเกิดปฏิกิริยาต่อไป

สมการที่ (ค.) แสดงให้เห็นว่าสารมัธยันตร์ที่มีอะตอมของออกซิเจนที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา จะทำปฏิกิริยากับไฮดรอกไซด์ไอออนที่แตกตัวมาจากโมเลกุลของน้ำ และกลายเป็นโมเลกุลของเซลล์ูโลสในที่สุด

เพื่อเป็นการยืนยันหมู่ฟังก์ชันบนเส้นใยเซลล์ูโลสอะซิเตท จึงได้นำเส้นใยเซลล์ูโลสอะซิเตทไปวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (FT-IR) ได้ผลแสดงดังรูปที่ 5 และเมื่อนำเส้นใยเซลล์ูโลสอะซิเตทที่ทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์และเอทานอล ไปวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันได้ผลแสดงดังรูปที่ 6



รูปที่ 5 สเปกตรัมการวิเคราะห์ด้วย FT-IR ของเส้นใยเซลล์ูโลสอะซิเตท



รูปที่ 6 สเปกตรัมการวิเคราะห์ด้วย FT-IR ของเส้นใยเซลลูโลส

จากรูปที่ 5 ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์เส้นใยเซลลูโลสอะซิเตทด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (FT-IR) พบว่าที่ความถี่ (wavenumber) ประมาณ 1700 cm^{-1} มีสเปกตรัมของหมู่คาร์บอนิลปรากฏเห็นชัดเจน แต่เมื่อทำการกำจัดหมู่อะซิเตทออกแล้วจะพบว่าสเปกตรัมของคาร์บอนิลที่ประมาณ 1700 cm^{-1} ได้หายไป และเกิดสเปกตรัมที่ความถี่ประมาณ $3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ เห็นได้ชัดเจนขึ้น ดังรูปที่ 6 ซึ่งแสดงถึงหมู่ไฮดรอกซิลเกิดเป็นช่วงกว้าง แสดงให้เห็นว่าเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตทได้เปลี่ยนเป็นเส้นใยเซลลูโลสเรียบร้อยแล้ว

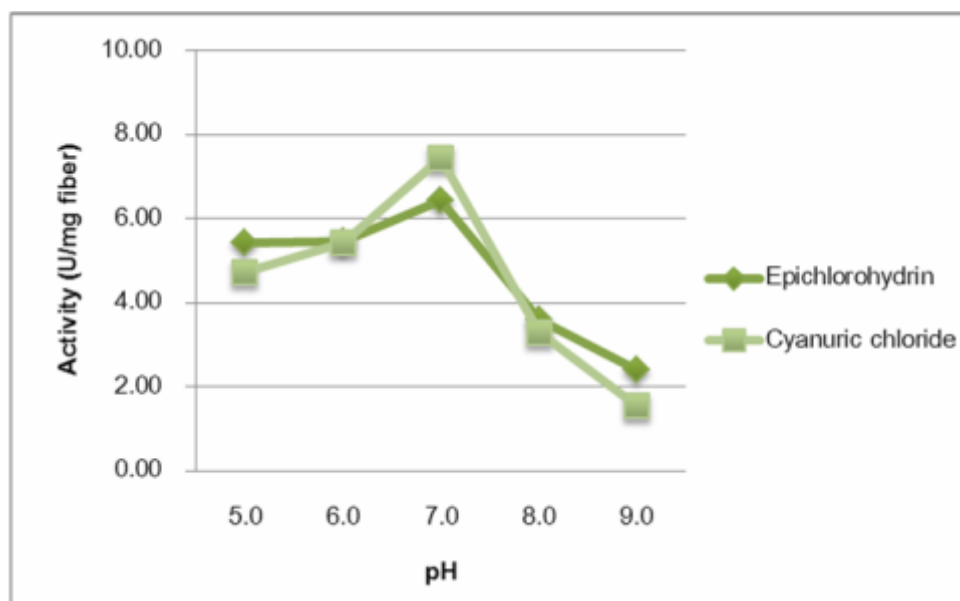
5. ผลของปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลส

ในการวัดปริมาณโปรตีนบนเส้นใยเซลลูโลสโดยใช้วิธีของ Bradford ซึ่งจะคำนวณปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA ตามภาคผนวก ก โดยผลการคำนวณพบว่าปริมาณโปรตีน (แอลฟา-อะไมเลส) ที่พบบนเส้นใยเซลลูโลสที่ใช้อีพิกลอโรไฮดริน และไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานมีค่าเท่ากับ 77.29 และ 120.82 มิลลิกรัมแอนไฮม์ต่อกรัมเส้นใยตามลำดับ

จากตัวเลขที่ได้จากการคำนวณพบว่า ปริมาณโปรตีนบนเส้นใยเซลลูโลสที่ใช้ อีพิกลอโรไฮดรินจะมีค่าน้อยกว่าการใช้ไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานเนื่องจากว่า โครงสร้างของไซยานูริกคลอไรด์จะมีตำแหน่งที่แอนไฮม์สามารถเข้าไปเกาะได้สองตำแหน่งซึ่งมากกว่าโครงสร้างของอีพิกลอโรไฮดรินที่มีเพียงหนึ่งตำแหน่งเท่านั้น

6. แอ็กทिवิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงที่ค่าความเป็นกรดต่างของซัสเตรทเปลี่ยนไป

ในการศึกษาหาค่าแอ็กทिवิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อทำการปรับสภาพความเป็นกรดต่างของน้ำแป้งซึ่งเป็นซัสเตรท ในปฏิกิริยาการย่อยแป้งให้เป็นมอลโตส โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของมอลโตส ตามภาคผนวก ก ผลการคำนวณค่าแอ็กทिवิตีเมื่อใช้อีพิกลอโรไฮดรินและไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานแสดงดังรูปที่ 7

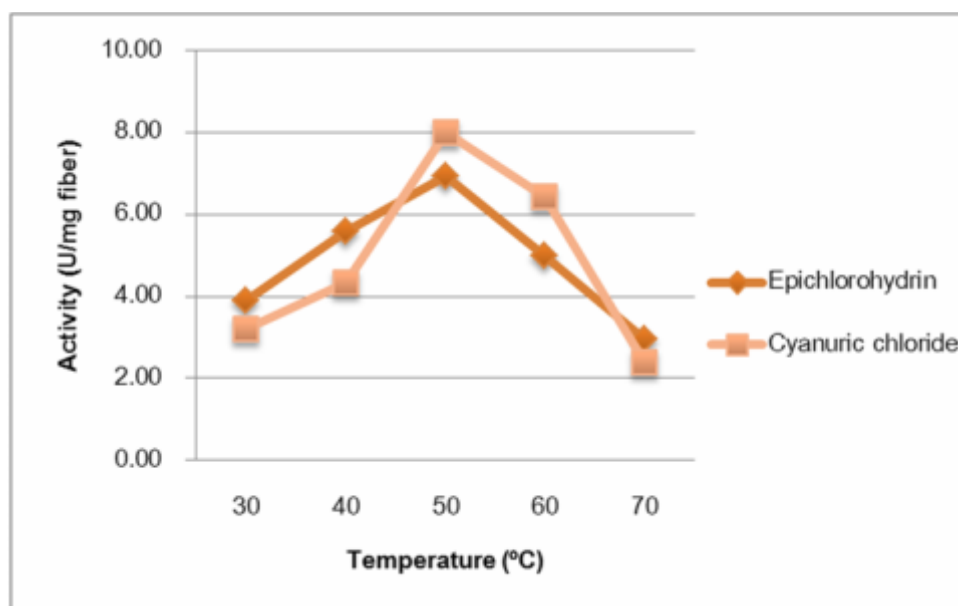


รูปที่ 7 กราฟแอ็กทिवิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อค่าความเป็นกรดต่างของน้ำแป้งเปลี่ยนไป

จากรูปที่ 7 แสดงให้เห็นว่าแนวโน้มของแอ็กทिवิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงเมื่อใช้อีพิกลอโรไฮดรินและไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันและที่ pH 7.0 จะมีค่ามากที่สุด ซึ่งมีค่า 6.43 และ 7.45 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเส้นใย เมื่อใช้อีพิกลอโรไฮดรินและไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง การที่สภาวะเป็นกรดหรือด่างมากเกินไปอาจทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพ จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

8. แยกทิวติของเอนไซม์ที่ถูกตรึงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนไป

ในการศึกษาหาค่าแยกทิวติของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อทำการปรับสภาพความเป็นกรดต่างของน้ำแป้งซึ่งเป็นซับสเตรท พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 7.0 จะให้ค่าสูงที่สุด จึงได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาการย่อยแป้งให้เป็นมอลโตส โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของมอลโตส ตามภาคผนวก ก ผลการคำนวณค่าแยกทิวติเมื่อใช้อีพิกลอโรไฮดรินและไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานแสดงดังรูปที่ 8



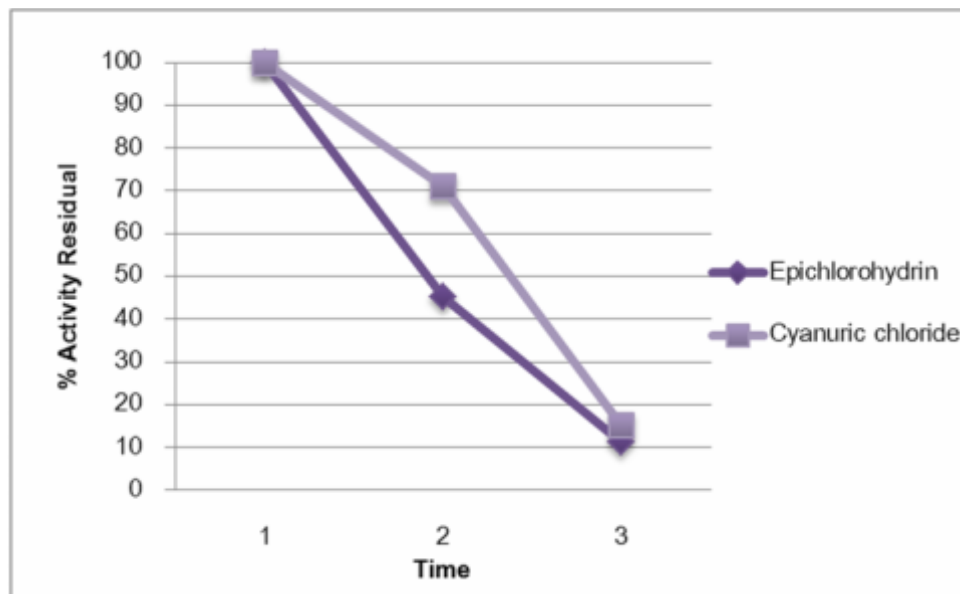
รูปที่ 8 กราฟแยกทิวติของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนไป

จากรูปที่ 8 แสดงให้เห็นว่าแนวโน้มของแยกทิวติของเอนไซม์ที่ถูกตรึง เมื่อใช้อีพิกลอโรไฮดรินและไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันและที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส จะมีค่ามากที่สุด ซึ่งมีค่า 6.93 และ 7.99 หน่วยต่อมิลลิกรัมเส้นใย เมื่อใช้อีพิกลอโรไฮดรินและไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิต่ำๆ เอนไซม์อาจจะยังไม่ถูกกระตุ้นให้ทำงานได้ดี แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป เอนไซม์อาจจะสูญเสียสภาพความเสถียรไปได้

9. แยกทิวติของเอนไซม์ที่ถูกตรึงเมื่อนำมาใช้เวลานาน

ในการศึกษาหาค่าแยกทิวติของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อทำการปรับสภาพความเป็นกรดต่างของน้ำแป้งซึ่งเป็นซับสเตรท พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 7.0 และอุณหภูมิที่ใช้ใน

การเกิดปฏิกิริยาการย่อยแบ่งให้เป็นมอลโตสที่ 50 องศาเซลเซียส มีค่าสูงที่สุด จึงจะทำการศึกษาผล แอกลิวิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงเมื่อนำมาใช้งานซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของมอลโตส ตาม ภาคผนวก ก ผลการคำนวณค่าแอกลิวิตีเมื่อใช้อีพิกลอโรไฮดรินและไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อม ประสานแสดงดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 กราฟแอกลิวิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อนำมาใช้งานซ้ำ

จากรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่าแนวโน้มของแอกลิวิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงเมื่อใช้อีพิกลอโรไฮ- ดรินและไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันซึ่งเมื่อผ่านการใช้งานไป แล้ว 3 ครั้ง แอกลิวิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงยังคงเหลืออีกร้อยละ 11.13 และ 15.08 เมื่อเทียบกับแอกลิ วิตีเริ่มต้นของเอนไซม์ที่ถูกตรึงที่ใช้งานในครั้งแรก เมื่อใช้อีพิกลอโรไฮดรินและไซยานูริกคลอไรด์เป็น ตัวเชื่อมประสานตามลำดับ

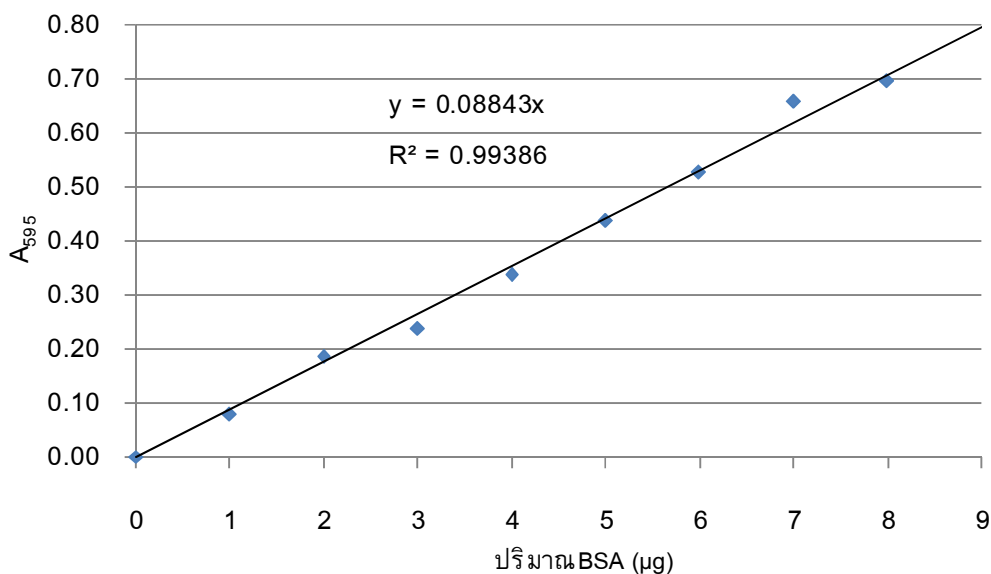
สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเราสามารถเตรียมเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตท (Cellulose acetate) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต (Electrospinning) ซึ่งใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ 15 กิโลโวลต์ ซึ่งให้ลักษณะสัณฐานวิทยาที่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็นสับสเตรทในการตรึงเอนไซม์ จากนั้นทำการเปลี่ยนเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตทเป็นเส้นใยเซลลูโลสเพื่อที่จะทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสม ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาผลของการใช้ตัวประสานระหว่างสับสเตรทกับเอนไซม์ตรึง 2 ชนิด จากการทดลองพบว่าเราสามารถตรึงแอลฟา-อะไมเลสบนแผ่นเส้นใยเซลลูโลส โดยใช้อีพิกโลโรไฮดริน (Epichlorohydrin) และไซยานูริกคลอไรด์ (Cyanuric chloride) เป็นตัวเชื่อมประสาน โดยการใชไซยานูริกคลอไรด์ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์บนแผ่นเส้นใยได้ดีกว่าอีพิกโลโรไฮดริน นอกจากนี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ มีค่าความเป็นกรดต่างที่ pH 7.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตลอดจนสามารถนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนแผ่นเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตทกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 3 ครั้ง

ภาคผนวก ก

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ก-1. ผลการสร้างกราฟมาตรฐาน BSA

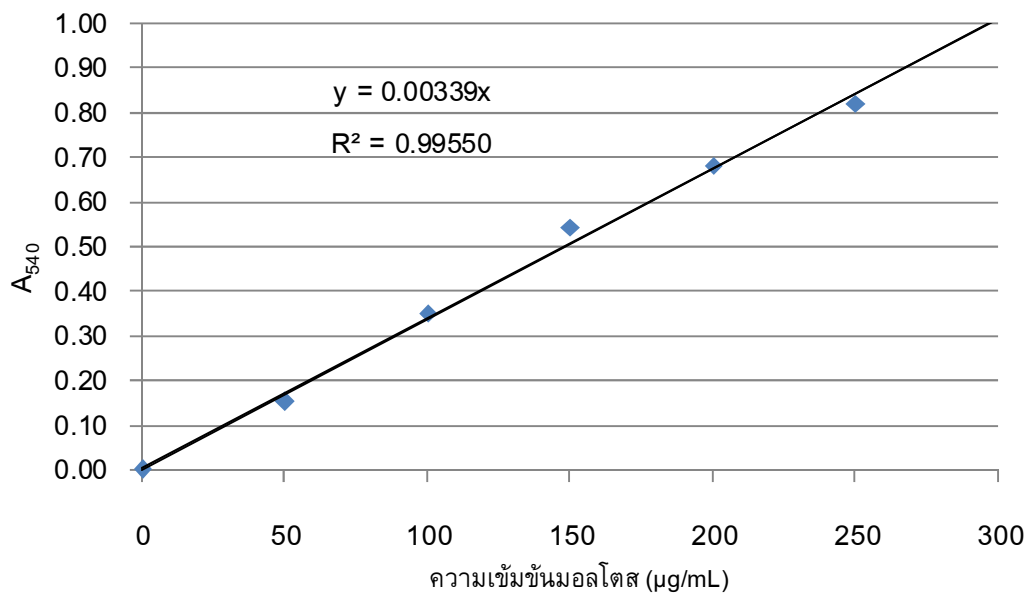


รูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐาน BSA สำหรับการวัดปริมาณโปรตีน

จากรูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐานในการวัดปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในสารละลายเอนไซม์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Bovine serum albumin (BSA, µg) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ซึ่งได้กราฟที่มีสมการเส้นตรงเป็น $y = 0.08843x$ ค่า $R^2 = 0.99386$

สำหรับการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford โดยใช้ Bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐานมีหลักการคือเป็นวิธีหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวของโปรตีนกับสีของสารละลายโปรตีนรีเอเจนต์ ซึ่งประกอบด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250 (ในสภาพที่เป็นกรด) ได้เป็นสารละลายสีน้ำเงินวิธีนี้สีที่เกิดขึ้นจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของโปรตีน

ก-2. ผลการสร้างกราฟมาตรฐานมอลโตส



รูปที่ ก-2 กราฟมาตรฐานมอลโตสสำหรับการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์

จากรูปที่ ก-2 กราฟมาตรฐานมอลโตสแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของมอลโตสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน คือ $y = 0.00339x$ ค่า $R^2 = 0.99550$

ภาคผนวก ข

ข้อมูลการทดลอง

ข-1. ผลการหาปริมาณโปรตีนก่อนตรึงของเอนไซม์ แสดงผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ ข-1 ผลการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายแอลฟา-อะไมเลส ก่อนตรึงที่ความเข้มข้น 2 mg/mL (เจือจาง 2 เท่า)

ปริมาตรของ สารละลาย แอลฟา-อะไมเลส (μL)	ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 595 นาโนเมตร	ความเข้มข้นโปรตีน (μg/μL)	โปรตีนรวม (mg)
75	0.832	0.251	2.505
50	0.552	0.250	
	ค่าเฉลี่ย	0.2505	

ข-2. ผลการหาปริมาณโปรตีนหลังตรึงของเอนไซม์โดยใช้อีพิกลอโรไฮดรินเป็นตัวเชื่อมประสาน แสดงผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ ข-2 ผลการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายแอลฟา-อะไมเลส ของแผ่นเส้นใย หลังตรึงที่ความเข้มข้น 2 mg/mL (เจือจาง 2 เท่า) และน้ำล้างแผ่นเส้นใย

แผ่นเส้นใย (แผ่นที่)	น้ำตรึงเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส				น้ำล้างแผ่นเส้นใย			
	ปริมาตร สารละลาย (μL)	ABS 595 nm	ความเข้มข้น โปรตีน (μg/μL)	โปรตีน รวม (mg)	ปริมาตร สารละลาย (μL)	ABS 595 nm	ความเข้มข้น โปรตีน (μg/μL)	โปรตีน รวม (mg)
1	75	0.609	0.184	1.730	150	0.321	0.024	0.116
	50	0.358	0.162		100	0.197	0.022	
		ค่าเฉลี่ย	0.1730			ค่าเฉลี่ย	0.0230	
2	75	0.564	0.170	1.625	150	0.333	0.025	0.112
	50	0.343	0.155		100	0.176	0.020	
		ค่าเฉลี่ย	0.1625			ค่าเฉลี่ย	0.0225	
3	75	0.585	0.176	1.640	150	0.304	0.023	0.125
	50	0.336	0.152		100	0.242	0.027	
		ค่าเฉลี่ย	0.1640			ค่าเฉลี่ย	0.0250	
		ค่าเฉลี่ยโปรตีนรวม		1.665		ค่าเฉลี่ยโปรตีนรวม		0.118

ข-3. ผลการหาปริมาณโปรตีนหลังตรึงของเอนไซม์โดยใช้ไซยาโนริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสาน แสดงผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ ข-3 ผลการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายแอลฟา-อะไมเลส ของแผ่นเส้นใย หลังตรึงที่ความเข้มข้น 2 mg/mL (เจือจาง 2 เท่า) และน้ำล้างแผ่นเส้นใย

แผ่นเส้นใย (แผ่นที่)	น้ำตรึงเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส				น้ำล้างแผ่นเส้นใย			
	ปริมาตร สารละลาย (μ L)	ABS 595 nm	ความเข้มข้น โปรตีน (μ g/ μ L)	โปรตีน รวม (mg)	ปริมาตร สารละลาย (μ L)	ABS 595 nm	ความเข้มข้น โปรตีน (μ g/ μ L)	โปรตีน รวม (mg)
1	75	0.443	0.133	1.330	300	0.450	0.017	0.084
	50	0.293	0.133		200	0.295	0.017	
		ค่าเฉลี่ย	0.133			ค่าเฉลี่ย	0.017	
2	75	0.436	0.131	1.331	300	0.354	0.013	0.072
	50	0.298	0.135		200	0.271	0.015	
		ค่าเฉลี่ย	0.133			ค่าเฉลี่ย	0.014	
3	75	0.445	0.137	1.236	300	0.424	0.016	0.074
	50	0.243	0.110		200	0.242	0.014	
		ค่าเฉลี่ย	0.1235			ค่าเฉลี่ย	0.015	
		ค่าเฉลี่ยโปรตีนรวม		1.299		ค่าเฉลี่ยโปรตีนรวม		0.077

ข-4. การคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่อยู่บนแผ่นเส้นใยเซลลูโลส

ตารางที่ ข-4 ผลของปริมาณโปรตีนที่วัดได้บนแผ่นเส้นใยเซลลูโลสโดยใช้ฟิคคลอไรด์ตรึงเป็นตัวเชื่อมประสาน

แผ่นเส้นใย	ปริมาณโปรตีนในสารละลาย (mg)			น้ำหนักเส้นใยเฉลี่ย (g)	ปริมาณโปรตีนบน เส้นใย (mg/g fiber)
	ก่อนตรึง	หลังตรึง	น้ำล้าง		
1	2.505	1.728	0.116	0.0093	77.29
2		1.626	0.112		
3		1.642	0.125		
ค่าเฉลี่ย	2.505	1.665	1.118		

ตารางที่ ข-5 ผลของปริมาณโปรตีนที่วัดได้บนแผ่นเส้นใยเซลลูโลสโดยใช้ไซยานูริกคลอไรด์ เป็นตัวเชื่อมประสาน

แผ่นเส้นใย	ปริมาณโปรตีนในสารละลาย (mg)			น้ำหนักเส้นใยเฉลี่ย (g)	ปริมาณโปรตีนบนเส้นใย (mg/g fiber)
	ก่อนตรึง	หลังตรึง	น้ำล้าง		
1	2.499	1.330	0.084	0.0093	120. 82
2		1.331	0.072		
3		1.236	0.074		
ค่าเฉลี่ย	2.499	1.299	0.077		

ข-5. ผลของ pH ต่อค่าแอกทिवิตีของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อใช้ อีพิกลอโรไฮดรินเป็นตัวเชื่อมประสาน แสดงผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ ข-6 ผลการวัดแอกทिवิตีของแอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อใช้อีพิกลอโรไฮดรินเป็นตัวเชื่อมประสาน

จุดที่ pH	1	2	ABS 540 nm เฉลี่ย	ค่าแอกทिवิตีเฉลี่ย (U/mg fiber)
	ABS 540 nm	ABS 540 nm		
5.0	0.442	0.439	0.441	5.41
6.0	0.446	0.440	0.443	5.44
7.0	0.521	0.525	0.523	6.43
8.0	0.293	0.291	0.292	3.59
9.0	0.197	0.195	0.196	2.41

ข-6. ผลของ pH ต่อค่าแอกทिवิตีของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อใช้ ไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสาน แสดงผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ ข-7 ผลการวัดแอกทिवิตีของแอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อใช้ไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสาน

ชุดที่ pH	1	2	ABS 540 nm เฉลี่ย	ค่าแอกทिवิตีเฉลี่ย (U/mg fiber)
	ABS 540 nm	ABS 540 nm		
5.0	0.442	0.348	51.33	58.26
6.0	0.446	0.351	51.77	58.78
7.0	0.521	0.377	55.60	66.22
8.0	0.293	0.300	44.25	43.73
9.0	0.197	0.290	42.77	35.91

ข-7. ผลของอุณหภูมิต่อค่าแอกทिवิตีของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อใช้อีพิกลอโรไฮดรินเป็นตัวเชื่อมประสานที่ pH=7.0 แสดงผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ ข-8 ผลการวัดแอกทिवิตีของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อใช้อีพิกลอโรไฮดรินเป็นตัวเชื่อมประสานที่ pH=7.0

ชุดที่ T (°C)	1	2	ABS 540 nm เฉลี่ย	ค่าแอกทिवิตีเฉลี่ย (U/mg fiber)
	ABS 540 nm	ABS 540 nm		
30.0	0.316	0.319	0.318	3.9
40.0	0.451	0.456	0.454	5.57
50.0	0.563	0.565	0.564	6.93
60.0	0.406	0.405	0.406	4.98
70.0	0.243	0.240	0.242	2.97

ข-8. ผลของอุณหภูมิต่อค่าแอกทिवิตีของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อใช้ไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานที่ pH=7.0 แสดงผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ ข-9 ผลการวัดแอกทिवิตีของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อใช้ไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสานที่ pH=7.0

ชุดที่ T (°C)	1	2	ABS 540 nm เฉลี่ย	ค่าแอกทिवิตีเฉลี่ย (U/mg fiber)
	ABS 540 nm	ABS 540 nm		
30.0	0.261	0.260	0.261	3.20
40.0	0.354	0.350	0.352	4.33
50.0	0.651	0.649	0.650	7.99
60.0	0.525	0.522	0.526	6.43
70.0	0.195	0.193	0.194	2.38

ข-8. ผลของการใช้ซ้ำต่อค่าแอกทिवิตีของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อใช้อีพิกคลอโรไฮไดรินเป็นตัวเชื่อมประสาน แสดงผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ ข-10 ผลการวัดแอกทिवิตีของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อใช้อีพิกคลอโรไฮไดรินเป็นตัวเชื่อมประสาน

ครั้งที่ แผ่นที่	1		2		3	
	ABS 540 nm	ABS 540 nm เฉลี่ย	ABS 540 nm	ABS 540 nm เฉลี่ย	ABS 540 nm	ABS 540 nm เฉลี่ย
1	0.535	0.533	0.238	0.240	0.067	0.059
2	0.538		0.250		0.057	
3	0.526		0.233		0.054	
	Activity (U/mg fiber)	6.55	Activity (U/mg fiber)	2.95	Activity (U/mg fiber)	0.73

ข-10. ผลของการใช้ซ้ำต่อค่าแอกทिवิตีของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อใช้ไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสาน แสดงผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ ข-11 ผลการวัดแอกทिवิตีของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงบนเส้นใยเซลลูโลสเมื่อใช้
ไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสาน

ครั้งที่ แผ่นที่	1		2		3	
	ABS 540 nm	ABS 540 nm เฉลี่ย	ABS 540 nm	ABS 540 nm เฉลี่ย	ABS 540 nm	ABS 540 nm เฉลี่ย
1	0.549	0.548	0.376	0.390	0.085	0.082
2	0.550		0.396		0.083	
3	0.546		0.398		0.080	
	Activity (U/mg fiber)	6.74	Activity (U/mg fiber)	4.79	Activity (U/mg fiber)	1.02

ภาคผนวก ค

การคำนวณปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในสารละลายเอนไซม์

ตัวอย่างดังต่อไปนี้ แสดงวิธีการคำนวณของสารละลายแอลฟา-อะไมเลส เข้มข้น 2 mg/mL

ค-1. ตัวอย่างการคำนวณปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ใน สารละลายแอลฟา-อะไมเลส ก่อนตรึง

$$\text{โปรตีน (P)} = \left(\left(\frac{A_{595}}{S} \right) \div V \right) \times D$$

กำหนดให้

$$\begin{aligned} \text{ค่าการดูดกลืนแสง (A}_{595}) &= 0.442 \\ \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน BSA (S)} &= 0.08843 \\ \text{การเจือจาง (D)} &= 2 \text{ เท่า} \\ \text{ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ (V)} &= 75 \mu\text{l} \end{aligned}$$

จากสมการข้างต้นจะได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{โปรตีน (P)} &= \left(\left(\frac{0.442}{0.08843} \mu\text{g} \right) \div 75 \mu\text{l} \right) \times 2 \\ &= 0.251 \mu\text{g}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ปริมาณโปรตีนรวมจะแทนค่าดังสมการต่อไปนี้

$$\text{น้ำหนักโปรตีนรวม} = P \times V_t$$

โดย P คือ ความเข้มข้นโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

V_t คือ ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ก่อนตรึงทั้งหมด (ml)

กำหนดให้

$$V_t = 10 \text{ ml}$$

แสดงการคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักโปรตีนรวม} &= (0.251 \mu\text{g}/\mu\text{l}) \times 10 \text{ ml} \\ &= 2.507 \text{ mg} \end{aligned}$$

ดังนั้น โปรตีนทั้งหมดในสารละลายแอลฟา-อะไมเลส ก่อนตรึง เท่ากับ 2.507 mg

ค-2. ตัวอย่างการคำนวณปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในสารละลายแอลฟา-อะไมเลส หลังตรึง

$$\text{โปรตีน (P)} = \left(\left(\frac{A_{595}}{S} \right) \div V \right) \times D$$

กำหนดให้

$$\begin{aligned}\text{ค่าการดูดกลืนแสง (A}_{595}) &= 0.609 \\ \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน BSA (S)} &= 0.08843 \\ \text{การเจือจาง (D)} &= 2 \text{ เท่า} \\ \text{ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ (V)} &= 75 \mu\text{l}\end{aligned}$$

จากสมการข้างต้นจะได้ดังนี้

$$\begin{aligned}\text{โปรตีน (P)} &= \left(\left(\frac{0.609}{0.08843} \mu\text{g} \right) \div 75 \mu\text{l} \right) \times 2 \\ &= 0.184 \mu\text{g}/\mu\text{L}\end{aligned}$$

ดังนั้น ปริมาณโปรตีนรวมจะแทนค่าดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Total protein} = P \times V_t$$

$$\begin{aligned}\text{โดย } P &\text{ คือ ความเข้มข้นโปรตีน } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \\ V_t &\text{ คือ ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์หลังตรึงทั้งหมด (ml)}\end{aligned}$$

$$\text{กำหนดให้ } V_t = 10 \text{ ml}$$

แสดงการคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned}\text{Total Protein} &= (0.184 \mu\text{g}/\mu\text{l}) \times 10 \text{ ml} \\ &= 1.836 \text{ mg}\end{aligned}$$

ดังนั้น โปรตีนทั้งหมดในสารละลายแอลฟา-อะไมเลส หลังตรึง เท่ากับ 1.836 mg

ค-3. ตัวอย่างการคำนวณปริมาณโปรตีนของ สารละลายแอลฟา-อะไมเลส ที่อยู่ในน้ำล้างแผ่นเส้นใย

$$\text{โปรตีน (P)} = \left(\left(\frac{A_{595}}{S} \right) \div V \right) \times D$$

กำหนดให้

$$\begin{aligned}\text{ค่าการดูดกลืนแสง (A}_{595}\text{)} &= 0.321 \\ \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน BSA (S)} &= 0.08843 \\ \text{การเจือจาง (D)} &= 2 \text{ เท่า} \\ \text{ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ (V)} &= 150 \mu\text{l}\end{aligned}$$

จากสมการข้างต้นจะได้ดังนี้

$$\begin{aligned}\text{โปรตีน (P)} &= \left(\left(\frac{0.321}{0.08843} \mu\text{g} \right) \div 150 \mu\text{l} \right) \times 2 \\ &= 0.024 \mu\text{g}/\mu\text{l}\end{aligned}$$

ดังนั้น ปริมาณโปรตีนรวมจะแทนค่าดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Total protein} = P \times V_t$$

โดย P คือ ความเข้มข้นโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

V_t คือ ปริมาตรของน้ำล้างแผ่นเส้นใยเซลลูโลส (ml)

กำหนดให้ $V_t = 5 \text{ ml}$

แสดงการคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned}\text{Total Protein} &= (0.024 \mu\text{g}/\mu\text{l}) \times 5 \text{ ml} \\ &= 1.121 \text{ mg}\end{aligned}$$

ดังนั้น โปรตีนทั้งหมดของสารละลายแอลฟา-อะไมเลส ที่อยู่ในน้ำล้างแผ่นเส้นใยเซลลูโลส เท่ากับ 1.121 mg

ค-4. ตัวอย่างการคำนวณปริมาณโปรตีนทั้งหมดต่อน้ำหนักแผ่นเส้นใยเซลลูโลส

$$\text{ปริมาณโปรตีนบนแผ่นเส้นใย} = (\text{โปรตีนทั้งหมดในสารละลายเอนไซม์ก่อนตรึง} - \text{โปรตีนทั้งหมดในสารละลายเอนไซม์หลังตรึง} - \text{โปรตีนทั้งหมดของสารละลายเอนไซม์ในน้ำล้างแผ่นเส้นใย}) \div \text{น้ำหนักแผ่นเส้นใยเซลลูโลส}$$

กำหนดให้

$$\text{โปรตีนทั้งหมดในสารละลายเอนไซม์ก่อนตรึง} = \text{mg}$$

$$\text{โปรตีนทั้งหมดในสารละลายเอนไซม์หลังตรึง} = \text{mg}$$

$$\text{โปรตีนทั้งหมดในน้ำล้างแผ่นเส้นใย} = \text{mg}$$

$$\text{น้ำหนักแผ่นเส้นใยเซลลูโลส} = 0.0093 \text{ g fiber}$$

แสดงการคำนวณดังต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีนบนแผ่นเส้นใย} = (\text{โปรตีนทั้งหมดในสารละลายเอนไซม์ก่อนตรึง} - \text{โปรตีนทั้งหมดในสารละลายเอนไซม์หลังตรึง} - \text{โปรตีนทั้งหมดของสารละลายเอนไซม์ในน้ำล้างแผ่นเส้นใย}) \div \text{น้ำหนักแผ่นเส้นใยเซลลูโลส}$$

$$= () \div 0.0093 \text{ g fiber}$$

ดังนั้น โปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่บนเส้นใยเซลลูโลส เท่ากับ 37.99 mg/g fiber

ภาคผนวก ง

การคำนวณแอกทिवิตีของเอนไซม์โดยใช้น้ำแบ่งเป็นขั้นตอน

ง-1. การคำนวณค่าแอกทिवิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนแผ่นเส้นใยเซลลูโลส แสดงดังสมการ ง1

$$\text{Enzyme Activity} = \frac{A \times V_t}{S \times t \times m_f} \quad (\text{ง1})$$

กำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์เท่ากับปริมาณของมอลโตส 1 มิลลิกรัม ที่ได้จากการย่อยสลายน้ำแบ่งโดยเอนไซม์ ที่สภาวะของการหาแอกทिवิตี ภายในเวลา 1 นาที

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
 V_t = ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ทั้งหมด (mL)
 S = ค่าความชันของกราฟมาตรฐานมอลโตส 0.5%
 t = เวลา (นาที)
 m_f = น้ำหนักเส้นใยเซลลูโลส (mg fiber)

ตัวอย่างการคำนวณแอกทिवิตีของสารละลายเอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลส ที่ถูกตรึงบนแผ่นเส้นใยเซลลูโลส

โดย A = 0.442
 V_t = 5 ml
 S = 0.00339
 t = 10 min
 m_f = 12 mg fiber

จากการแทนค่าลงในสมการ ง1 จะได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{Enzyme Activity} &= \left(\frac{0.442 \mu\text{g}}{0.00339 \text{ ml}} \right) \times \frac{5 \text{ ml}}{10 \text{ min} \times 12 \text{ mg fiber}} \\ &= 5.41 \text{ U/mg fiber} \end{aligned}$$

ภาคผนวก จ

อัตราส่วนในการเตรียมสารละลายสำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสงในการหาปริมาณโปรตีน

จ-1. อัตราส่วนสารละลายสำหรับการวัดปริมาณโปรตีนก่อนตรึง

ตาราง จ-1 แสดงอัตราส่วนสารละลายในการหาปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ก่อนตรึง

หลอดที่	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2
สารละลายเอนไซม์ (μl)	50	75
สารละลายบัฟเฟอร์ (μl)	350	325
Bradford Reagent (μl)	100	100

จ-2. อัตราส่วนสารละลายสำหรับการวัดปริมาณโปรตีนหลังตรึง

ตาราง จ-2 แสดงอัตราส่วนสารละลายในการหาปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส หลังตรึง

หลอดที่	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2
สารละลายเอนไซม์ (μl)	50	75
สารละลายบัฟเฟอร์ (μl)	350	325
Bradford Reagent (μl)	100	100

จ-3. อัตราส่วนสารละลายสำหรับการวัดปริมาณโปรตีนของน้ำล้างแผ่นเส้นใยหลังตรึง

ตาราง จ-3 แสดงอัตราส่วนสารละลายในการหาปริมาณโปรตีนของล้างแผ่นเส้นใยหลังตรึง เมื่อใช้ฮิพ คลอโรไฮดรินเป็นตัวเชื่อมประสาน

หลอดที่	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2
สารละลายเอนไซม์ (μl)	100	150
สารละลายบัฟเฟอร์ (μl)	300	250
Bradford Reagent (μl)	100	100

ตาราง จ-4 แสดงอัตราส่วนสารละลายในการหาปริมาณโปรตีนของล้างแผ่นเส้นใยหลังตรึง เมื่อใช้ ไซยานูริกคลอไรด์เป็นตัวเชื่อมประสาน

หลอดที่	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2
สารละลายเอนไซม์ (μl)	200	300
สารละลายบัฟเฟอร์ (μl)	200	100
Bradford Reagent (μl)	100	100