



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนโครงการเร่งด่วนและสนับสนุนโครงการใหม่เพื่อพัฒนางานวิจัยพื้นฐาน (นำร่อง)

รายงานผลการวิจัย


เรื่อง

การตรึงเอ็นไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนเม็ดโพลีอะคริลาไมด์และ
โพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)โดยวิธีอินเวอร์สซัพเพนชันโพลีเมอไรเซชัน

โดย

ผศ. นภา ศิวรังสรรค์
รศ. ดร. สุกดา เกียรติกำจรวงศ์

ธันวาคม 2540



ศาสตราจารย์พิเศษ
ผู้ทำผลงานดีเด่น
มอบให้หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
11 / ๗.๖. / ๒๕๔๒

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย

การตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)โดยวิธีอินเวอร์สซัสเพนชันโพลีเมโรเซชัน

ชื่อผู้วิจัย

ผศ. นภา ศิวรังสรรค์

รศ.ดร.สุดา เกียรติกำจรวงศ์



เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ ธันวาคม 2540

บทคัดย่อ

แอลคาไลน์โปรตีเอสได้รับการตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์ระหว่างการทำโพลีเมโรเซชันของโมโนเมอร์อะคริลาไมด์โดยวิธีอินเวอร์สซัสเพนชันโพลีเมโรเซชัน, N,N'-methylene-bis-acrylamide(MBA), Pluronic PE 8100, และพาราฟินเหลว ใช้เป็นตัวเชื่อมขวาง เซอร์เฟคแตนต์ และวิฏภาคต่อเนื่อง ตามลำดับ แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (APS) และ N,N,N',N'-tetraethylmethylenediamine (TEMED) ใช้เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยาแบบรีดอกซ์ ได้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโมโนเมอร์ตัวเชื่อมขวาง เอนไซม์ ตัวเริ่มปฏิกิริยา ตัวเร่งปฏิกิริยา และเซอร์เฟคแตนต์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวน เวลา และอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการโพลีเมโรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์อีกด้วย ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีดโดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรต การทดลองได้สรุปผลของพารามิเตอร์แต่ละตัวเพื่อเลือกภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการทำโพลีเมโรเซชันเพื่อตรึงแอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์ให้มีฤทธิ์สูงสุด ภาวะที่สามารถตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสให้มีฤทธิ์สูงสุดประกอบด้วยอะคริลาไมด์ (3.14 มิลลิโมลาร์), MBA (15 มิลลิโมลาร์), แอลคาไลน์โปรตีเอส (1.5 มิลลิกรัม/ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร), APS (6.5 มิลลิโมลาร์), TEMED (47.75 มิลลิโมลาร์), อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที เวลาสำหรับการโพลีเมโรเซชัน 2 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 30°C. ฤทธิ์ของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 178 ยูนิต สามารถตรึงเอนไซม์ได้ร้อยละ 42 และมีค่าคอนเวอร์ชันร้อยละ 92 ได้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอะคริลาไมด์และกรดเมทาคริลิกที่ 100/0, 97.5/2.5, 95/5, 90/10 ร้อยละโดยน้ำหนักต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ ฤทธิ์ของเอนไซม์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดเมทาคริลิกเพิ่มขึ้น เปรียบเทียบการดูดซึมในน้ำและในสารละลายเกลือของโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) การดูดซึมน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดเมทาคริลิก การดูดซึมในสารละลายเกลือต่ำกว่าการดูดซึมในน้ำ เปรียบเทียบปรากฏการณ์ของความคงทนต่อความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึง เอนไซม์ที่ไม่ได้รับและได้รับการตรึงให้ฤทธิ์ของเอนไซม์สูงสุดที่ความเป็นกรด-เบส 10 และ 10.5 ที่อุณหภูมิเดียวกัน 45°C. ตามลำดับ เอนไซม์ที่ไม่ได้รับและที่ได้รับการตรึงสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิ -20 ถึง 4°C. เป็นเวลาหนึ่งเดือน โดยไม่มีการสูญเสียฤทธิ์ของเอนไซม์ ฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงลดลงร้อยละ 51 โดยที่ฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)ลดลงร้อยละ 37 และร้อยละ 42 ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์ทั้งสองที่อุณหภูมิ 60°C. เป็นเวลาหนึ่งเดือน ที่อุณหภูมิสูงเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงมีเสถียรภาพสูงกว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงและเก็บได้นานกว่า



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

542.4

๘ 1960

Project Title: Immobilization of alkaline protease on polyacrylamide and poly(acrylamide-co-methacrylic acid) by inverse suspension polymerization

Investigator: Assistant Professor Napa Siwarungson
Associate Professor Suda Kiatkamjornwong Ph.D.

Date of Research Completion: December 1997

ABSTRACT

The alkaline protease was entrapped during inverse suspension polymerization of acrylamide monomer. N,N' -methylene-bis-acrylamide (MBA), Pluronic PE 8100, and paraffin wax were utilized as a crosslinker, surfactant, and continuous phase, respectively. Ammonium persulfate (APS) and N,N,N',N' -tetraethylmethylenediamine (TEMED) were used as the redox initiator. The effects of concentration of monomer, crosslinker, enzyme, initiator, accelerator, and surfactant on enzymatic activity were investigated. The effects of stirring rate, polymerization time, and temperature on enzymatic activity of the product were also carried out. The effects of each parameter were established for the best polymerization conditions for entrapment of the alkaline protease for the optimum enzymatic activity. The enzymatic activity was determined using casein as a substrate. Conditions that showed the optimum enzymatic activity were: acrylamide (3.14 mM), MBA (15 mM), alkaline protease (1.5 mg/5 cm³), APS (6.5 mM), TEMED (47.75 mM), at stirring rate of 300 rpm, polymerization time 2 h, and temperature 30°C. The enzymatic activity was 178 units, with 42% immobilization and 92% conversion. The effect of acrylamide/methacrylic acid ratios (100/0, 97.5/2.5, 95/5, 90/10% W/W) on the enzymatic activity were investigated. The enzymatic activity was decreased with increasing the methacrylic acid concentration. The water absorptions of polyacrylamide and poly(acrylamide-co-methacrylic acid) in deionized water and saline solutions was also carried out for comparison. The water absorption was increased with increasing methacrylic acid concentration while the absorption in saline solutions was lower than that in deionized water. The effects of pH and temperature on enzymatic activity of free- and immobilized enzyme were compared. The maximum enzymatic activity of free- and immobilized enzymes was shown at pH 10 and 10.5 at the same temperature of 45°C, respectively. The free- and immobilized enzymes kept at temperatures -20 to 4°C for one month were stable and without loss of enzymatic activity. The enzymatic activity of the free enzyme was decreased by 51%, while the enzymatic activities of immobilized enzyme on polyacrylamide and poly(acrylamide-co-methacrylic acid) were decreased by 37% and 42%, respectively after an one month storage at 60°C. At higher temperatures, the immobilized enzyme was thermally stable for a longer shelf life than the free enzyme.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณโครงการเร่งด่วนและสนับสนุนโครงการใหม่เพื่อพัฒนางานวิจัยพื้นฐาน (นำร่อง) ที่ให้ทุนสนับสนุนเงินทุนวิจัยนี้ ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางภาพถ่ายและเทคโนโลยีทางการพิมพ์ที่กรุณาให้ใช้สถานที่ในการสังเคราะห์และทดสอบเม็ดโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ รวมทั้งภาควิชาชีวเคมีที่ให้ใช้สถานที่ในการวิเคราะห์ผลทางด้านชีวเคมี ห้ายสุดใคร่ขอขอบคุณ คุณอารีรัตน์ งามบุญศรี ที่เป็นผู้ช่วยวิจัยในโครงการนี้



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ(ภาษาไทย).....	ii
บทคัดย่อ(ภาษาอังกฤษ).....	iii
กิตติกรรมประกาศ.....	iv
สารบัญตาราง.....	xi
สารบัญรูป.....	xiv
อักษรย่อ.....	xvii
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 บทนำ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ของงานวิจัย.....	4
1.5 แผนผังการทดลองงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 วารสารปริทรรศน์.....	6
2.1 การตรึง.....	6
2.1.1 วิธีการตรึง.....	6
2.1.1.1 การดูดซับบน inert support หรือ ion exchange resins.....	6
2.1.1.2 การตรึงบนเจลที่มีตัวเชื่อมขวางหรือโดยวิธี encapsulation ใน microcapsule, hollow fibers, liposomes และ ไฟเบอร์.....	6
2.1.1.3 วิธีเชื่อมขวาง (crosslinking) โดยใช้สารที่มีหมู่ฟังก์ชันสองหรือมากกว่า.....	9
2.1.1.4 การตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์กับโพลิเมอร์.....	9

หน้า

2.2 โปรตีเอส	10
2.2.1 Acid Protease	10
2.2.2 Metallo Protease	10
2.2.3 Thiol Protease	10
2.2.4 Serine Protease	10
2.2.4.1 Subtilisin Carlsberg	11
2.2.4.2 Subtilisin Novo	11
2.2.4.3 Proteases from <i>Alkalophilic Bacillus Species</i>	11
2.3 โพลีอะคริลาไมด์	12
2.3.1 อะคริลาไมด์โมโนเมอร์	12
2.3.2 โพลีเมอไรเซชันของอะคริลาไมด์	12
2.3.3 โคโพลิเมอร์	13
2.3.4 สมบัติของโพลีอะคริลาไมด์	14
2.3.5 การนำไปใช้งาน	15
2.4 คำนิยามและสูตรการคำนวณ	15
2.4.1 ฤทธิ์ของเอนไซม์	15
2.4.2 เปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชัน	16
2.4.3 เปอร์เซ็นต์การตรึงเอนไซม์	17
2.4.4 การดูดซึมน้ำ	18
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	19
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์	19
3.1.1 สารเคมี	19
3.1.2 อุปกรณ์	20

3.2 วิธีการทดลอง	21
3.2.1 โฮโมโพลิเมอร์ไอโซไซยานูเรทและการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส.....	21
3.2.1.1 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นโมโนเมอร์ ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	21
3.2.1.2 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเอนไซม์ ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	21
3.2.1.3 ผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	22
3.2.1.4 ผลของการเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการโพลิเมอร์ไอโซไซยานูเรท ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	22
3.2.1.5 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการทำโพลิเมอร์ไอโซไซยานูเรท ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	22
3.2.1.6 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นตัวเริ่มปฏิกิริยา ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	22
3.2.1.7 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยา ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	23
3.2.1.8 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเชื่อมขวาง ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	23
3.2.1.9 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซอร์เฟคแตนต์ ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	23
3.2.1.10 ผลของการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนระหว่างอะคริลาไมด์ และกรดเมทาคริลิกต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	24
3.2.2 พิสูจน์หมู่ฟังก์ชันด้วย FT-IR	24
3.2.3 ศึกษาค่า glass transition temperature (T_g).....	24

หน้า

3.2.4	วิธีการทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์	24
3.2.4.1	การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์และกราฟมาตรฐานไทโรซีน.....	24
3.2.4.2	การทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์.....	27
3.2.4.2.1	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบส	
	ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	28
3.2.4.2.2	ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	28
3.2.4.2.3	ผลของการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของเอนไซม์	
	ต่อการย่อยโปรตีน	28
3.2.1.2.4	ผลของการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	
	ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	28
3.2.5	ทดสอบจำนวนครั้งการล้างบิดเพื่อกำจัดพาราฟินแวกซ์	
	และเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง.....	29
3.2.6	ทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ภายหลังการชะล้างบิด.....	29
3.2.7	ทดสอบเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชัน.....	29
3.2.7.1	โดยการชั่งน้ำหนักโพลีเมอร์ที่ได้.....	29
3.2.7.2	โดยการทดสอบโมโนเมอร์ที่เหลือในเวลาต่าง ๆ.....	29
3.2.8	คำนวณเปอร์เซ็นต์การตรึงเอนไซม์.....	30
3.2.9	ทดสอบการดูดซึมน้ำ	30
3.2.9.1	ในน้ำกลั่น.....	30
3.2.9.2	ในสารละลายเกลือ	31
3.2.9.3	ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการดูดซึมน้ำ	31
3.2.10	ศึกษาลักษณะพื้นผิวและรูปร่างของโพลีเมอร์	31
3.2.11	การย้อมสีโปรตีน.....	31

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
4.1 พิสูจน์หมู่ฟังก์ชันด้วย FT-IR สเปกโทรสโคปี	32
4.2 ค่า glass transition temperature (T_g).....	32
4.3 ทดสอบจำนวนครั้งในการล้างบีตเพื่อกำจัดพาราฟินแวกซ์และเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง	37
4.4 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นโมโนเมอร์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	39
4.5 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเอนไซม์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	42
4.6 ผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	45
4.7 ผลของการเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการโพลิเมอไรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	47
4.7.1 ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน	47
4.7.2 ต่อเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันและการเกิดบีตเมื่อเวลาเปลี่ยนไป	50
4.8 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการโพลิเมอไรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	54
4.9 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเชื่อมขวางต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	57
4.10 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเริ่มปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	61
4.11 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นตัวเร่งปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	64
4.12 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซอร์เฟคแตนต์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	67
4.13 ผลของการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนระหว่างอะครีลาไมด์/กรดเมทาคริลิก ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	70
4.14 การดูดซึมน้ำ.....	73
4.14.1 ในน้ำกลั่นและสารละลายเกลือ	73
4.14.2 ผลของอุณหภูมิต่อการดูดซึมน้ำ	75
4.15 การย้อมสีโปรตีน.....	77
4.16 ผลของการย่อยโปรตีน.....	79
4.17 ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ที่อยู่บนบีตภายหลังการชะล้าง	80

หน้า

4.18 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	81
4.19 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	83
4.20 ผลของการเก็บรักษาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	85
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	88
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	88
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	89
เอกสารอ้างอิง.....	90
ภาคผนวก 1 DSC เทอร์โมแกรม.....	96
ภาคผนวก 2 กราฟมาตรฐานของอะคริลาไมด์และ HPLC โครมาโตรแกรม.....	98
ภาคผนวก 3 กราฟมาตรฐานไทโรซีน.....	104

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1	คุณสมบัติทางกายภาพของอะคริลาไมด์..... 12
ตารางที่ 2.2	คุณสมบัติทางกายภาพของกรดเมทาคริลิก 14
ตารางที่ 2.3	คุณสมบัติทางกายภาพของโพลีอะคริลาไมด์..... 15
ตารางที่ 4.1	ฤทธิ์ของเอนไซม์ต่อจำนวนครั้งที่ล้าง 38
ตารางที่ 4.2	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นอะคริลาไมด์โมโนเมอร์ ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงและเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน สำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์..... 39
ตารางที่ 4.3	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเอนไซม์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์ 42
ตารางที่ 4.4	ผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์ 45
ตารางที่ 4.5	ผลของการเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการโพลีเมอไรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์ 48
ตารางที่ 4.6	ผลของคอนเวอร์ชันต่อเวลาที่ใช้ในการโพลีเมอไรเซชันโพลีอะคริลาไมด์ 50
ตารางที่ 4.7	ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการโพลีเมอไรเซชัน ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน สำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์..... 55

ตารางที่ 4.8	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นตัวเชื่อมขวางต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์	58
ตารางที่ 4.9	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเริ่มปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงและเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์.....	61
ตารางที่ 4.10	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยา ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน สำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์.....	64
ตารางที่ 4.11	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเซอร์เฟคเตนต์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงและเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์.....	67
ตารางที่ 4.12	ผลของการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอะคริลาไมด์/กรดเมทาคริลิก ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน สำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์ และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก).....	70
ตารางที่ 4.13	การดูดซึมน้ำของโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ในน้ำกลั่นและสารละลายเกลือ	73
ตารางที่ 4.14	ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการดูดซึมน้ำของโพลีอะคริลาไมด์ และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก).....	75
ตารางที่ 4.15	ผลของการย่อยโปรตีนต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึง.....	80
ตารางที่ 4.16	ผลของการล้างบีดหลาย ๆ ครั้งต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	81
ตารางที่ 4.17	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	82

หน้า

ตารางที่ 4.18 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	84
ตารางที่ 4.19 ผลของการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์.....	86



สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1	แผนผังการทดลองของงานวิจัย	5
รูปที่ 2.1	ปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชันของโพลีอะคริลาไมด์.....	7
รูปที่ 4.1	FT-IR สเปกตรัมของโพลีอะคริลาไมด์.....	33
รูปที่ 4.2	FT-IR สเปกตรัมของโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก).....	34
รูปที่ 4.3	DSC เทอร์โมแกรมของโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)	36
รูปที่ 4.4	ปฏิกิริยา imidization ของโพลีอะคริลาไมด์.....	37
รูปที่ 4.5	ฤทธิ์ของเอนไซม์ต่อจำนวนครั้งที่ล้าง	38
รูปที่ 4.6	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นอะคริลาไมด์โมโนเมอร์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึง เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์.....	40
รูปที่ 4.7	ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ต่าง ๆ กัน.....	41
รูปที่ 4.8	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึง เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์.....	43
รูปที่ 4.9	ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีเอสต่าง ๆ กัน.....	44
รูปที่ 4.10	ผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึง เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์.....	46
รูปที่ 4.11	ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่อัตราการกวนต่าง ๆ กัน	47

รูปที่ 4.12	ผลของการเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการโพลิเมอไรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึง เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลิอะคริลาไมด์.....	48
รูปที่ 4.13	ภาพ SEM ของโพลิอะคริลาไมด์ที่เวลาในการโพลิเมอไรเซชันต่าง ๆ กัน.....	49
รูปที่ 4.14	ผลของคอนเวอร์ชันต่อเวลาที่ใช้ในการโพลิเมอไรเซชันโพลิอะคริลาไมด์.....	51
รูปที่ 4.15	ภาพ SEM ของการเกิดบีดที่เวลาต่าง ๆ กัน.....	52
รูปที่ 4.16	ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการโพลิเมอไรเซชัน ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน สำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลิอะคริลาไมด์.....	55
รูปที่ 4.17	ภาพ SEM ของโพลิอะคริลาไมด์ที่อุณหภูมิที่ใช้ในการโพลิเมอไรเซชันต่าง ๆ กัน.....	56
รูปที่ 4.18	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นตัวเชื่อมขวางต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึง เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลิอะคริลาไมด์.....	58
รูปที่ 4.19	ภาพ SEM ของโพลิอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นของตัวเชื่อมขวางต่าง ๆ กัน.....	59
รูปที่ 4.20	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเริ่มปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึง เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลิอะคริลาไมด์.....	62
รูปที่ 4.21	ภาพ SEM ของโพลิอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นของตัวเริ่มปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน.....	63
รูปที่ 4.22	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึง เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลิอะคริลาไมด์.....	65
รูปที่ 4.23	ภาพ SEM ของโพลิอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน.....	66

รูปที่ 4.24	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซอร์เฟคเตนต์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึง เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์.....	68
รูปที่ 4.25	ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นของเซอร์เฟคเตนต์ต่าง ๆ กัน.....	69
รูปที่ 4.26	ผลของการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอะคริลาไมด์/กรดเมทาคริลิก ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน สำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์.....	71
รูปที่ 4.27	ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก).....	72
รูปที่ 4.28	การดูดซึมน้ำของโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ในน้ำกลั่นและสารละลายเกลือ	74
รูปที่ 4.29	ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการดูดซึมน้ำของโพลีอะคริลาไม์ และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก).....	76
รูปที่ 4.30	การย้อมสีโปรตีนบนบีดโพลีอะคริลาไมด์	78
รูปที่ 4.31	การย้อมสีโปรตีนบนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)	78
รูปที่ 4.32	ผลของการล้างบีดหลาย ๆ ครั้งต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	81
รูปที่ 4.33	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	83
รูปที่ 4.34	ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อฤทธิ์ของเอนไซม์	84

อักษรย่อ

AM	อะคริลาไมด์
MAA	กรดเมทาคริลิก
MBA	N,N'-methylene-bis-acrylamide
TEMED	N,N,N',N'-tetraethylmethylenediamine
APS	แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต
TCA	กรดไตรคลอโรอะซิติก
SEM	Scanning Electron Microscope
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectrophotometer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
g	กรัม
%	เปอร์เซ็นต์
mM	มิลลิโมลาร์
rpm	รอบต่อนาที
cm ⁻¹	wavenumber
nm	nanometer
T _g	glass transition temperature
ซม. ³	ลูกบาศก์เซนติเมตร
°ซ.	องศาเซนเซียส



บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำ

การตรึงเอนไซม์บนตัวพุง (support) ต่าง ๆ ได้รับความสนใจเป็นเวลานาน โดยเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1953 เมื่อ Grubhofer และ Schleith ตรึงเอนไซม์ carboxypeptidase, diatase, pepsin, และ ribonuclease ด้วย diazotized poly(p-aminostyrene) การตรึงเอนไซม์มีประโยชน์กว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงหลายประการด้วยกันคือ เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงมีเสถียรภาพดีกว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง สามารถทนต่ออุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง และตัวยับยั้งต่าง ๆ ได้ [1] เอนไซม์สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด และสามารถกำหนดรูปร่างของตัวพุงที่ตรึงเอนไซม์ ซึ่งสะดวกต่อการนำไปใช้งาน

โปรตีนเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลสโปรตีน ซึ่งผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลชีพ โปรตีนที่มีบทบาทสำคัญที่สุดคือ โปรตีนที่ได้จากจุลชีพ จุลชีพที่สามารถผลิตโปรตีนได้มีทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย โปรตีนเอนไซม์ที่เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทมากในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง เส้นใย ทอผ้า กระดาษ และอุตสาหกรรมผงซักฟอก [2] เป็นต้น จะเห็นได้ว่าการใช้ประโยชน์ของโปรตีนเอนไซม์ในอุตสาหกรรมมีอย่างกว้างขวาง งานวิจัยนี้จึงเล็งเห็นความสำคัญที่จะรักษาฤทธิ์และเพิ่มเสถียรภาพของโปรตีนเอนไซม์ให้มากยิ่งขึ้น ทำให้เกิดแนวคิดที่จะทำการตรึงโปรตีนเอนไซม์บนโพลีเมอร์เจลขึ้น โดยทำการตรึงเอนไซม์โปรตีนเอนไซม์โพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) เนื่องจากว่าอะคริลาไมด์โมโนเมอร์เป็นสารเคมีที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพง ละลายในน้ำได้ นอกจากนี้อะคริลาไมด์สามารถโคโพลิเมอไรเซชันกับโมโนเมอร์อื่น ๆ ได้ เช่นกรดอะคริลิก กรดเมทาคริลิก กรดสไตรีนซัลโฟนิค (styrenesulfonic acid) เป็นต้น โพลีเมอร์กลุ่มอะคริลาไมด์และอนุพันธ์อะคริลาไมด์จัดเป็นวัสดุที่สามารถละลายน้ำได้ มีราคาไม่แพง หาได้ง่าย และมีประโยชน์การใช้งานอย่างกว้างขวาง เช่น สารตกตะกอน (flocculating agent) สารที่ทำให้เกิดเจล (gelling agent) และสารลดแรงเสียดสีไฮดรอลิก (hydraulic-friction reducing agents) [3] การสังเคราะห์กลุ่มของโพลีอะคริลาไมด์นิยมสังเคราะห์โดยวิธีแรดิคัลโพลีเมอไรเซชัน ซึ่งมีหลายวิธีได้แก่ แบบสารละลาย,

อินเวิร์สอิมัลชัน และอินเวิร์สซัสเพนชัน [4] งานวิจัยนี้สังเคราะห์โพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) โดยวิธีอินเวิร์สซัสเพนชันโพลีเมอไรเซชันและตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดระหว่างการทำโพลีเมอไรเซชัน

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาการสังเคราะห์บีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) สำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดยวิธีอินเวิร์สซัสเพนชันโพลีเมอไรเซชัน

1.2.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)โดยวิธีอินเวิร์สซัสเพนชันโพลีเมอไรเซชัน

1.2.3 เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 คำนวณงานวิจัย

1.3.2 ทำการทดลอง

1.3.2.1 สังเคราะห์และตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์โดยวิธีอินเวิร์สซัสเพนชันโพลีเมอไรเซชัน โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวแปรต่าง ๆ เพื่อหาภาวะที่ดีที่สุดที่สามารถตรึงเอนไซม์ให้มีฤทธิ์สูงสุด

ก) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ 3-9 มิลลิโมลาร์

ข) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.25-5 มิลลิโมลาร์

ค) ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนระหว่างโพลีเมอไรเซชัน 100-

400 รอบต่อนาที

ง) ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการทำโพลีเมอไรเซชัน 1-4 ชม.

จ) ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการทำโพลีเมอไรเซชันที่

0-40°C

๑) ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงตัวเริ่มปฏิกิริยา (ammonium persulfate)

3-13 มิลลิโมลาร์

ข) ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยา (N,N,N',N'-tetraethylmethylenediamine) ที่ 47-192 มิลลิโมลาร์

ช) ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเชื่อมขวาง (N,N'-methylene-bis-acrylamide, MBA) ที่ 15-120 มิลลิโมลาร์

ฅ) ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซอร์เฟกเตนต์ (Pluronic PE 8100) ที่ 5-22 มิลลิโมลาร์

ฉ) ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนอะคริลาไมด์และกรดเมทาคริลิกที่ 100/0, 97.5/2.5, 95/5 และ 90/10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

1.3.2.2 พิสูจน์หมู่ฟังก์ชันทางสเปกโทรสโคปีของโพลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง

FT-IR spectrophotometer

1.3.2.3 ตรวจสอบค่า T_g (glass transition temperature) ของโพลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC)

1.3.2.4 ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึง เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน ภาวะที่สามารถตรึงเอนไซม์ได้สูงสุดบนบีดโพลิอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) จะเป็นตัวแทนสำหรับทดสอบการย่อยโปรตีน ความคงทนต่อความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึง

1.3.2.5 ทดสอบความสามารถในการดูดซึมน้ำของโพลิอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) เปรียบเทียบระหว่างในน้ำกลั่นและในสารละลายเกลือ

1.3.2.6 ศึกษารูปร่าง ลักษณะพื้นผิว ขนาดของบีดที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง scanning electron microscope (SEM)

1.3.2.7 ตรวจสอบว่าภาวะการตรึงเอนไซม์บนบีดโพลิเมอร์ได้หรือไม่โดยการย้อมสี

เอนไซม์

1.3.3 บันทึกผลการทดลอง วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

1.3.4 นำเสนอรายงานการวิจัย

1.4 ประโยชน์ของงานวิจัย

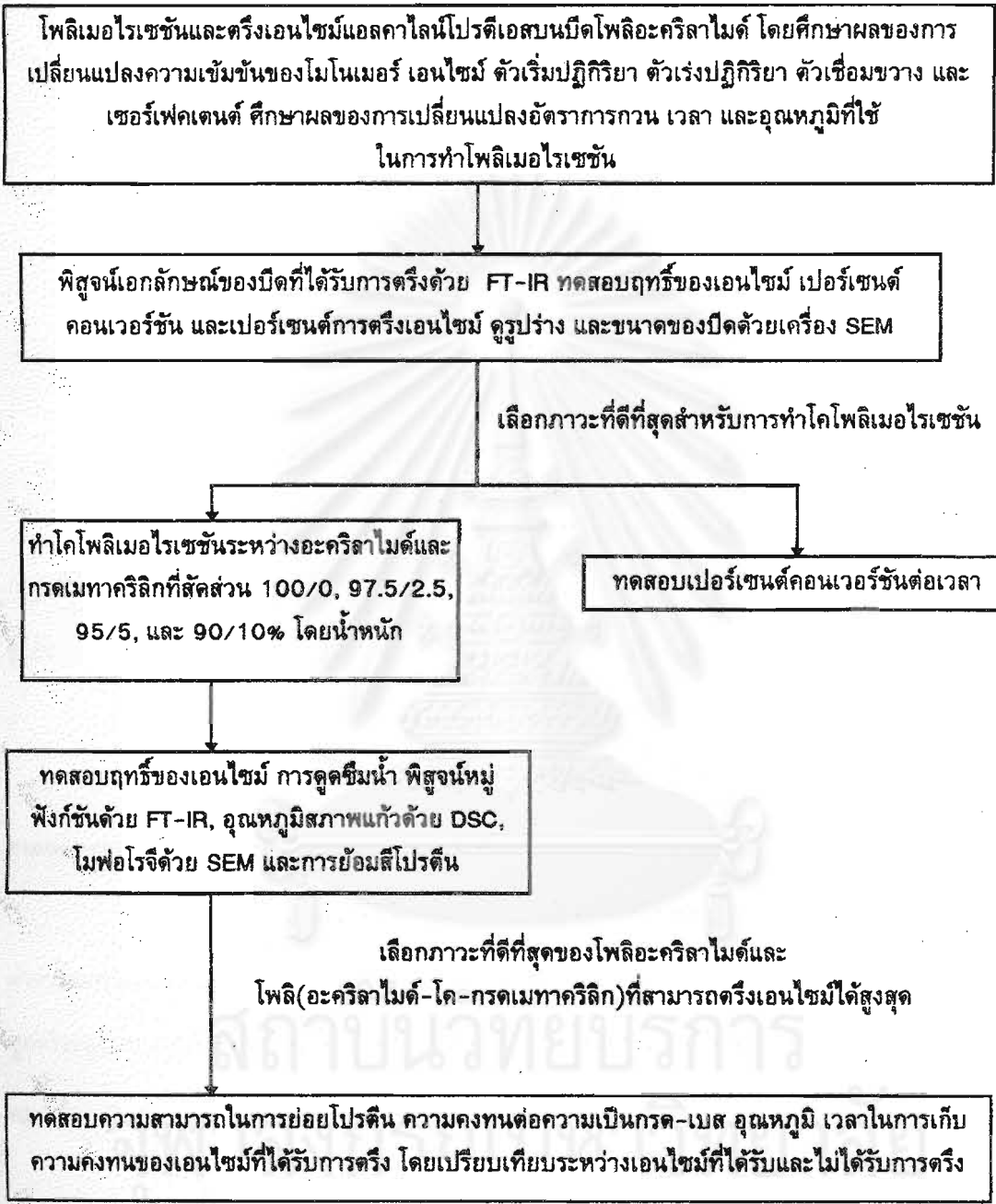
1.4.1 สามารถนำโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ การบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้รับการตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)ยังสามารถนำไปใช้งานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น อุตสาหกรรมผงซักฟอก การปรับปรุงคุณภาพของยางโดยการกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออก

1.4.2 เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) มีเสถียรภาพมากกว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง ซึ่งมีผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพการใช้งานในภาวะต่าง ๆ

1.5 แผนผังการทดลองงานวิจัย

รูปที่ 1.1 แสดงแผนผังการทดลองทั้งหมดของงานวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.1 แผนผังการทดลองของงานวิจัย

บทที่ 2

วารสารปริทรรศน์

2.1 การตรึง (Immobilization)

2.1.1 วิธีการตรึง (Methods of Immobilization)

2.1.1.1 การดูดซับบน inner support หรือ ion exchange resins

การดูดซับ (adsorption) ของเอนไซม์กระทำได้อัตโนมัติโดยนำสารละลายเอนไซม์สัมผัสกับผิวของตัวพอง (support) โดยวิธี physical, ionic และ biospecifics adsorption ตัวอย่างงานวิจัยนี้สามารถดูได้จากการรวมรวมงานวิจัยต่าง ๆ ของ Johnson [6]

2.1.1.2 การตรึงบนเจลที่มีตัวเชื่อมขวาง หรือโดยวิธี encapsulation ใน

microcapsules, hollow fibers, liposomes และ fiber

การตรึงวิธีนี้มีหลักการว่าเอนไซม์อยู่ในโครงสร้างที่แน่นพอที่จะยึดให้เอนไซม์ไม่สามารถแพร่ผ่านออกภายนอกตัวกลาง (medium) ได้ แต่สับสเตรตสามารถผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ เอนไซม์ถูกตรึงอยู่ในช่องว่างของโพลิเมอร์ที่มีตัวเชื่อมขวางอยู่ด้วย โพลิเมอร์เจลได้แก่ polysaccharides, alginate, agar และ K-carragenen การตรึงเอนไซม์หรือ biocatalyst โดยวิธีนี้สามารถแบ่งได้ดังนี้

Lattice type : biocatalyst ถูกตรึงในเจลที่เตรียมได้จาก polysaccharides, protein หรือ synthetic polymer

Microcapsule type : biocatalyst ถูกตรึงใน microcapsules ของ semipermeable synthetic polymer

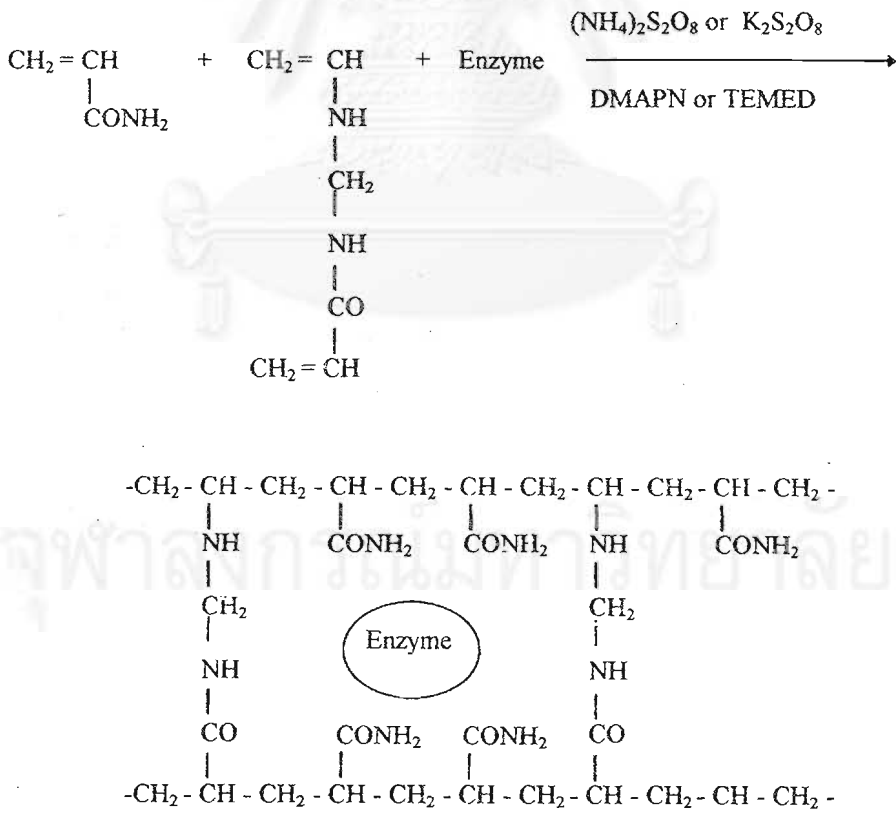
Liposome type : biocatalyst ถูกตรึงใน liquid membranes ที่เตรียมได้จาก phospholipid

Hollow-fiber type : biocatalyst แยกจากภายนอกโดย hollow fiber

Membrane type : biocatalyst แยกออกสารละลายที่ทำปฏิกิริยาโดยใช้ ultrafiltration membrane

ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถใช้ตรึงเอนไซม์และเซลล์ได้ ข้อเสียคือสัปดาห์ที่มิ น้ำหนักโมเลกุลสูงผ่านเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึงได้ลำบาก นอกจากนี้ตัวพองเองไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก ตัวอย่างของงานวิจัยมีดังต่อไปนี้

Bernfeld และ Wan [7] ตรึงเอนไซม์ trypsin, papain, amylase และ ribonuclease ในโพลีอะคริลาไมด์ โดยผสม(acrylamide, AM) , N,N'-methylene-bis-acrylamide(MBA) และเอนไซม์ ใช้ โพลเทสเซียมเพอร์ซัลเฟตและแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตเป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา ใช้ 3-dimethylaminopropionitrile (DMAPN) หรือ N,N,N',N'-tetraethylmethylenediamine(TEMED) เป็น ตัวเร่งปฏิกิริยา (accelerator) กลไกปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชันของโพลีอะคริลาไมด์

Harrison และ Flint [8] ใช้เอนไซม์ neutral phosphatase ที่ตรึงบนโพลีอะคริลาไมด์สำหรับตรวจจับ oxyanion ในน้ำในแม่เนื้อ ทดสอบฤทธิ์ของ phosphatase โดยวิธี colorimetric ของสับสเตรต p-nitrophenyl phosphate (p-NPP)

Park และ Hoffman [9] ตรึง *Arthrobacter simplex* cell ซึ่งเปลี่ยน steroid hydrocortisone เป็น prednisolone ใน poly(N-isopropyl acrylamide) และ poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) โดยวิธีอินเวิร์สซัสเพนชันโพลีเมอไรเซชัน ขนาดของบีดที่ได้หลังจากทำ lyophilize มีขนาด 150 ถึง 300 μm

Chibata, Tosa และ Sato [10] ประสบความสำเร็จในการผลิตกรด L-aspartic จาก ammonium fumarate โดยการตรึงเซลล์ *Escherichia coli* ที่มี aspartase ที่มีฤทธิ์สูงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล

Hulst และคณะ [11] ตรึงยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) และเซลล์พืช (*Haplopappus gracilis*) ใน calcium alginate โดยเปรียบเทียบการผลิตแบบทั่วไปกับแบบขยายส่วน

Moreno และ Fagain [12] ตรึง alanine aminotransferase (ALT) ใน calcium alginate, alginate ALT ใช้เป็น biosensor สำหรับตรวจสอบกรดแลคติกและเป็น diagnostic marker ผลปรากฏว่าเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงทนความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้ตรึง เอนไซม์ทั้งที่ตรึงและไม่ได้รับการตรึงให้ฤทธิ์สูงสุดที่ pH 7.5

Yamamoto, Tosa และ Chibata [13] ผลิต L-Alanine จากกรด L-aspartic โดยการตรึงเซลล์ *Pseudomonas dacuhae* บน K-carrageenan วิธีการผลิตนี้ใช้เป็นเชิงการค้าใน ปี ค.ศ. 1982 โดยบริษัท Tanabe Selyaku ประเทศญี่ปุ่น

Mosbach และ Nillson [14] ตรึง biocatalyst หลายชนิด เช่นเซลล์สัตว์, เซลล์พืช, แบคทีเรีย, สาหร่าย หรือ ราในโพลีเมอร์บีด เป็นต้น โดยวิธี encapsulation

2.1.1.3 วิธีเชื่อมขวาง (Crosslinking) โดยใช้สารที่มีหมู่ฟังก์ชันสองหรือมากกว่า

(Bi- or multi-functional reagents)

สารที่มีหมู่ฟังก์ชันสองหรือมากกว่าได้แก่ glutaraldehyde, อนุพันธ์ของ toluene diazobenzidine ซึ่งใช้เป็นตัวเชื่อมขวาง ข้อเสียของวิธีนี้คือควบคุมปฏิกิริยาได้ยาก ฤทธิ์ของเอนไซม์โดยทั่วไปจะต่ำ

2.1.1.4 การตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์กับโพลิเมอร์ (Covalent Binding to Polymer

Support)

การเลือกวิธีนี้ต้องพิจารณาถึง (ก) ชนิดฟังก์ชันของโปรตีนที่เชื่อมพันธะโควาเลนต์กับตัวพอง (support) (ข) คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของตัวพองต้องมีหมู่ที่ว่องไวและสามารถทำปฏิกิริยาหรือกราฟท์กับเอนไซม์ได้ หมู่ฟังก์ชันของโปรตีนที่สามารถเชื่อมพันธะโควาเลนต์ของเอนไซม์กับโพลิเมอร์ ได้แก่ (1) หมู่อะมิโน หมู่ ϵ -amino ของ lysine และ หมู่ α -NH₂ ของสายโซ่โพลีเบปไทด์ที่มี N-ที่ปลายสายโซ่ (2) หมู่คาร์บอกซิล (β - และ γ -carboxyls) (3) วงแหวนพีนอลของไทโรซีน (4) หมู่ซัลโฟไฮดริลของ cysteine (5) หมู่ไฮดรอกซิลของเซอรีน ทรีโอนีน และไทโรซีน (6) หมู่อิมิดาโซล (imidazole) ของฮิสติดีน (7) หมู่อินโดลของทริปโตเฟน โดยทั่วไปนิยมตรึงโดยใช้พันธะโควาเลนต์ของหมู่อะมิโน คาร์บอกซิล หรือวงแหวนอะโรมาติกของไทโรซีนและฮิสติดีน ตัวอย่างการโควาเลนต์อยู่หลายวิธี เช่น ปฏิกิริยาเอซิลเลชัน (acylation reactions) [15-21], ปฏิกิริยาเอริลเลชันและปฏิกิริยาแอลคิลเลชัน (arylation and alkylation reactions) [22-28], ปฏิกิริยาไซยาโนเจนโบรมายด์ (cyanogen bromide reactions) [24-25], ปฏิกิริยาไดอะโซคอปปลิง (diazo coupling reactions) [26], การทำปฏิกิริยาด้วย glutaraldehyde [27-28], และวิธีอื่น ๆ [30-32]

2.2 โปรตีเอส (Protease)

โปรตีเอสสามารถแบ่งได้ 4 กลุ่มตาม active centre คือ serine, metallo, thiol และ acid protease [33-34]

2.2.1 Acid Protease

เอนไซม์นี้สามารถไฮโดรไลซ์โปรตีนที่ pH ต่ำ ๆ โดยนำไปใช้งานในด้านการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองเพื่อผลิตซีอิ๊วและการทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสำหรับการเตรียมเนยแข็ง (cheese) นอกจากนี้ใช้ปรับปรุงคุณภาพของแป้งที่ใช้ในการทำขนมปัง อุตสาหกรรมนิยมใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Endothioparasitica*, *Mucor pusillus* และ *Mucor miechel* [2,35]

2.2.2 Metalloprotease

เอนไซม์ชนิดนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Neutral Protease เอนไซม์ประกอบด้วยหมู่โลหะ โดยปกติเป็น Zn^{2+} metalloprotease มีฤทธิ์สูงสุดสำหรับการไฮโดรไลซ์เคซีนที่ pH 7-8 เอนไซม์มีเสถียรภาพเพิ่มขึ้นเมื่อเติม Ca^{2+} ลงในปฏิกิริยาและมีเสถียรภาพลดลงเมื่อมีการเติม sequestering agent เช่น EDTA เป็นต้น ซึ่งจะไปยับยั้งการเคลื่อนไหวของหมู่ Zn^{2+} [2, 35-36]

2.2.3 Thiol Protease

Thiol หรือ sulfhydryl protease ประกอบด้วยหมู่ sulfhydryl ที่มีหมู่วงไวถูกกระตุ้นได้ด้วย reducing agent เช่น dithiothreitol และ cysteine และถูกยับยั้งด้วย oxidizing agent [34]

2.2.4 Serine Protease

เอนไซม์ชนิดนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า alkaline protease เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH เป็นเบส serine protease ถูกยับยั้งโดย diisopropylfluorophosphate (DPF) หรือ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) แอลคาไลน์โปรตีเอสมี 3 ชนิด ประกอบด้วย Subtilisin Carlberg, Subtilisin Novo และ protease จาก *Alkalophilic Bacillus Species* [2,37-42]

2.2.4.1 Subtilisin Carlsberg

เอนไซม์ชนิดนี้ค้นพบโดย Linderstrom Lang และ Ottesen ในปี ค.ศ. 1947 [2]

เอนไซม์ชนิดนี้นิยมใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก โดยผลิตได้จาก *Bacillus licheniformis* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 274 หมู่ ไม่มีหมู่ cystine และ cystein จึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ เอนไซม์มีความเสถียรที่ pH 5-10 ที่อุณหภูมิ 25°C. และที่ 50°C. เป็นเวลา 1 ชม. สำหรับ pH 8.5 ฤทธิ์ของเอนไซม์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง pH 8-11 เอนไซม์ลดความว่องไวอย่างรวดเร็วที่ pH ต่ำกว่า 4 และสูงกว่า 11.5 ที่อุณหภูมิสูงกว่า 70°C. Subtilisin Carlsberg นิยมใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ทนทานและราคาไม่แพง นอกจากนี้อาจใช้ในด้านอื่น ๆ ที่ต้องใช้เอนไซม์ไฮโดรไลซ์โปรตีนในภาวะที่เป็นเบส [2, 35, 37-39]

2.2.4.2 Subtilisin Novo (Subtilisin BPN)

Subtilisin Novo หรือ Subtilisine BPN ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 ตัว การเรียงตัวคล้ายกับ Subtilisin Carlsberg จะมี 58 กรดอะมิโนใน 275 ตัวที่แตกต่างไม่มีหมู่ cysteine ในโมเลกุล ดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ มีปลายสายโซ่ด้านหมู่อะมิโนเป็นหมู่ alanine และปลายด้านหมู่คาร์บอกซิลเป็นหมู่ glutamine บริเวณเร่งประกอบด้วย serine 221 ตัว histidine 54 ตัว และ aspartate 32 ตัว มีเสถียรภาพและฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ pH และอุณหภูมิต่าง ๆ เช่นเดียวกับ Subtilisin Carlsberg [2,35,38,40]

2.2.4.3 Proteases from Alkalophilic Bacillus Species

Alkalophilic Bacilli มีความเสถียรภาพภายใต้ภาวะการซักล้างที่อุณหภูมิมากกว่า 50°C pH 9-10 ในภาวะที่มีเซอร์เฟกเตนท์ และ sequestering agents อยู่ด้วย เอนไซม์ชนิดนี้น้ำหนักโมเลกุล 20,000-30,000 มี isoelectric point ประมาณ 11 มีเสถียรภาพและว่องไวที่ pH 6-12 ทนอุณหภูมิมากกว่า 60°C. เอนไซม์ชนิดนี้ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกได้เนื่องจากสามารถทนต่อ pH สูง ๆ ได้ [2,25]

2.3 โพลีอะคริลาไมด์

2.3.1 อะคริลาไมด์โมโนเมอร์

อะคริลาไมด์ (acrylamide, 2-propronamide) เป็นของแข็งสีขาว มีสมบัติทางกายภาพที่สำคัญดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1 [4]

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางกายภาพของอะคริลาไมด์

คุณสมบัติ	ค่า/ลักษณะ
ลักษณะภายนอก	ผลึกสีขาว
น้ำหนักโมเลกุล	71.08
จุดหลอมเหลว (°ซ)	84.5 ± 0.3
ความหนาแน่น (kg/m ³)	1.122 x 10 ³
ความสามารถในการละลาย (กรัม/ซม ³ สารละลาย, 30°ซ.)	
acetone	63.1
benzene	0.346
carbon tetrachloride	0.038
chloroform	2.66
methanol	155
water	215.5

2.3.2 โพลีเมอไรเซชันของอะคริลาไมด์

อะคริลาไมด์และอนุพันธ์อะคริลาไมด์สามารถเกิดโพลีเมอไรเซชันโดยฟรีแรดดิคัลและ ionic initiator ฟรีแรดดิคัลเป็นที่นิยมสำหรับการสังเคราะห์อะคริลาไมด์โดยเฉพาะใน aqueous phase ซึ่งมีทั้ง

ระบบ homogeneous และ heterogeneous ตัวเริ่มปฏิกิริยาสำหรับการเกิดโพลิเมอร์ไรเซชันสามารถใช้ระบบความร้อน ระบบรีดอกซ์ ใช้กลุ่มของเพอร์ออกไซด์ ใช้คลื่นอุลตราโซนิก (ultrasonic wave) ใช้รังสีแกมมา (γ -rays) หรือใช้การหลอมโมโนเมอร์ในระบบที่ปราศจากน้ำ

ฟรีแรดดิคัลโพลิเมอร์ไรเซชัน ในระบบ aqueous polymerization จะสังเคราะห์โพลิอะคริลาไมด์ได้ 3 วิธี คือ solution, inverse suspension และ inverse emulsion polymerization ระบบ inverse suspension และ inverse emulsion polymerization นี้สามารถสังเคราะห์โพลิเมอร์ในรูปเม็ดหรืออนุภาคขนาดเล็กได้

โพลิเมอร์ไรเซชันแบบสารละลาย (solution polymerization) ระบบทำโพลิเมอร์ไรเซชันในตัวทำละลาย โพลิเมอร์ที่เกิดขึ้นมีได้ทั้งในกรณีที่ละลาย หรือตกตะกอนในตัวทำละลายที่ใช้

อินเวิร์สซัสเพนชันโพลิเมอร์ไรเซชัน (inverse suspension polymerization) ระบบประกอบด้วยโมโนเมอร์ละลายในน้ำและกระจายตัวเป็นหยดโมโนเมอร์ในตัวทำละลายที่มีตัวสแตบิไลเซอร์อยู่ด้วย ตัวทำละลายอาจจะเป็นกลุ่มของอะโรมาติกและไฮโดรคาร์บอนสายตรงแบบอิ่มตัว (aliphatic saturated hydrocarbon)

อินเวิร์สอีมัลชันโพลิเมอร์ไรเซชัน (inverse emulsion polymerization) เป็นระบบที่โมโนเมอร์ละลายน้ำ มีอิมัลซิไฟด์กระจายอยู่ในกรดอินทรีย์ (organic solvent) ที่ไม่มีขั้ว เช่น xylene หรือ paraffin โพลิเมอร์ไรเซชันเกิดจากตัวเริ่มปฏิกิริยาที่ละลายในน้ำมัน

2.3.3 โคโพลิเมอร์

อะคริลาไมด์สามารถโคโพลิเมอร์ไรซ์กับไวนิลโมโนเมอร์ได้หลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น

กรดอ่อน (weak acids) : กรดอะคริลิก, กรดเมทาคริลิก

กรดแก่ (strong acids) : กรดสไตรีนซัลโฟนิก, กรดเอทิลีนซัลโฟนิก

เบส (base) : dimethylaminoethylmethacrylate, dimethylaminoethylacrylate,

diallyldimethylammonium chloride

งานวิจัยนี้ได้เลือกกรดเมทาคริลิกเป็นโคโมโนเมอร์ร่วมกับอะคริลาไมด์ กรดเมทาคริลิกเป็นกรดคาร์บอกซิลิกแก่ปานกลาง มีค่าคงที่ของการแตกตัวเป็น 2.2×10^{-5} สมบัติทางกายภาพของกรดเมทาคริลิกแสดงดังตารางที่ 2.2 [43]

ตารางที่ 2.2 สมบัติทางกายภาพของกรดเมทาคริลิก

คุณสมบัติ	ค่า/ลักษณะ
น้ำหนักโมเลกุล	86.10
จุดหลอมเหลว ($^{\circ}\text{C}$)	14
จุดเดือด (101 kPa)	159-163
ความดันไอ (25°C kPa)	0.13
ความหนาแน่น, (25°C , kg/m^3)	1.015×10^3
ดัชนีหักเห (25°C)	1.4588
ความหนืด (25°C , mPa.s)	1.3
แรงตึงผิว (25°C , mN/m)	26.5
การละลายในน้ำ	ละลาย

2.3.4 สมบัติของโพลีอะคริลาไมด์

โพลีอะคริลาไมด์ทำให้ง่ายโดยใช้เครื่อง freeze dry เป็นสีขาว เป็นของแข็ง พู ถ้าทำให้ตกตะกอนจากสารละลายและทำให้ง่าย มีลักษณะคล้ายแก้ว ค่อนข้างใส นำมาขึ้นเป็นฟิล์ม มีลักษณะใส แข็งเปราะ สมบัติทางกายภาพของโพลีอะคริลาไมด์แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางกายภาพของโพลีอะคริลาไมด์

สมบัติ	ค่า
ความหนาแน่น (23°C, kg/m ³)	1.302 x 10 ³
critical surface tension , mN/m	30-40
glass transition temp, °C by DTA	165-185
approx softening temp, °C	210
approx weight loss by TGA ,°C	initial loss : 290°C
	70% loss : 430°C
	98% loss : 555°C
gases evolved on heating	NH ₃ below 300°C
	H ₂ , CO, NH ₃ above 300°C

2.3.5 การนำไปใช้งาน

โพลีอะคริลาไมด์สามารถนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมต่างๆ ที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ อุตสาหกรรมกระดาษ การบำบัดน้ำเสีย อุตสาหกรรม oil recovery นอกจากนี้โพลีอะคริลาไมด์ยังนำไปใช้งานในด้านอื่นๆ เช่นเป็น textile agent เป็นตัวลดแรงเสียดสี (friction reduction) เป็นกาว (adhesives) ใช้ร่วมกับองค์ประกอบอื่น ๆ เช่น การทำเป็นเจล แยกโปรตีนโดยวิธี electrophoresis เป็นต้น

2.4 คำนิยามและสูตรการคำนวณ

2.4.1 ฤทธิ์ของเอนไซม์ (Enzymatic Activity, Units)

ฤทธิ์ของเอนไซม์ คือ ปริมาณไมโครกรัมของไทโรซีนที่ปลดปล่อยต่อกรัมของเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึงต่อเวลาที่ ฤทธิ์ของเอนไซม์สามารถคำนวณได้ดังสมการ 2.1



$$\text{ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต)} = \frac{(A_s - A_c) \times V}{S \times t \times W} \quad \text{..... (2.1)}$$

เมื่อ	A_s	=	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 280 นาโนเมตร
	A_c	=	ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมที่ 280 นาโนเมตร
	V	=	ปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ
	S	=	ความชันของกราฟมาตรฐานไทโรซีนที่ 280 นาโนเมตร
	t	=	เวลาที่ใช้บ่ม (20 นาที)
	W	=	น้ำหนักของเอนไซม์ที่ได้รับหรือไม่ได้รับการตรึง (กรัม)

2.4.2 เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน (percentage Conversion)

คอนเวอร์ชันของโมโนเมอร์หมายถึงปริมาณของโมโนเมอร์ที่เปลี่ยนเป็นโพลิเมอร์ ในที่นี้คือคอนเวอร์ชันของอะครีลาไมด์เป็นโพลิอะครีลาไมด์และโคโพลิเมอร์ไรซ์ของอะครีลาไมด์กับกรดเมทาคริลิกเป็นโพลิ(อะครีลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสามารถคำนวณได้ดังสมการ 2.2

$$\% \text{ คอนเวอร์ชัน} = \frac{\text{ปริมาณโพลิเมอร์ที่เกิดขึ้น}}{\text{ปริมาณโมโนเมอร์ที่ใช้}} \times 100 \quad \text{..... (2.2)}$$

นอกจากนี้สามารถหาคอนเวอร์ชันได้อีกวิธีหนึ่งโดยการตรวจสอบปริมาณโมโนเมอร์ที่เหลือจากการเกิดโพลิเมอร์ไรเซชัน ดังสมการ 2.3 และ 2.4

$$\text{ปริมาณโมโนเมอร์ที่เหลือทั้งหมด} = \frac{P_a \times V_m \times V_b \times V_l}{S_a \times V_l \times V_d \times V_s} \quad \text{..... (2.3)}$$

- เมื่อ P_s = พื้นที่ใต้พีกของอะคริลาไมด์โมโนเมอร์ที่เหลือจาก HPLC โคโรมาโทแกรม
- V_m = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างสำหรับฉีดเข้า HPLC
- V_b = ปริมาตรของ dispersed polymer phase หลังจากเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ (9 ซม³)
- V_i = ปริมาตรทั้งหมดของปฏิกิริยา (246 ซม³)
- S_a = ความชันของกราฟมาตรฐานอะคริลาไมด์โมโนเมอร์
- V_i = ปริมาตรที่ฉีดเข้า HPLC (5×10^{-3} ซม³)
- V_d = ปริมาตรของ dispersed polymer phase ที่ใช้เตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC
- V_s = ปริมาตรของ dispersed polymer phase ที่สุ่มตัวอย่างจากปฏิกิริยา (4 ซม³)

เปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชัน} = \frac{(\text{โมโนเมอร์ที่เติมลงไป} - \text{ปริมาณโมโนเมอร์ที่เหลือ})}{\text{โมโนเมอร์ที่เติมลงไป}} \dots\dots\dots (2.4)$$

2.4.3 เปอร์เซ็นต์การตรึงเอนไซม์ (Percentage of Enzymatic Immobilization)

เปอร์เซ็นต์การตรึงเอนไซม์หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถตรึงบนโพลิเมอร์ได้

โดยสามารถคำนวณได้ดังสมการ 2.5

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตรึงเอนไซม์} = \frac{A_i \times W_t}{A_f} \dots\dots\dots (2.5)$$

- เมื่อ
- A_i = ฤทธิ์ของเอนไซม์ใน 1 กรัมโพลีเมอร์
- A_f = ฤทธิ์ของเอนไซม์ทั้งหมดที่เติมลงไปในปฏิกิริยา
- W_i = น้ำหนักของโพลีเมอร์ทั้งหมดที่สังเคราะห์ได้

2.4.4 การดูดน้ำ (Water absorption)

การดูดซึมน้ำของโพลีเมอร์หมายถึง จำนวนน้ำที่สามารถดูดซึมได้โดยโพลีเมอร์บิด การดูดซึมน้ำสามารถคำนวณได้ดังสมการ

$$\text{การดูดซึมน้ำ} = \frac{W_s}{W_d} \quad \text{..... (2.6)}$$

เมื่อ

- W_s = น้ำหนักของโพลีเมอร์หลังจากดูดซึมน้ำ
- W_d = น้ำหนักของโพลีเมอร์ที่แห้ง

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

กรดเมทาคริลิก(methacrylic acid, MAA) จากบริษัทสยามเรซินและเคมีภัณฑ์จำกัด กลิ่น
ภายใต้ความดันก่อนใช้งาน

สารเคมีที่แสดงข้างล่างนี้เป็นเกรดสำหรับงานวิเคราะห์ ใช้ได้ทันที

Pluronic PE 8100 จากบริษัท BASF (Thai) Ltd.

อะคริลามิด (acrylamide, AM), แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate, APS) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate), ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(dipotassium hydrogen phosphate), โซเดียมคาร์บอเนต(sodium carbonate) และโซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) จากบริษัท Merck A.G.(เยอรมันนี)

ทริส-(ไฮดรอกซีเมทิล)-อะมิโนมีเทน (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane) กรดไตรคลอโรอะซีติก (Trichloroacetic acid, TCA), N,N'-methylene-bis-acrylamide (MBA) พาราฟินแวกซ์ (paraffin wax) อิมิดาโซล (imidazole), coomassie brillant blue R-250 จากบริษัท Fluka A.G. (สวีตเซอร์แลนด์)

แอลคาไลน์โปรตีเอส (alkaline protease, P5380, Type VII), Bovine Serum Albumin (BSA) จากบริษัท Sigma Chemical Co.,Ltd (USA)

N,N,N',N'-tetraethylmethylenediamine(TEMED) และเคซีน (casein, hammarsten) จากบริษัท BDH Laboratory Chemical Division (England)

3.1.2 อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยมีดังนี้

UV-Visible Spectrophotometer รุ่น DU 650, Beckman, สหรัฐอเมริกา

Scanning Electron Microscope (SEM) รุ่น JSM-35CF, JEOL, ญี่ปุ่น

Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) รุ่น 1460X,

Perkin Elmer, สหรัฐอเมริกา

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น LC-3A,

Shimadzu, ญี่ปุ่น

Lyophilizer, รุ่น Lyph-lock 1L, Labconco Corporation, สหรัฐอเมริกา

Rotatory Evaporator, รุ่น RE 47, Yamato Scientific Co., Ltd, ญี่ปุ่น

Stirring Motor, รุ่น EURO-STB, Ika Labortechnik, เยอรมัน

Freezer (-70°C) รุ่น REVCO, Bara Laboratories Co., Ltd ประเทศไทย

pH meter, รุ่น SA 720, Orion Research Inc., สหรัฐอเมริกา

pH meter, รุ่น PHM 83, Radiometer, Copenhagen, เดนมาร์ก

เซนตริฟิวก์, รุ่น H-103N Series, Kokusan, ญี่ปุ่น

แท่งกวนแม่เหล็ก, รุ่น MS-90, Farga Instrument Ltd., ไต้หวัน

Vortex, รุ่น K550-GE, Scientific Industries Inc., สหรัฐอเมริกา

ตุ้บ, รุ่น DG 82, Yamato Scientific Co., Ltd., โตเกียว ญี่ปุ่น

เครื่องชั่ง, รุ่น AE-200S, Metter Instrument A.G. สวิตเซอร์แลนด์

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 โยโมโพลิเมอร์ไรเซชันและการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส

ละลายอะครีลาไมด์และ N,N'-methylene-bis-acrylamide ในสารละลายคาร์บอนเนต-ไบคาร์บอนเนตบัฟเฟอร์ 35 ซม³ ที่ pH 10.5 เทสารละลายลงใน 200 ซม³ พาราฟินแวกซ์ที่มี Pluronic PE 8100 อยู่ด้วย ผ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อกำจัดออกซิเจน เติมแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตและแอลคาไลน์โปรตีเอส ผสมให้เข้ากัน ผ่นด้วยก๊าซไนโตรเจน เติม N,N,N',N'-tetraethylmethylenediamine (TEMED) ลงในพาราฟินเฟส จับเวลาโพลิเมอร์ไรเซชัน ระหว่างการโพลิเมอร์ไรเซชันให้พ่นก๊าซไนโตรเจนและกวนตลอดเวลา หลังสิ้นสุดโพลิเมอร์ไรเซชัน ถ่ายส่วนผสมลงในบีกเกอร์ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์มากเกินพอ ล้างบีด 4 ครั้งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อกำจัดพาราฟินแวกซ์และเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงออก ทำบีดให้แห้งโดยใช้เครื่อง freeze dry เก็บบีดไว้ในตู้เย็น ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์ และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันของโมโนเมอร์

การวิจัยได้เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวแปรต่าง ดังหัวข้อ 3.2.1.1-3.2.1.10 เพื่อหาภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการตรึงเอนไซม์ให้มีฤทธิ์ของเอนไซม์สูงสุด

3.2.1.1 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นโมโนเมอร์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

ทำการสังเคราะห์โพลิอะครีลาไมด์ดังหัวข้อ 3.2.1 โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นอะครีลาไมด์ที่ 3.14, 4.57, 6.28 และ 9.14 มิลลิโมลาร์ ใน 35 ซม³ ของสารละลายคาร์บอนเนต-ไบคาร์บอนเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5 นำบีดที่แห้งทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน ความเข้มข้นอะครีลาไมด์ที่ให้ฤทธิ์สูงสุดจะใช้เป็นค่าคงที่สำหรับศึกษาตัวแปรถัดไป

3.2.1.2 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเอนไซม์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ 0.25, 0.5, 1.5, 2.5, 5.0, มิลลิกรัม/5 ซม³ สารละลายบัฟเฟอร์ โดยทำการโพลิเมอร์ไรเซชันเช่นเดียวกับ 3.2.1 นำบีดที่แห้ง

ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน ภาวะที่ให้ฤทธิ์ของเอนไซม์สูงสุดจะใช้เป็นค่าคงที่สำหรับศึกษาตัวแปรถัดไป

3.2.1.3 ผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

เปลี่ยนแปลงอัตราการกวนเป็น 100, 200, 300 และ 400 รอบต่อนาที ทำการโพลีเมอไรเซชันดังหัวข้อ 3.2.1 นำบีดแห้งทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์ เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน ภาวะที่มีฤทธิ์ของเอนไซม์จะใช้เป็นค่าคงที่สำหรับศึกษาตัวแปรถัดไป

3.2.1.4 ผลของการเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการโพลีเมอไรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

เปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการโพลีเมอไรเซชัน เป็น 1, 2, 3, 4 ชั่วโมง ทำการโพลีเมอไรเซชันดังหัวข้อ 3.2.1 นำบีดแห้งทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์ เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน ภาวะที่สามารถตรึงเอนไซม์สูงสุดจะใช้เป็นค่าคงที่สำหรับศึกษาตัวแปรถัดไป

3.2.1.5 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการทำโพลีเมอไรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ 0, 10, 20, 30, 40°C สำหรับการโพลีเมอไรเซชัน โดยทำการโพลีเมอไรเซชันดังหัวข้อ 3.2.1 นำบีดแห้งทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์ เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน ภาวะที่มีฤทธิ์ของเอนไซม์สูงสุดจะใช้เป็นค่าคงที่สำหรับศึกษาตัวแปรถัดไป

3.2.1.6 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเริ่มปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate, APS) ใช้เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา ทำการโพลีเมอไรเซชันดังหัวข้อ 3.2.1 โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ APS เป็น 3.13, 6.56, 9.39,

และ 12.52 มิลลิโมลาร์ นำบีดแห้งทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์ เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน ภาวะที่มีฤทธิ์ของเอนไซม์สูงสุดจะใช้เป็นค่าคงที่สำหรับศึกษาตัวแปรถัดไป

3.2.1.7 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

N,N,N',N' -tetraethylmethylenediamine (TEMED) ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำโพลิเมอไรเซชัน โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ TEMED ที่ 47.75, 95.50, 143.25, 191.05 มิลลิโมลาร์ ทำโพลิเมอไรเซชันดังหัวข้อ 3.2.1 นำบีดแห้งทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์ เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน ภาวะที่มีฤทธิ์ของเอนไซม์สูงสุดจะใช้เป็นค่าคงที่สำหรับศึกษาตัวแปรถัดไป

3.2.1.8 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเชื่อมขวางต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

N,N' -methylene-bis-acrylamide (MBA) ใช้เป็นตัวเชื่อมขวาง (crosslinker) โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ MBA เป็น 15, 30, 60, 120 มิลลิโมลาร์ ทำการโพลิเมอไรเซชันดังหัวข้อ 3.2.1 นำบีดแห้งทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์ เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน ภาวะที่มีฤทธิ์สูงสุดจะใช้เป็นค่าคงที่สำหรับศึกษาตัวแปรถัดไป

3.2.1.9 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซอร์เฟคเตนต์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

Pluronic PE 8100 ใช้เป็นเซอร์เฟคเตนต์ โดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นที่ 5.3, 10.6, 15.9 และ 21.2 มิลลิโมลาร์ ทำการโพลิเมอไรเซชันดังหัวข้อ 3.2.1 นำบีดแห้งทดสอบ ฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์ เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน ภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการตรึงเอนไซม์จะใช้เป็นค่าคงที่สำหรับศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนระหว่างอะครีลาไมด์กับกรดเมทาคริลิกต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

3.2.1.10 ผลของการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนระหว่างอะครีลาไมด์และกรด

เมทาคริลิกต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

โดยนำอะครีลาไมด์และกรดเมทาคริลิก ทำโคโพลิเมอร์ในสัดส่วนที่สัดส่วนต่าง ๆ คือ 100/0, 97.5/2.5, 5/5, 90/10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นำบีดแห้งทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์การตรึงเอนไซม์ และเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชัน

3.2.2 พิสูจน์หมู่ฟังก์ชันด้วย FT-IR

ศึกษาหมู่ฟังก์ชันของโพลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง FT-IR spectrophotometer เปรียบเทียบสเปกตรัมของโพลิเมอร์กับสเปกตรัมมาตรฐาน

3.2.3 ศึกษาค่า glass transition temperature (T_g)

ศึกษาค่า T_g ของโพลิอะครีลาไมด์และโพลิ(อะครีลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetric (DSC)

3.2.4 วิธีทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์

3.2.4.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์และกราฟมาตรฐานไทโรซีน

(ก) 0.1 โมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 และ 8.0

stock solution ของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต: ละลายโซเดียม

ไฮโดรเจนฟอสเฟต 53.65 กรัมในน้ำกลั่น ปริมาตรให้ครบ 1000 ซม³

stock solution ของโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต: ละลายโซเดียมได

ไฮโดรเจนฟอสเฟต 27.8 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตรจนครบ 1000 ซม³

ผสม stock solution ของสารละลายทั้งสองตามสัดส่วนข้างล่างสำหรับการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 และ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 ซม³

pH	NaH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄
7.5	80.0	420.0
8.0	26.5	473.5

(ข) 0.1 โมลาร์ สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 และ 9.0

ละลายทริส(ไฮดรอกซี-เมทิล)อะมีโนมีเทน(Tris(hydroxy-methyl)aminomethane) 121.2 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.5 และ 9.0 ด้วย 0.1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 ซม³

(ค) 0.1 โมลาร์ สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 9.5, 10.0 และ 10.5

stock solution ของโซเดียมคาร์บอเนต : ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 21.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 ซม³

stock solution ของโซเดียมไบคาร์บอเนต: ละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 16.8 กรัมในน้ำกลั่น 1000 ซม³

นำ stock solution ของทั้งสองผสมตามสัดส่วนข้างล่างนี้เพื่อเตรียมสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ จากนั้นปรับ pH ด้วย 5N โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 2N กรดไฮโดรคลอริก ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 ซม³

pH	Na ₂ CO ₃	NaHCO ₃
9.5	65.0	185.0
10.0	137.0	112.5
10.5	202.5	47.5

(ง) 0.1 โมลาร์สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 11.0

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10.6 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 11.0 ด้วย 5N โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 ซม³

(จ) สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำกลั่นต่อปริมาตร

ละลายเคซีน 0.5 กรัมในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5 คนเบา ๆ ให้ความร้อนเล็กน้อย ทิ้งไว้ให้เย็นปรับ pH ด้วย 5N โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือ 2N กรดไฮโดรคลอริกปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จนครบ 100 ซม³

(ฉ) สารละลาย Bovine Serum Albumin(BSA) 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ละลาย BSA 0.5 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 ซม³

(ช) เจลาติน 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ละลายเจลาติน 0.5 กรัมในสารละลายบัฟเฟอร์ให้ความร้อน คนให้ละลาย ทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรจนครบ 100 ซม³

(ซ) กรดไตรคลอโรอะซีติก (Trichloroacetic acid, TCA) 10 เปอร์เซ็นต์

ละลาย TCA 10 กรัมในน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 100 ซม³

(ณ) กราฟมาตรฐานของไทโรซีน (Tyrosine)

stock solution ของไทโรซีน : ละลายไทโรซีน 0.01 กรัม ในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5 ปรับปริมาตรจนครบ 50 ซม³

ทำการหากราฟมาตรฐานไทโรซีนโดยเจือจาง stock solution ของไทโรซีนดังสัดส่วนข้างล่างนี้ นำสารละลายวัดค่าการดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer

Tyrosine stock solution (cm ³)	Buffer (cm ³)	Concentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)
0.0	5.0	0
0.5	4.5	20
1.0	4.0	40
1.5	3.5	60
2.0	3.0	80
2.5	2.5	100

3.2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์

ปมตัวอย่าง 0.05-0.1 กรัมของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีดโพลีเมอร์ (0.1 ซม.³ ของเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง) ใน 1 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเคซีน 1 ซม.³ เดิมสารละลายบัฟเฟอร์ 1.9 ซม.³ นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซนเซียสเป็นเวลา 20 นาที นำขึ้นแช่อ่างน้ำเย็นหยุดปฏิกิริยาทันทีด้วย 10 เปอร์เซ็นต์สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 2 ซม.³ ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน

ในการวัดฤทธิ์ของเอนไซม์ต้องทำหลอดควบคุมสำหรับเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างแท้จริง โดยทำการบ่มสารละลายเคซีนกับบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซนเซียสเป็นเวลา 20 นาที ก่อนหยุดปฏิกิริยาด้วย 10 เปอร์เซ็นต์กรดไตรคลอโรอะซิติก จากนั้นจึงเติมตัวอย่างลงไป นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอน นำน้ำใสวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดตัวอย่างลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงจากหลอดควบคุม เปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน

3.2.4.2.1 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสต่อฤทธิ์ของ

เอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงและไม่ได้รับการตรึงทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ pH ต่าง ๆ กันโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5 และ 8.0), ทรืส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (pH 8.5 และ 9.0), คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (pH 9.5-10.5) และ คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (pH 11.0) ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ตามหัวข้อ 3.2.4.2 เปรียบเทียบฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึง

3.2.4.2.2 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์โดยเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการบ่มเอนไซม์ต่าง ๆ กันที่ 25, 37, 45, 60°C. โดยเปรียบเทียบฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึงทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ตามหัวข้อ 3.2.4.2 ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

3.2.4.2.3 ผลของการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของเอนไซม์ต่อการย่อยโปรตีน

ทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึง โดยการเปลี่ยนแปลงสับสเตรตต่าง ๆ กันได้แก่ เคซีน, BSA, เจลาติน, ขนสัตว์ และเลือด โดยทำการทดสอบตามหัวข้อ 3.2.4.2 เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ทั้งสองชนิด

3.2.4.2.4 ผลของการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ต่อฤทธิ์ของ

เอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4, 25, 37, 45 และ 60 องศาเซนเซียสตามลำดับ ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ทุก ๆ หนึ่งสัปดาห์เป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบเสถียรภาพของเอนไซม์ทั้งสองชนิด

3.2.5 ทดสอบจำนวนครั้งการล้างบีดเพื่อกำจัดพาราฟินแวกซ์และเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการ ตรึง

ภายหลังการทำโพลิเมอไรเซชัน นำบีดล้างด้วยคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5 จำนวน 1-5 ครั้ง พาราฟินแวกซ์จะลอยอยู่บนผิวของสารละลายบัฟเฟอร์ให้กำจัดออกและนำบีดที่ผ่านการล้างแต่ละครั้ง ทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์

3.2.6 ทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ภายหลังการชะล้างบีด

นำบีดแห้งที่ทราบค่าฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีด ล้างด้วยสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5 จำนวน 1-4 ครั้ง แต่ละครั้งนำบีดมาทำให้แห้ง ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์

3.2.7 ทดสอบเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชัน

3.2.7.1 โดยการชั่งน้ำหนักโพลิเมอร์ที่ได้

ทำโพลิเมอไรเซชันได้โพลิเมอร์ตามหัวข้อ 3.2.1 คำนวณคอนเวอร์ชันโดยนำน้ำหนักของโพลิเมอร์ที่ได้หารด้วยน้ำหนักของโมโนเมอร์ที่เติมลงในปฏิกิริยา

3.2.7.2 โดยการทดสอบโมโนเมอร์ที่เหลือในเวลาต่าง ๆ

สุ่มตัวอย่างในระบบที่อยู่ในระหว่างการโพลิเมอไรซ์ที่ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 5 ซม³ ทดสอบอะคริลาไมด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยประยุกต์วิธีการทดสอบจาก Husser และคณะ [44]

mobile phase ประกอบด้วย 15 เปอร์เซ็นต์เมทานอล 85 เปอร์เซ็นต์เมทิลีนคลอไรด์ อัตราการไหลของ mobile phase 1 ซม³/นาที ความดัน 50 กก./ซม คอลัมน์ Zorbax-N (250x4.6mm) ความยาวคลื่นของ detector ที่ 240 นาโนเมตร

สารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ เตรียมโดยละลายอะคริลาไมด์ 0.05 กรัม ใน 50 ซม³ เมทานอล เจือจางให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.25, 0.5, 1.0, 5 ไมโครกรัมของอะคริลาไมด์ต่อ 5×10^{-3} ซม³ จำนวนผลโดยใช้พื้นที่ใต้พีก (peak area) ต่อความเข้มข้นที่ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

นำอะคริลาไมด์ตัวอย่างจากการสุ่ม 2 ซม³ สกัดด้วยเมทานอล 8 ซม³ คนเป็นเวลา 30 นาที เหยี่ยงให้ตกตะกอนเป็นเวลา 15-20 นาที นำส่วนน้ำใส 5×10^{-3} ซม³ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC นำพื้นที่ใต้พีกเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวนคอนเวอร์ชันของอะคริลาไมด์ได้ตั้งสมการ 2.3

3.2.8 กำหนดเปอร์เซ็นต์การตรึงของเอนไซม์

ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ตามหัวข้อ 3.2.4.2 กำหนดหาฤทธิ์ของเอนไซม์ทั้งหมดที่เติมลงในปฏิกิริยาโดยการคูณฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต) กับน้ำหนัของเอนไซม์ที่เติมลงในปฏิกิริยา ฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลีเมอร์ได้จากการคูณฤทธิ์ของเอนไซม์กับน้ำหนักทั้งหมดของโพลีเมอร์ที่เกิดขึ้น เปอร์เซ็นต์การตรึงเอนไซม์ได้จากการนำฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงทั้งหมดหารด้วยฤทธิ์ของเอนไซม์ทั้งหมดที่เติมลงในปฏิกิริยา

3.2.9 ทดสอบการดูดซึมน้ำ

3.2.9.1 ในน้ำกลั่น

นำบีดแห้ง 0.1 กรัมแช่ในน้ำกลั่น 100 ซม³ ทิ้งไว้ 30 นาที กรองเจลด้วยตะแกรงกรอง ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักและคำนวณความสามารถในการดูดซึมน้ำของบีดโดยทำเป็นน้ำหนักของบีดภายหลังดูดซึมน้ำต่อน้ำหนักของบีดแห้ง

3.2.9.2 ในสารละลายเกลือ

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.9.1 แต่เปลี่ยนน้ำกลั่นเป็นสารละลายเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของโซเดียมคลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์

3.2.9.3 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการดูดซึมน้ำ

ทดสอบการดูดซึมน้ำในน้ำที่อุณหภูมิต่าง ๆ เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.9.1 โดยทดสอบการดูดซึมน้ำที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 และ 45°C.

3.2.10 ศึกษาลักษณะพื้นผิวและรูปร่างของโพลิเมอร์

นำโพลิอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) คุณลักษณะพื้นผิว รูปร่าง ขนาดของบีดด้วยเครื่อง scanning electron microscope (SEM)

3.2.11 การย้อมโปรตีน

วิธีนี้ประยุกต์จาก electrophoretic analysis method สำหรับการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ [45] staining solution เตรียมได้โดยละลาย coomassie brilliant blue R-250 1 กรัม ใน 450 ซม³ ของเมทานอล เดิมน้ำกลั่น 450 ซม³ และกรดอะซิติก 100 ซม³

destaining solution เตรียมได้จากผสมเมทานอล 100 ซม³ กรดอะซิติก 100 ซม³ และน้ำกลั่น 800 ซม³

นำบีดที่เตรียมและไม่ได้รับการตรึงเอนไซม์ย้อมด้วย staining solution 5-10 นาที ล้างด้วย destaining solution เขย่าเป็นครั้งคราวระหว่างการล้างบีดด้วย destaining solution บีดที่ได้รับการตรึงเอนไซม์จะย้อมสีติดสีน้ำเงิน

บทที่ 4

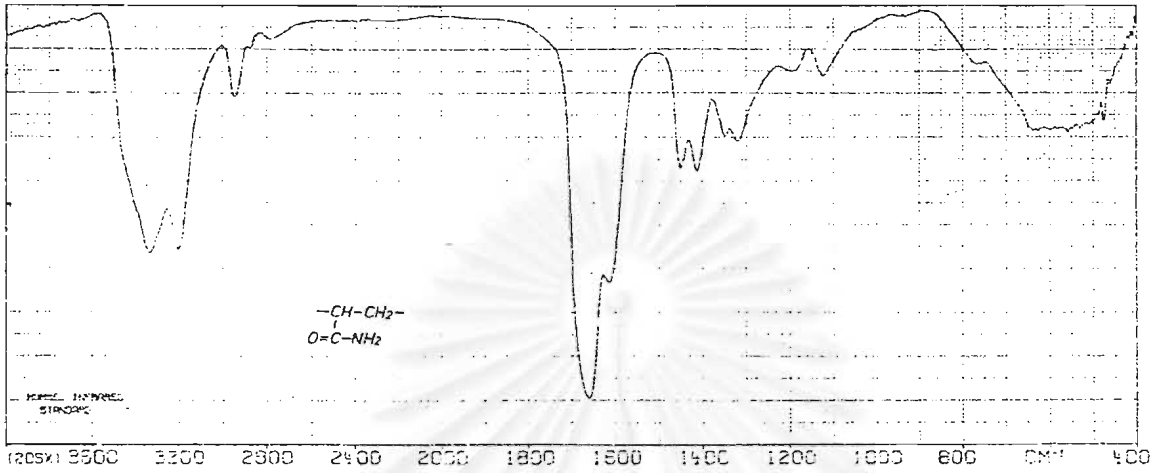
ผลการทดลองและการวิเคราะห์ผล

4.1 พิสูจน์หมู่ฟังก์ชันด้วย FT-IR สเปกโทรสโคปี

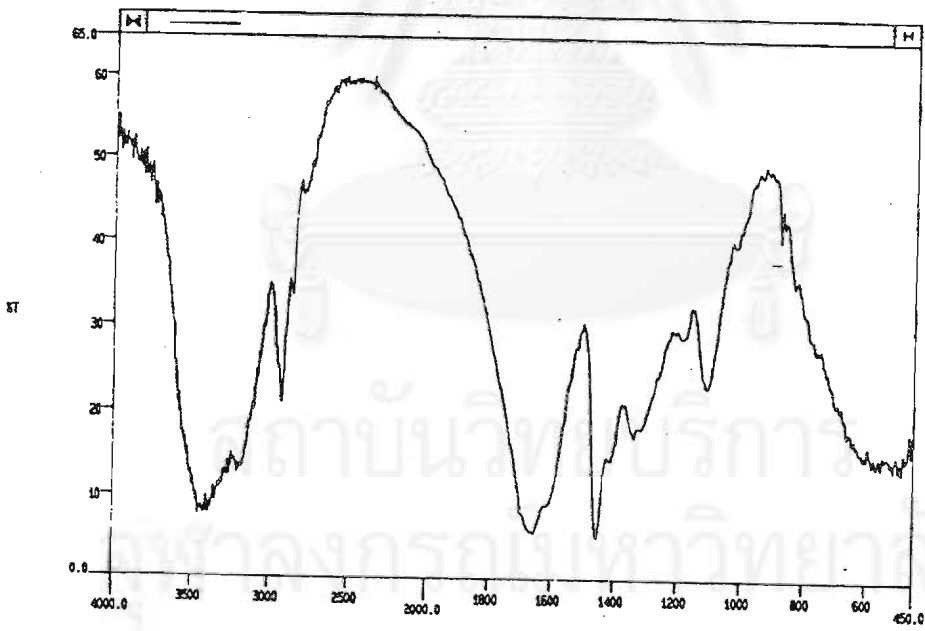
พิสูจน์หมู่ฟังก์ชันของโพลีอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ด้วยเครื่อง FT-IR สเปกโทรสโคปี โดยเปรียบเทียบสเปกตรัมของตัวอย่างกับสเปกตรัมมาตรฐาน รูป 4.1 (ก,ข) แสดงสเปกตรัมของโพลีอะคริลาไมด์มาตรฐาน [46] และที่สังเคราะห์ได้ตามลำดับ IR สเปกตรัมแสดง primary amide โดยมี carbonyl absorption ที่ 1640 cm^{-1} ($6.1 \mu\text{m}$) มี NH_2 stretching ที่ 3450 และ 3225 cm^{-1} (2.9 และ $3.1 \mu\text{m}$) มี NH_2 -deformation band ที่ทับกับ C=O stretching ที่ประมาณ 1615 cm^{-1} ($6.2 \mu\text{m}$) มี NH_2 wag vibration เป็นแบนด์ที่กว้างเริ่มจาก 770 cm^{-1} ($13 \mu\text{m}$) จนถึง 625 cm^{-1} ($16 \mu\text{m}$) FT-IR สเปกตรัมของโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ของมาตรฐานและตัวอย่างแสดง ดังรูป 4.2 (ก,ข) สเปกตรัมของโพลีอะคริลาไมด์คล้ายกับสเปกตรัมของโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) พบพีก C-O stretching ระหว่าง $1300-1200 \text{ cm}^{-1}$ ($8.0-8.5 \mu\text{m}$) C=O stretching ที่พีก ประมาณ $1670-1640 \text{ cm}^{-1}$ NH-banding ระหว่าง $1640-1550 \text{ cm}^{-1}$ พบแบนด์ O-H stretching ระหว่าง $335-2500 \text{ cm}^{-1}$ (3 และ $4 \mu\text{m}$) โดยทับกับแบนด์ NH_2 stretching ที่ 3450 และ 3225 cm^{-1} (2.9 และ $3.1 \mu\text{m}$) มีแบนด์ CH-stretching ปรากฏที่ประมาณ 2940 cm^{-1} และมี C-N stretching ในช่วง $1175-1055 \text{ cm}^{-1}$ ($8.5-9.5 \mu\text{m}$)

4.2 Glass Transition Temperature (T_g)

T_g ของโพลีอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ตรวจสอบโดยใช้เครื่อง DSC จากรูป 4.3 แสดง DSC เทอร์โมแกรมของโคโพลิเมอร์ระหว่างอะคริลาไมด์และกรดเมทาคริลิกที่ 100/0, 97.5/2.5, 95/5, และ 90/10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก(ภาคผนวกที่ 1) น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์อยู่ใน

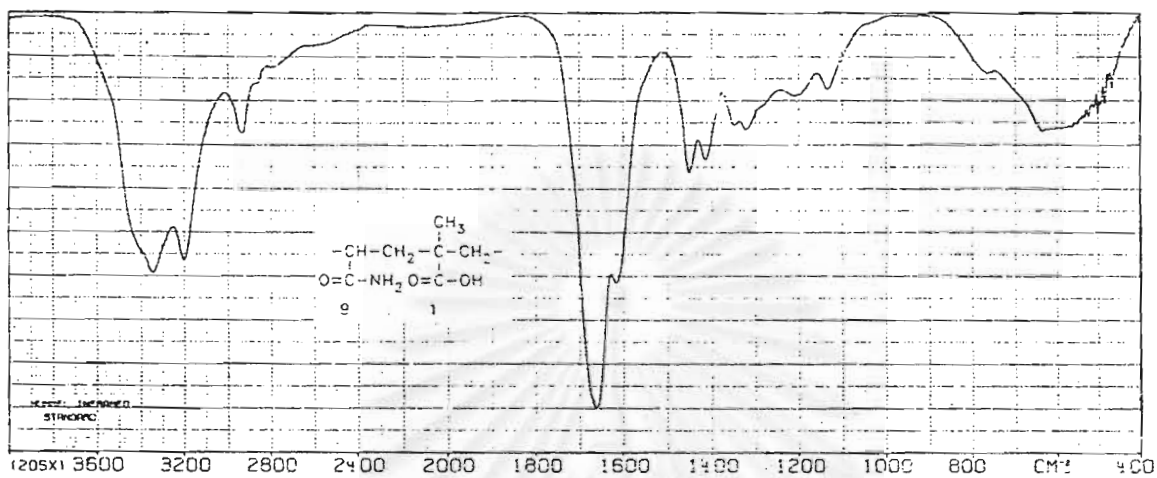


(ก)

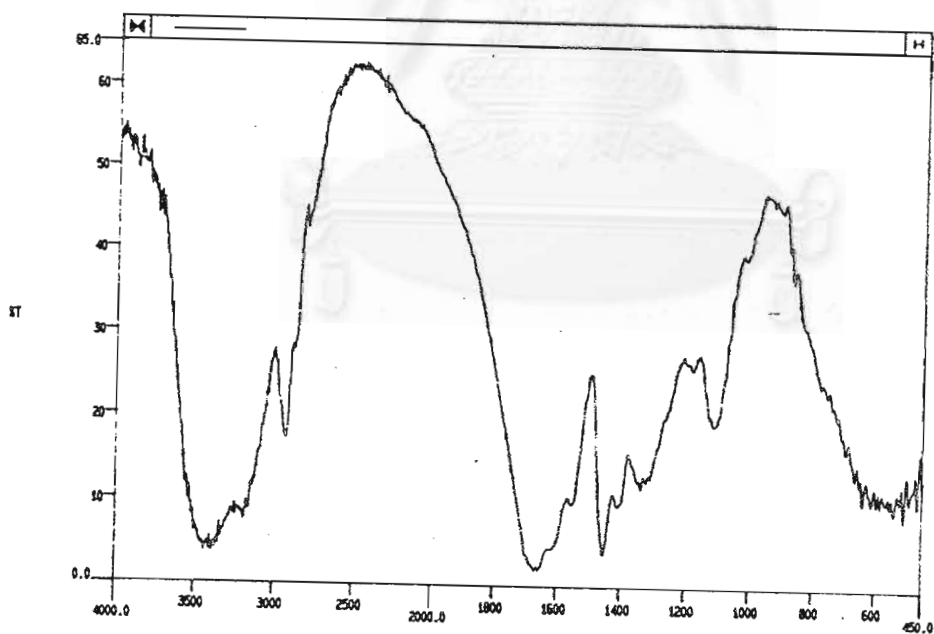


(ข)

รูปที่ 4.1 FT-IR สเปกตรัมของโพลีอะคริลาไมด์ (ก) สเปกตรัมมาตรฐาน (ข) สเปกตรัมตัวอย่าง



(ก)



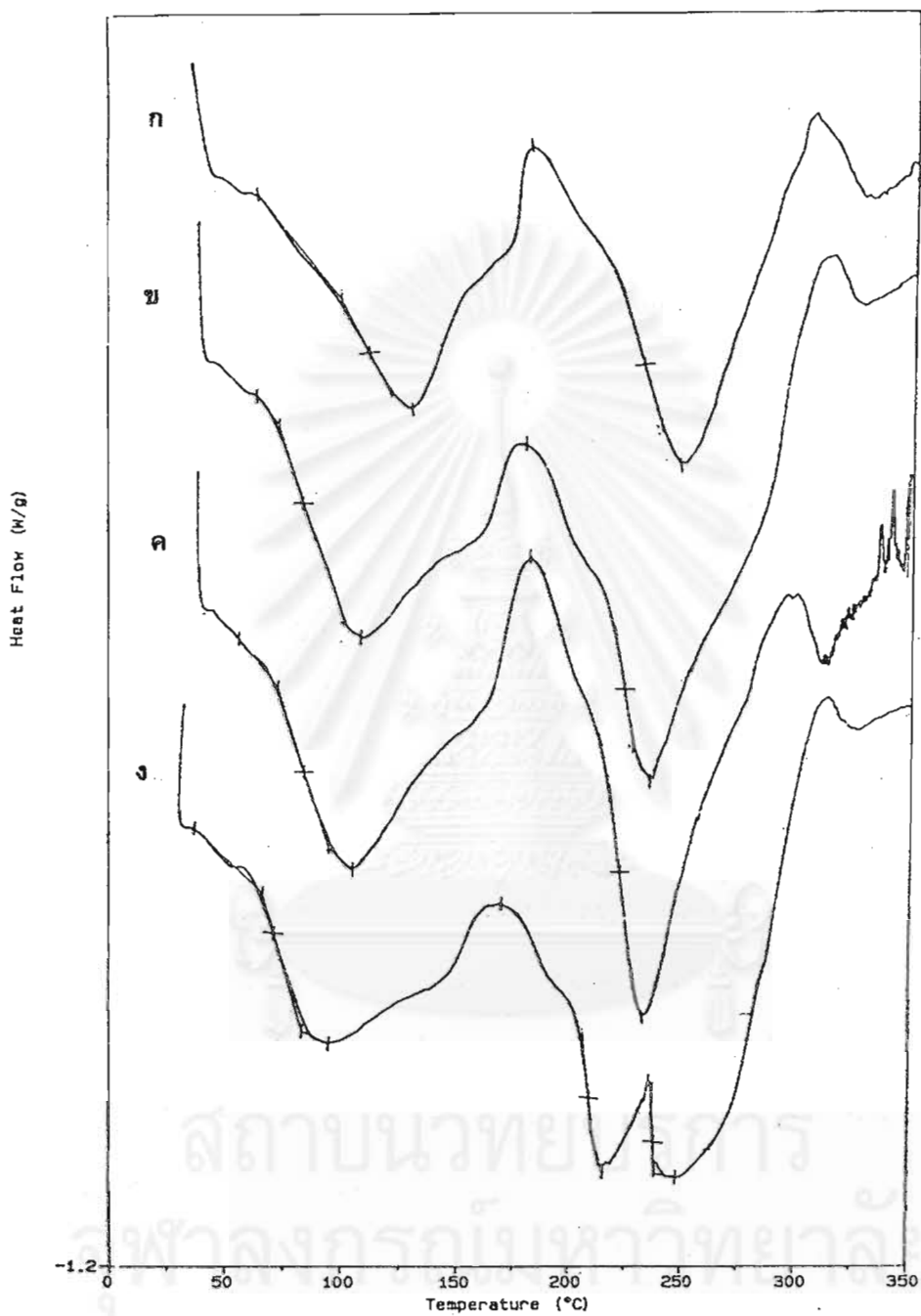
(ข)

รูปที่ 4.2 FT-IR สเปกตรัมของโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) (ก) สเปกตรัมมาตรฐาน

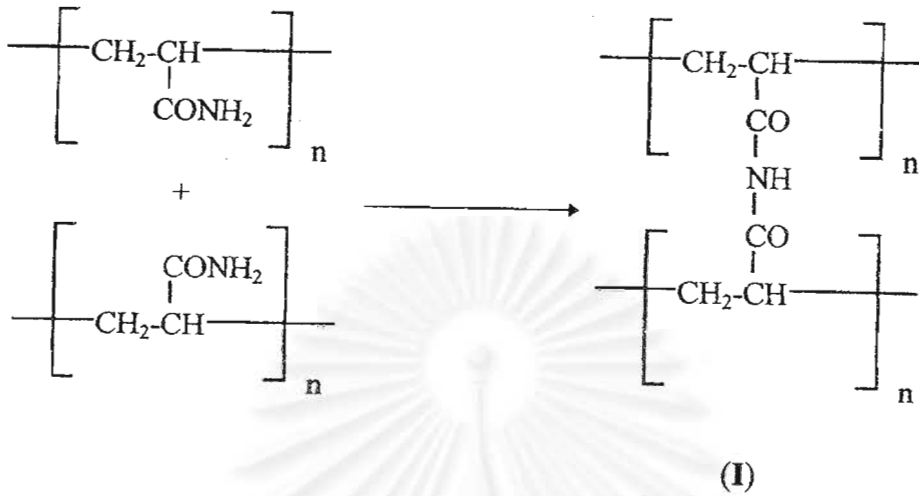
(ข) สเปกตรัมตัวอย่าง

ช่วง 10-12 มิลลิกรัม โพลีอะคริลาไมด์ที่มีตัวเชื่อมโยงมี T_g 220°C. จากงานวิจัยอื่น ๆ T_g ของโพลีอะคริลาไมด์ที่ไม่มีตัวเชื่อมโยงมีค่าเท่ากับ 165°C. [4, 47-48] และ 188°C. [47] โดย T_g แตกต่างกันขึ้นอยู่กับวิธีการสังเคราะห์และวิธีที่วิเคราะห์ T_g ของโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ที่ 97.5/2.5 และ 95/5 คือ 221 และ 228°C. ตามลำดับ เนื่องจากปริมาณของอะคริลาไมด์มีมากกว่ากรดเมทาคริลิก อะคริลาไมด์จึงมีความว่องไวเข้าทำปฏิกิริยามากกว่ากรดเมทาคริลิก จึงทำให้เห็นพีกของอะคริลาไมด์เพียงพีกเดียว T_g ของโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ที่ 90/10 แสดงเอนโดเทอร์มิกพีกที่ $T_{g1} = 228$ °C. และ $T_{g2} = 258$ °C. T_{g1} เป็นพีกของอะคริลาไมด์, T_{g2} เป็นพีกของกรดเมทาคริลิก T_g ของโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ที่สังเคราะห์ได้สูงกว่างานวิจัยอื่น ๆ เนื่องจากว่างานวิจัยนี้มีการเติมตัวเชื่อมโยงคือ N,N'-methylene-bis-acrylamide (MBA) ทำให้การเคลื่อนไหวของโซ่โพลิเมอร์ลดลง [49] และมีเกลือของโพลิเมอร์เกิดขึ้นเนื่องจากระบบโพลิเมอร์ไอออนในสารละลายบัฟเฟอร์ [50] จึงทำให้ T_g สูงขึ้น จากรูปที่ 4.3 ปรากฏพีก 1 พีก ที่ 80-110°C. เป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงของปฏิกิริยา imidization ที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการโพลิเมอไรเซชันอะคริลาไมด์ในบรรยากาศที่มีไนโตรเจนต่ำ [43] ที่อุณหภูมิสูง [51] และที่ pH ต่ำกว่า 2.5 และ สูงกว่า 9 [52-53] ซึ่งทำให้ได้ตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ [1] ดังรูปที่ 4.4 ในงานวิจัยนี้ตรงเอ็นไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนเม็ดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5 โอกาสของการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงมีมาก ปฏิกิริยา imidization เกิดในช่วง 75-110°C. [43] ปฏิกิริยา imidization ดังกล่าวมีผลต่อค่า T_g ของโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) เปลี่ยนไปในทางที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.3 DSC เทอร์โมแกรมของโพลิอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) (ก) 100/0, (ข) 97.5/2.5, (ค) 95/5, (ง) 90/10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก



รูปที่ 4.4 ปฏิกิริยา imidization ของโพลีอะคริลาไมด์

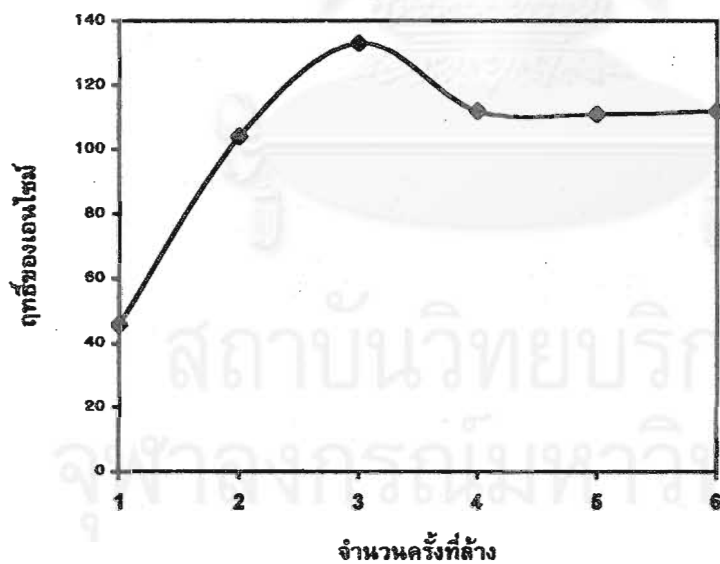
4.3 ทดสอบจำนวนครั้งในการล้างบีดเพื่อกำจัดฟาราฟินแวกซ์และเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง

หลังจากการเกิดโพลีเมอไรเซชันสิ้นสุด นำบีดมาล้างหลาย ๆ ครั้งด้วยคาร์บอนेट-โบคาร์บอนेट บัฟเฟอร์ pH 10.5 เพื่อกำจัดฟาราฟินแวกซ์และเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงออก โดยนำเจล (10 กรัม) ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ซม³ จำนวน 1-6 ครั้ง นำบีดแต่ละส่วนทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ ตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.5 แสดงฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงโดยใช้เคซีนเป็น สับสเตรต ผลการทดลองพบว่าฤทธิ์ของเอนไซม์คงที่เมื่อมีการล้างบีดอย่างน้อย 4 ครั้ง ดังนั้นในงานวิจัยจะล้างบีดอย่างน้อย 4 ครั้งก่อนทำให้บีดแห้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 4.1 ฤทธิ์ของเอนไซม์ต่อจำนวนครั้งที่ล้าง

จำนวนครั้งที่ล้าง	ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต)
1	46 ± 6
2	104 ± 4
3	133 ± 8
4	112 ± 4
5	111 ± 7
6	112 ± 2



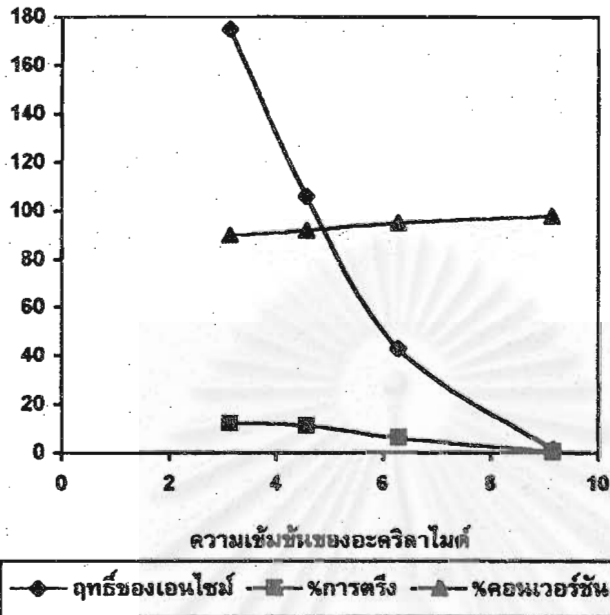
รูปที่ 4.5 ฤทธิ์ของเอนไซม์ต่อจำนวนครั้งที่ล้าง

4.4 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโมโนเมอร์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นอะคริลาไมด์โมโนเมอร์ที่ 3.14, 4.57, 6.28 และ 9.14 มิลลิโมลาร์ ใน 35 ซม³ ของสารละลายคาร์บอนेट-ไบคาร์บอนेटบัฟเฟอร์ pH 10.5 ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์ และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน แสดงดังตาราง 4.2 และรูปที่ 4.6 โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ MBA (120 mM) แอลคาไลน์โปรตีเอส (5.0 mg/5 cm³), APS (6.56 mM), TEMED (95.50 mM), Pluronic PE 8100 (10.6 mM) อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30^oซ. เวลาที่ใช้ทำโพลีเมอไรเซชัน 2 ชม. จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของเอนไซม์และเปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์ลดลงเมื่อความเข้มข้นอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้น ฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงสูงสุดที่ 175 ยูนิต ตรึงเอนไซม์ได้ 12% และมีคอนเวอร์ชัน 90% นำบีดที่แห้งคุณลักษณะพื้นผิวและขนาดด้วยเครื่อง SEM แสดงดังรูปที่ 4.7 จากรูป SEM พบว่าบีดมีลักษณะเป็นรูพรุน ขนาดของบีดเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้น ฤทธิ์ของเอนไซม์ลดลงเมื่อขนาดของบีดเพิ่มขึ้น อธิบายได้ว่าขนาดของบีดมีอิทธิพลต่อฤทธิ์

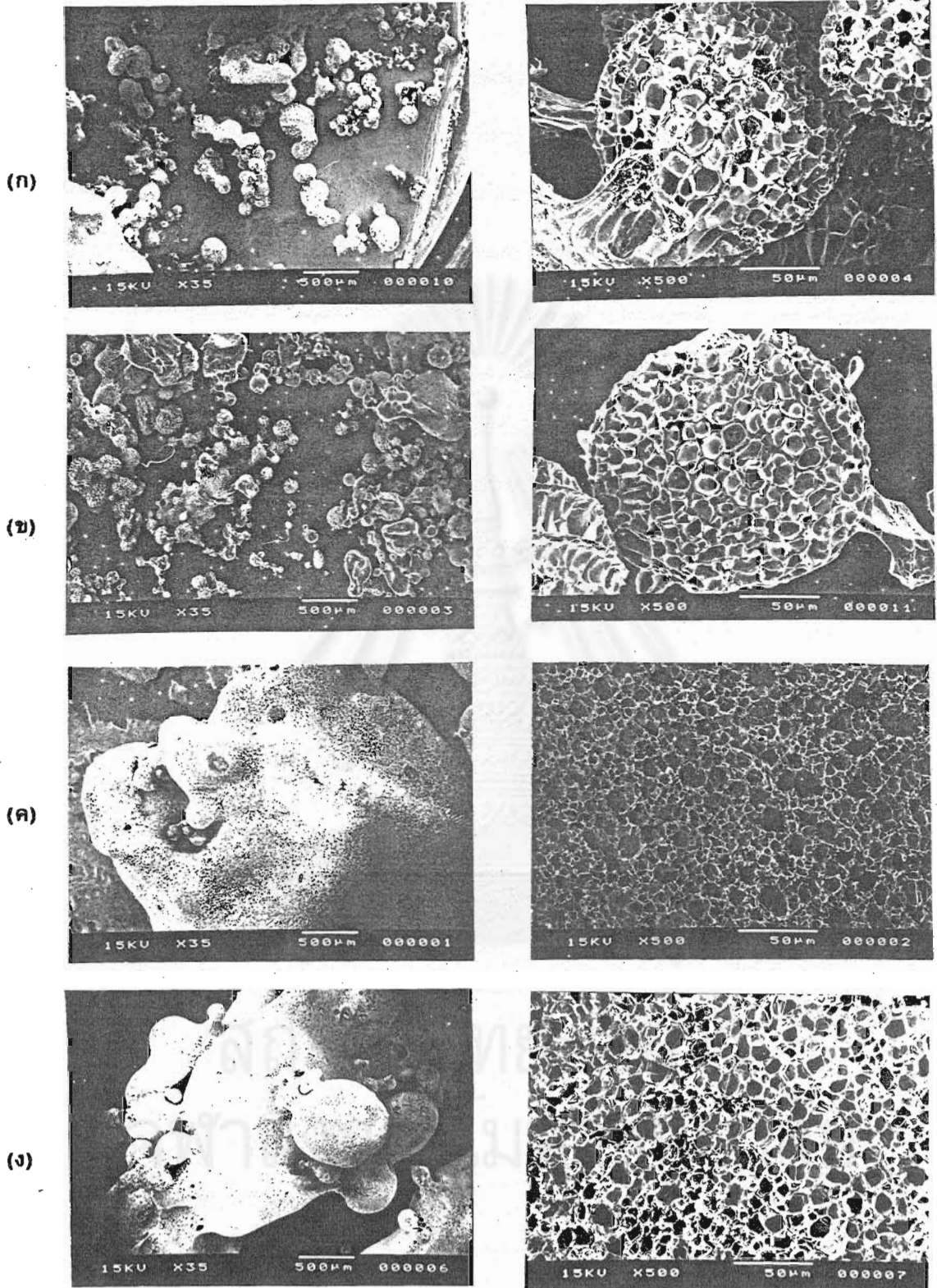
ตารางที่ 4.2 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นอะคริลาไมด์โมโนเมอร์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์ และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน สำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์

อะคริลาไมด์ (mM)	ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต)	เปอร์เซนต์ การตรึงเอนไซม์	เปอร์เซนต์ คอนเวอร์ชัน
3.14	175±5	12±1	90±2
4.57	106±3	11±1	92±3
6.28	43±5	6±1	95±1
9.14	1±1	0.2±0.3	98±3



รูปที่ 4.6 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นอะคริลาไมด์โมโนเมอร์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงเอนไซม์ และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน สำหรับการตรึงเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์

ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึง เปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ที่เพิ่มขึ้นทำให้โพลิเมอร์มีโครงร่างตาข่ายมากทำให้ความสามารถในการละลายลดลง ในการทดลองขั้นตอนถัดไปเลือกความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ 3.14 mM เนื่องจากว่ามีฤทธิ์ของเอนไซม์ สูงสุดและมีขนาดเล็ก



รูปที่ 4.7 SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์โมโนเมอร์ต่าง ๆ กัน

(ก) 3.14 mM, (ข) 4.57 mM, (ค) 6.28 mM, (ง) 9.14 mM

ซ้าย: กำลังขยาย 35 เท่า ขวา: กำลังขยาย 500 เท่า

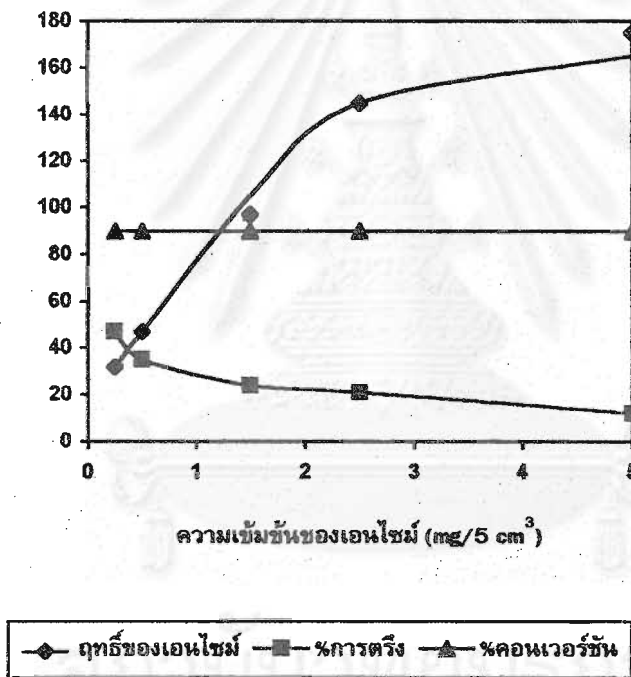
4.5 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอนไฮม์ต่อฤทธิ์ของแอนไฮม์

ทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอลคาไลโนโปรตีเอสที่ 0.25, 0.5, 1.5, 2.5 และ 5.0 mg/5 cm³ ต่อการศึกษาฤทธิ์ของแอนไฮม์ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ AM (3.14 mM), MBA (120 mM), APS (6.56 mM), TEMED (95.50 mM), Pluronic PE 8100 (10.6 mM) อัตราการกวาด 300 รอบต่อนาที เวลาและอุณหภูมิ 2 ชม. และ 30^oซ. ตามลำดับ ตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.8 แสดงผลฤทธิ์ของแอนไฮม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ฤทธิ์ของแอนไฮม์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้นแต่เปอร์เซ็นต์การตรึงลดลง เปอร์เซ็นต์การตรึงแอนไฮม์ที่ลดลงแสดงถึงข้อจำกัดการใช้ปริมาณแอนไฮม์ที่ตรึงบนโพลีอะคริลาไมด์ ดังนั้นจึงศึกษาปริมาณแอนไฮม์ที่เหมาะสมสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป พิจารณาปริมาณแอนไฮม์ที่ 0.25 และ 0.5 mg/5 cm³ ให้ฤทธิ์ของแอนไฮม์ 32 และ 47 ยูนิต ซึ่งมีค่าต่ำไม่เหมาะสมต่องานวิจัย และการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ พิจารณาถึงปริมาณแอนไฮม์ 2.5 และ 5.0

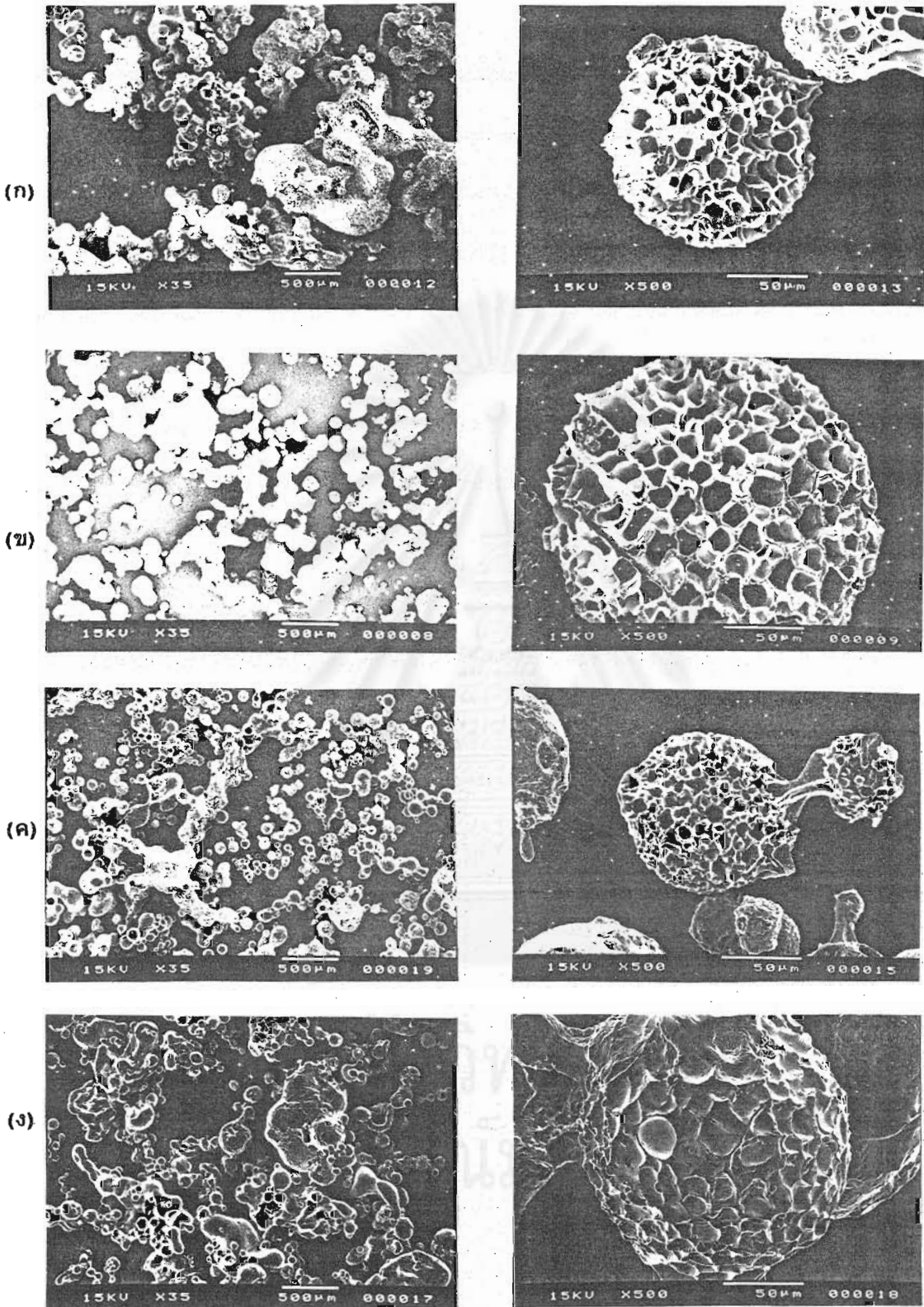
ตารางที่ 4.3 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอนไฮม์ต่อฤทธิ์ของแอนไฮม์ เปอร์เซ็นต์การตรึง และ เปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชัน สำหรับการตรึงแอนไฮม์แอลคาไลโนโปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์

ปริมาณแอนไฮม์ (mg/5 cm ³)	ฤทธิ์ของแอนไฮม์ (ยูนิต)	เปอร์เซ็นต์ การตรึง	เปอร์เซ็นต์ คอนเวอร์ชัน
0.25	32 ± 1	47 ± 2	90 ± 3
0.5	47 ± 1	35 ± 1	90 ± 4
1.5	97 ± 1	24 ± 1	90 ± 2
2.5	145 ± 3	21 ± 1	90 ± 2
5.0	175 ± 5	12 ± 1	90 ± 4

mg/5 cm³ ให้ฤทธิ์ของเอนไซม์ 45 และ 175 ยูนิต ตามลำดับ ซึ่งมีค่ายูนิตสูงพอแต่พบว่ามีปริมาณเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงสูญเสียไปประมาณ 80-85 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดคือ 1.5 mg/5 cm³ โดยให้ฤทธิ์ของเอนไซม์ 97 ยูนิต 24% การตรึง และ 90% คอนเวอร์ชัน การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชัน รูป 4.9 แสดงภาพ SEM ของบีดโพลีอะครีลาไมด์ การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์อาจจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของบีด



รูปที่ 4.8 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์การตรึงเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะครีลาไมด์



รูปที่ 4.9 ภาพ SEM ของโพลีเอครีลาไมด์ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่าง ๆ กัน

(ก) 0.25 (ข) 0.5 (ค) 1.5 (ง) 2.5 mg/5 cm³

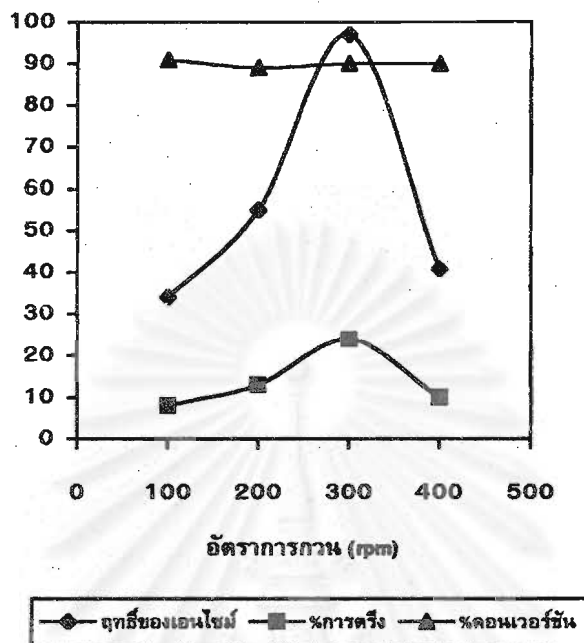
ซ้าย : กำลังขยาย 35 เท่า, ขวา : กำลังขยาย 500 เท่า

4.6 ผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวาดต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

โดยทำการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวาดที่ 100, 200, 300 และ 400 รอบต่อนาที โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ AM (3.14 mM), แอลคาไลไนโปรตีเอส ($1.5 \text{ mg}/5 \text{ cm}^3$), MBA (120 mM), APS (6.56 mM), TEMED (95.50 mM), Pluronic PE 8100 (10.6 mM) เวลาและอุณหภูมิ 2 ชม. และ 30°C . ตามลำดับ ตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.10 แสดงฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนเม็ดโพลีอะคริลาไมด์ที่อัตราการกวาดต่าง ๆ ฤทธิ์ของเอนไซม์สูงสุดที่ 97 ยูนิต 24% การตรึง และ 90% คอนเวอร์ชัน เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวาด อัตราการกวาดมีอิทธิพลต่อขนาดของเม็ดซึ่งสามารถดูได้จากรูป SEM ในรูปที่ 4.11

ตารางที่ 4.4 ผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวาดต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลไนโปรตีเอสบนเม็ดโพลีอะคริลาไมด์

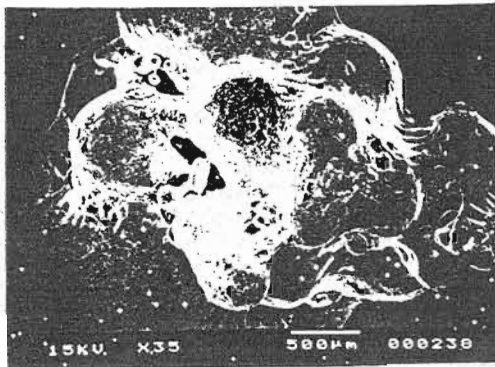
อัตราการกวาด (รอบ/นาที)	ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต)	เปอร์เซนต์ การตรึง	เปอร์เซนต์ คอนเวอร์ชัน
100	34 ± 2	8 ± 1	91 ± 1
200	55 ± 1	13 ± 1	89 ± 3
300	97 ± 1	24 ± 1	90 ± 2
400	41 ± 1	10 ± 1	90 ± 3



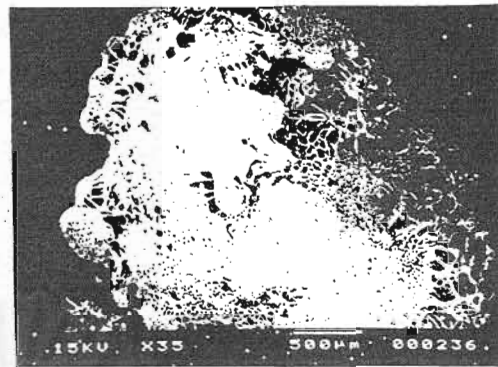
รูปที่ 4.10 ผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์การตรึง

และเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์

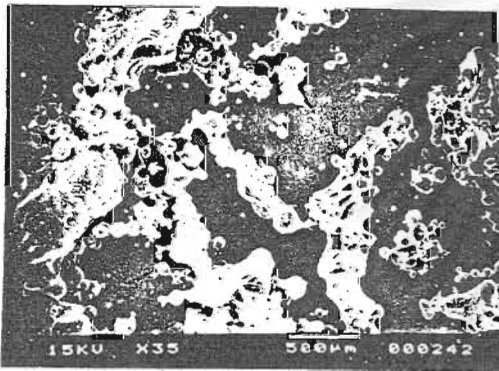
ขนาดของบีดลดลงเมื่ออัตราการกวนเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการกวนจาก 100 เป็น 300 รอบต่อนาที และลดลงเมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที ที่อัตราการกวนต่ำ ๆ (100 รอบต่อนาที) โมโนเมอร์เจริญเติบโต (propagate) ที่ตำแหน่งเดิมจึงทำให้ได้บีดที่มีขนาดใหญ่ ขนาดบีดมีอิทธิพลต่อการแพร่ผ่านของซับสเตรตและผลิตภัณฑ์ ที่อัตราการกวนสูง ๆ (400 รอบต่อนาที) บีดมีขนาดเล็กมากเกินไปไม่สามารถตรึงเอนไซม์ได้ดีพอจึงทำให้ฤทธิ์ของเอนไซม์ลดลง



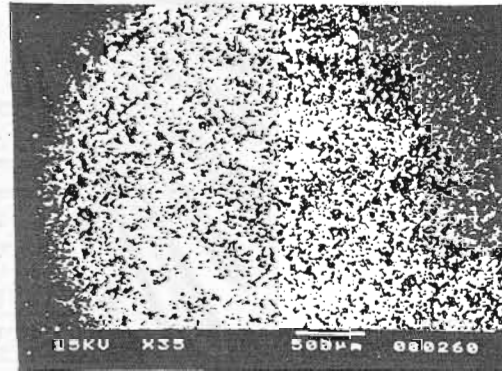
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.11 ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่อัตราการกวนต่าง ๆ กัน

(ก) 100 (ข) 200 (ค) 300 (ง) 400 rpm

4.7 ผลของการเปลี่ยนแปลงเวลาในการโพลีเมอไรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์และการเกิดบีค

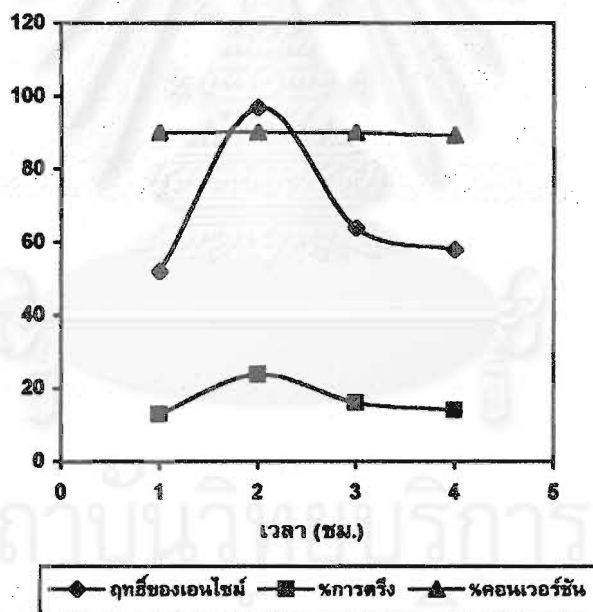
4.7.1 ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน

โดยเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการโพลีเมอไรเซชันที่ 1, 2, 3, 4 ชั่วโมง กำหนดให้ความเข้มข้นของ AM (3.14 mM) แอลคาไลน์โปรตีเอส (1.5 mg/5 cm³), MBA (120 mM), Pluronic PE 8100 (10.6 mM) อัตราการกวน 300 rpm อุณหภูมิ 30^oซ. ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4.5 และรูป

4.12

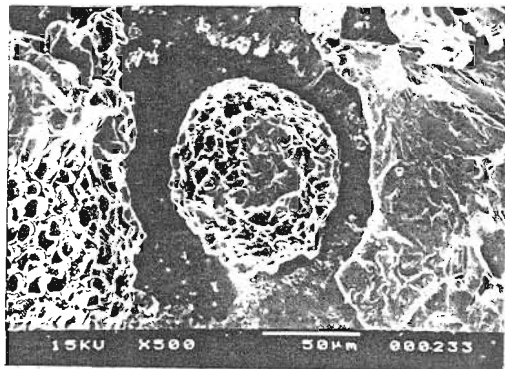
ตารางที่ 4.5 ผลของการเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการโพลีเมอไรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์ การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์

เวลา (ชั่วโมง)	ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต)	เปอร์เซนต์ การตรึง	เปอร์เซนต์ คอนเวอร์ชัน
1	52 ± 1	13 ± 1	90 ± 1
2	97 ± 1	24 ± 1	90 ± 2
3	64 ± 2	16 ± 1	90 ± 3
4	58 ± 1	14 ± 1	89 ± 3

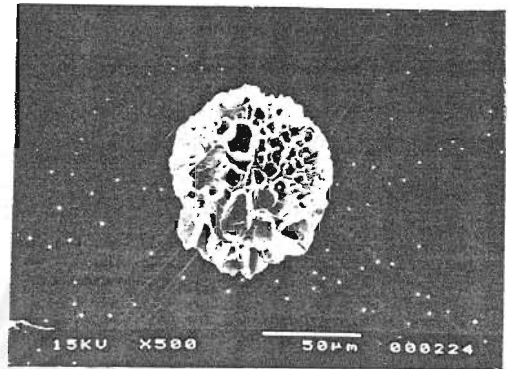


รูปที่ 4.12 ผลของการเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการโพลีเมอไรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

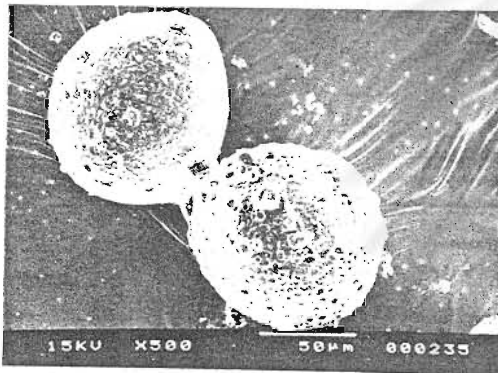
เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์



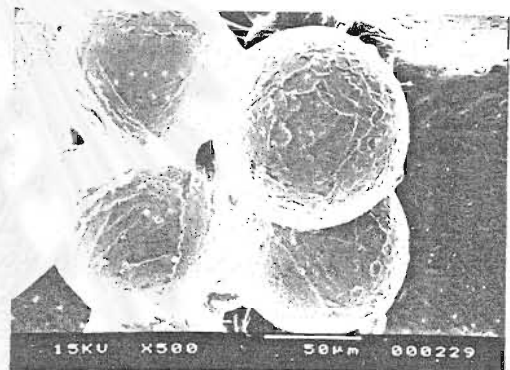
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.13 ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่เวลาในการทำโพลีเมอร์ไรเซชันต่าง ๆ กัน

(ก) 1 (ข) 2 (ค) 3 (ง) 4 ชั่วโมง

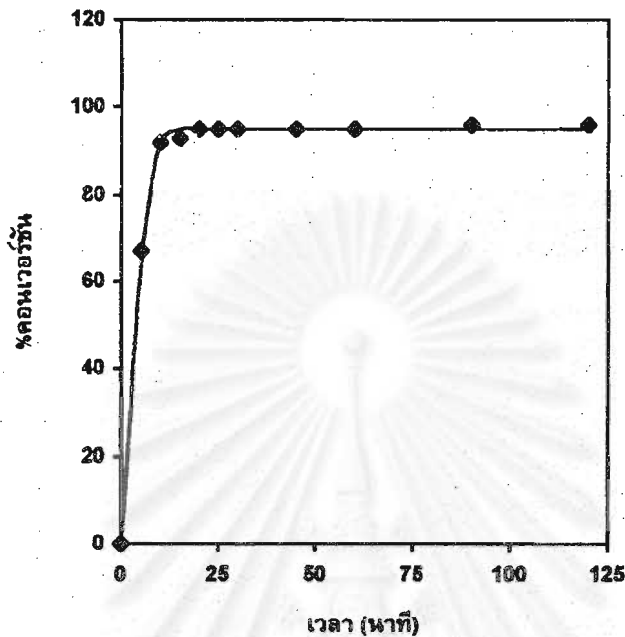
เวลาที่ใช้ ทำโพลีเมอร์ไรเซชันมีผลต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ แต่ไม่มีผลต่อคอนเวอร์ชัน จากรูป 4.13 เป็นรูป SEM แสดงถึงความแตกต่างของบีดที่สังเคราะห์ได้ที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยบีดมีขนาด 80-100 μm บีดที่โพลีเมอร์ไรซ์ 1 และ 2 ชั่วโมง มีลักษณะเป็นรูพรุนมากกว่าบีดที่สังเคราะห์ที่เวลานานกว่า บีดที่มีรูพรุนสูงมีผลต่อความสามารถในการผ่านเข้ารูพรุนของสับสเตรตเพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่บนโพลีเมอร์และปล่อยผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำได้ออกนอกบีด ดังนั้นจึงพบว่าที่เวลาโพลีเมอร์ไรเซชัน 2 ชั่วโมง ให้ฤทธิ์สูงสุดและใช้เวลาดังกล่าวสำหรับศึกษาตัวแปรถัดไป

4.7.2 ต่อเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันและการเกิดปฏิกิริยาเมื่อเวลาเปลี่ยนไป

ความเข้มข้นของโมโนเมอร์ที่เหลืออยู่ถูกวิเคราะห์และใช้คำนวณหาคอนเวอร์ชันต่อเวลาที่ใช้ในการทำโพลีเมอไรเซชัน โดยหาปริมาณโมโนเมอร์ที่เหลือจากเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในหน่วยที่ 2 แสดงกราฟมาตรฐานของอะคริลาไมด์โมโนเมอร์ HPLC โครมาโทแกรมของอะคริลาไมด์มาตรฐาน และโมโนเมอร์ที่เหลือในแต่ละช่วงเวลาที่สุ่มมาทดสอบ ความชันของกราฟมาตรฐานอะคริลาไมด์โมโนเมอร์คือ 9.63×10^6 ปริมาตรของปฏิกิริยา ปริมาณโมโนเมอร์และปริมาณที่ฉีดเข้า HPLC คือ 246 ซม^3 , 8.0206 กรัม และ $5 \times 10^{-3} \text{ ซม}^3$ ตามลำดับ ปริมาณโมโนเมอร์ที่เหลือและเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันคำนวณได้จากสมการที่ 2.3 และ 2.4 ผลการทดลองพบว่าคอนเวอร์ชันของอะคริลาไมด์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เกิดขึ้นหลังจากเวลาโพลีเมอไรเซชันผ่านไปได้ 10 นาที เมื่อโพลีเมอไรเซชัน 2 ชั่วโมงได้ค่าคอนเวอร์ชัน 96 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.6 และรูป 4.14

ตารางที่ 4.6 ผลของคอนเวอร์ชันต่อเวลาที่ใช้ในการทำโพลีเมอไรเซชันของโพลีอะคริลาไมด์

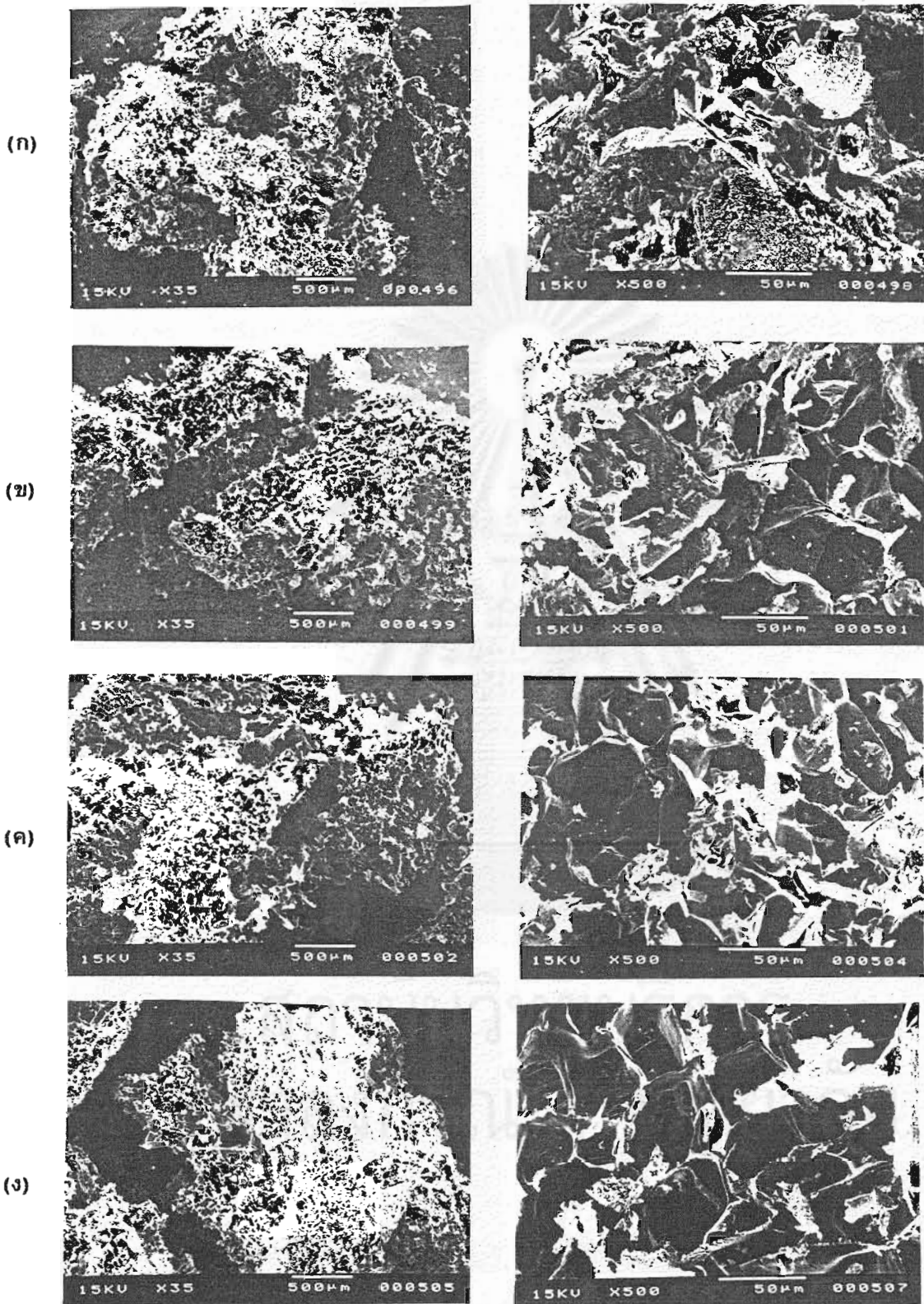
เวลา (นาที)	พื้นที่ใต้พีค	เปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชัน
5	454804	67
10	112149	92
15	102516	93
20	71580	95
25	76824	95
30	74990	95
45	69396	95
60	69042	95
90	53864	96
120	65660	96



รูปที่ 4.14 ผลของคอนเวอร์ชันต่อเวลาที่ใช้ในการโพลิเมอไรเซชันโพลิอะคริลาไมด์

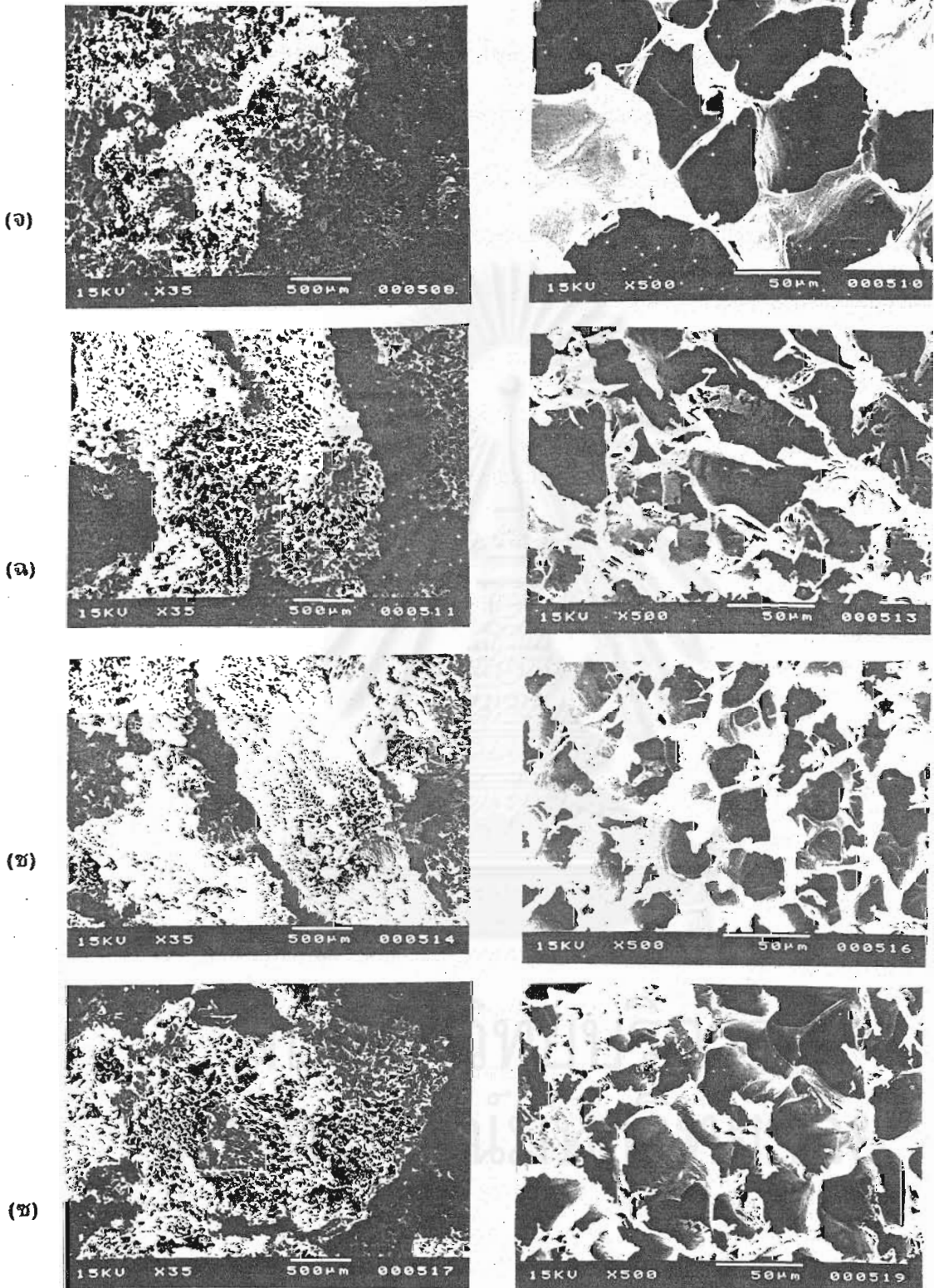
Hunkerler [54] ศึกษาอัตราการทำโพลิเมอไรเซชันของอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นสูง ๆ โดยโพลิเมอไรเซชันอะคริลาไมด์โดยวิธีอินเวอร์สซัสเพนชันโพลิเมอไรเซชัน ใช้โพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟตเป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา ทำโพลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ $40-60^{\circ}\text{C}$. ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต 0.2 มิลลิโมลาร์ อะคริลาไมด์ 6.41-3.35 มิลลิโมลาร์มีค่าคอนเวอร์ชันอยู่ในช่วง 92.0-99.7 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยนี้ใช้เวลาในการทำโพลิเมอไรเซชัน 2 ชั่วโมงเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดโดยสมบูรณ์และสามารถตรึงเอนไซม์สูงสุด การเกิดบีดที่เวลาต่าง ๆ กันดูได้จาก SEM ดังรูปที่ 4.15 โพลิอะคริลาไมด์มีลักษณะเป็นแผ่นมีรูพรุน การเก็บโมโนเมอร์ที่เหลืออยู่ในแต่ละช่วงเวลาเป็นการรบกวนระบบการเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชันจึงทำให้บีดไม่สามารถเกิดเป็นทรงกลมได้ภายหลังปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชันสิ้นสุด



รูปที่ 4.15 ภาพ SEM ของการเกิดมดที่เวลาต่าง ๆ กัน (ก) 5 (ข) 10 (ค) 15 (ง) 30 (จ) 45 (ฉ) 60

(ช) 90 (ซ) 120 นาที ซ้าย : กำลังขยาย 35 เท่า ขวา : กำลังขยาย 500 เท่า



รูปที่ 4.15 (ต่อ) ภาพ SEM ของการเกิดมดที่เวลาต่าง ๆ กัน (ก) 5 (ข) 10 (ค) 15 (ง) 30 (จ) 45

(ฉ) 60 (ช) 90 (ฅ) 120 นาที ซ้าย : กำลังขยาย 35 เท่า

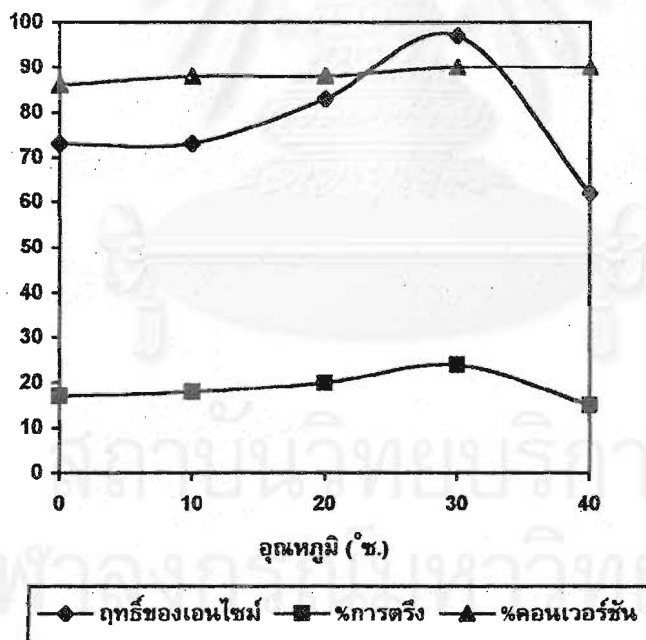
ขวา : กำลังขยาย 500 เท่า

4.8 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการทำโพลีเมอไรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

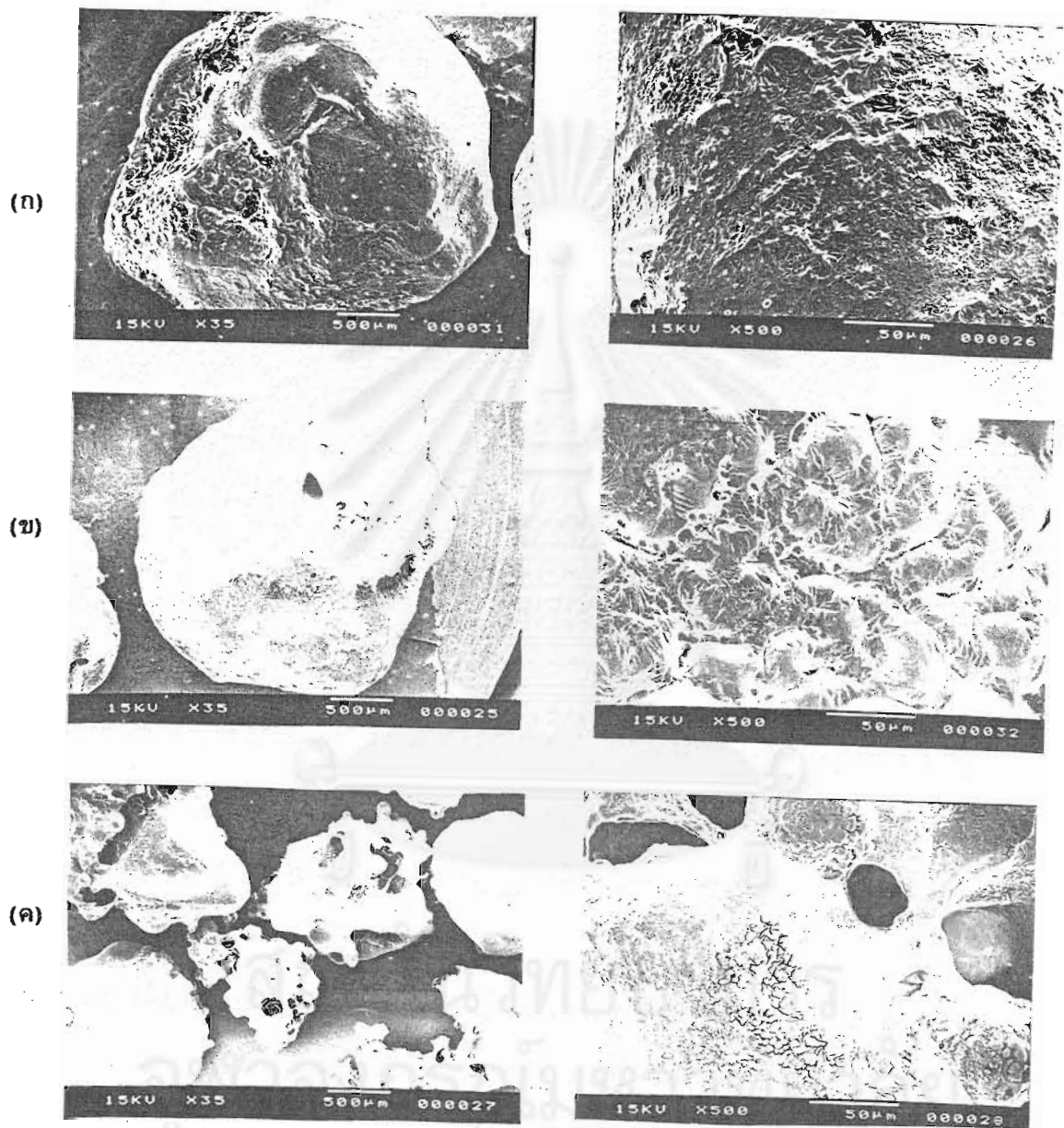
ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการทำโพลีเมอไรเซชันที่ 0, 10, 20, 30, และ 40°C. โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ AM (3.14 mM) แอลคาไลน์โปรตีเอส (1.5 mg/5 cm³), MBA (120 mM), APS (6.56 mM) TEMED (95.50), Pluronic PE 8100 (10.6 mM) อัตราการกวน 300 rpm เวลาในการทำโพลีเมอไรเซชัน 2 ชั่วโมง ตาราง 4.7 และ 4.16 แสดงฤทธิ์ของเอนไซม์เปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันของอะคริลาไมด์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับการโพลีเมอไรเซชัน อุณหภูมิ 30°C. เป็นอุณหภูมิที่สามารถตรึงเอนไซม์ให้ฤทธิ์สูงสุด 97 ยูนิต มีเปอร์เซ็นต์การตรึง 24% และมีเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชัน 90% เปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ (0°C.) อัตราการเริ่มปฏิกิริยาช้าทำให้ได้คอนเวอร์ชันต่ำ เปอร์เซ็นต์การตรึงเอนไซม์สูงสุดเมื่ออุณหภูมิ 30°C. เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอีกฤทธิ์ของเอนไซม์จะลดลง ทั้งนี้ที่อุณหภูมิต่ำการเคลื่อนที่ของเอนไซม์จะช้ากว่าการตรึงเอนไซม์จึงน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 30°C. ที่อุณหภูมิสูง(สูงกว่า 40°C.) เอนไซม์สูญเสียฤทธิ์เนื่องจากการสูญเสียสภาพของโปรตีน พิจารณาลักษณะบีดจากภาพ SEM ดังรูป 4.17 บีดมีขนาดใหญ่เมื่ออุณหภูมิในการทำโพลีเมอไรเซชันลดลงที่อุณหภูมิต่ำ พลังงานกระตุ้น (activation energy) จะไม่เพียงพอสำหรับตัวเริ่มปฏิกิริยา ตัวเชื่อมขวางโมโนเมอร์และเอนไซม์ ดังนั้นการเคลื่อนไหวจึงช้า เมื่อมีการเริ่มปฏิกิริยาเกิดขึ้นจะทำให้เกิดการโพลีเมอไรซ์ที่จุดเดิมจึงทำให้ได้บีดที่มีขนาดใหญ่ ที่อุณหภูมิสูง (40°C.) การเคลื่อนไหวจะเร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำจึงทำให้เกิดการเจริญเติบโต (propagate) หลายสายโซ่บีดจึงมีขนาดเล็ก นอกจากนี้บีดที่สังเคราะห์ที่อุณหภูมิสูงจะมีรูพรุนทำให้สับสเตรตสามารถผ่านเข้าออกรูพรุนเพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลีอะคริลาไมด์ได้ง่าย จึงแสดงค่าฤทธิ์ของเอนไซม์สูงกว่าบีดที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์คือ 30°C. และใช้อุณหภูมินี้ศึกษาตัวแปรถัดไป

ตารางที่ 4.7 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการโพลีเมอไรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์ การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสบนเม็ดโพลีอะคริลาไมด์

อุณหภูมิ (°ซ.)	ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต)	เปอร์เซนต์ การตรึง	เปอร์เซนต์ คอนเวอร์ชัน
0	73 ± 2	17 ± 1	86 ± 2
10	73 ± 4	18 ± 1	88 ± 2
20	83 ± 2	20 ± 1	88 ± 3
30	97 ± 1	24 ± 1	90 ± 2
40	62 ± 1	15 ± 1	90 ± 1



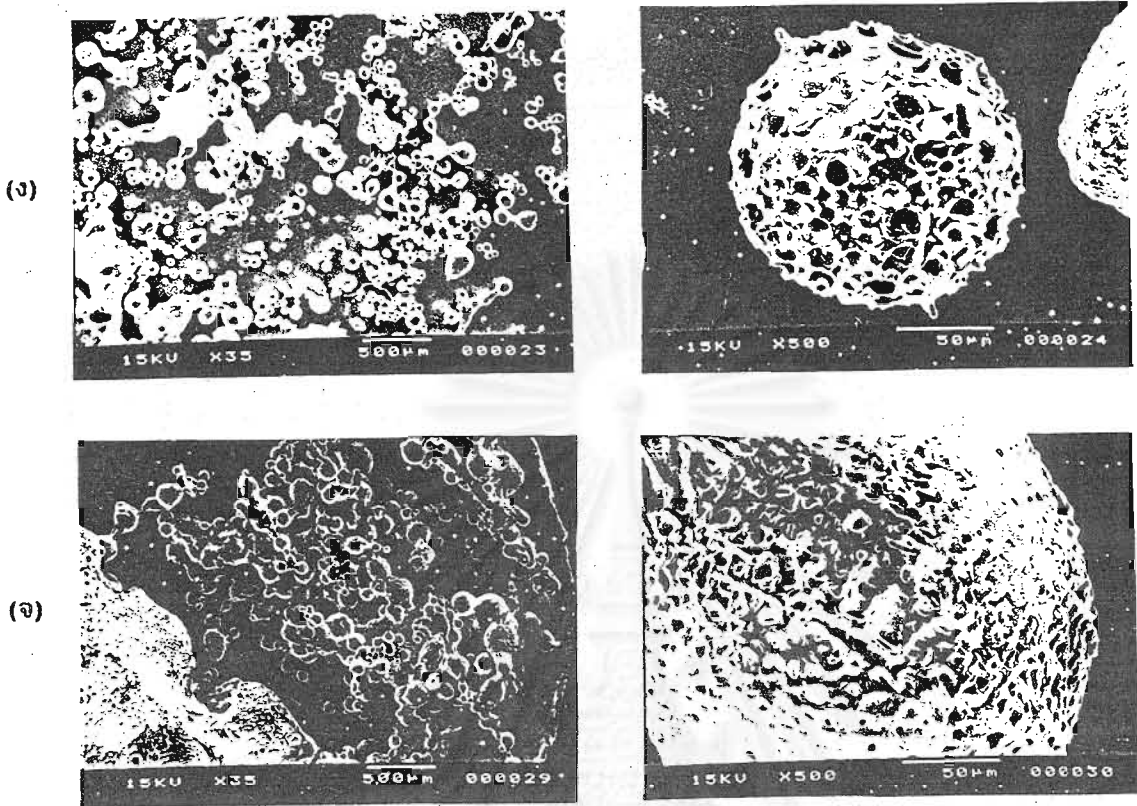
รูปที่ 4.16 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการโพลีเมอไรเซชันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสบนเม็ดโพลีอะคริลาไมด์



รูปที่ 4.17 ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่อุณหภูมิที่ใช้ในการทำโพลีเมอไรเซชันต่าง ๆ กัน

(ก) 0°ซ. (ข) 10°ซ. (ค) 20°ซ. (ง) 30°ซ. (จ) 40°ซ.

ซ้าย : กำลังขยาย 35 เท่า ขวา : กำลังขยาย 500 เท่า



รูปที่ 4.17 (ต่อ) ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่อุณหภูมิที่ใช้ในการทำโพลีเมอไรเซชันต่าง ๆ กัน

(ก) 0°ซ. (ข) 10°ซ. (ค) 20°ซ. (ง) 30°ซ. (จ) 40°ซ.

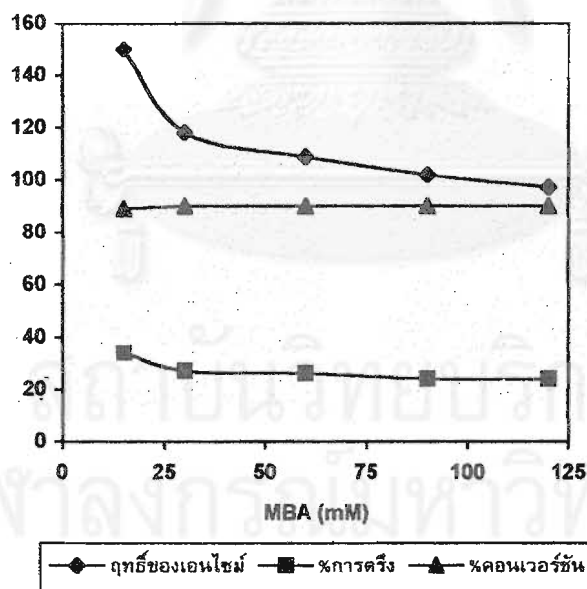
ซ้าย : กำลังขยาย 35 เท่า ขวา : กำลังขยาย 500 เท่า

4.9 ผลการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นตัวเชื่อมขวางต่อฤทธิ์เอนไซม์

N,N' -methylene-bis-acrylamide (MBA) ใช้เป็นตัวเชื่อมขวาง ตาราง 4.8 และรูปที่ 4.18 แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น AM (3.14 mM) แอลคาไลน์โปรตีเอส ($1.5 \text{ mg}/5 \text{ cm}^3$), APS (6.56 mM), TEMED (95.50 mM), Pluronic PE 8100 (10.6 mM) อัตราการกวน 300 rpm เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำโพลีเมอไรเซชัน 2 ชั่วโมงที่ 30°ซ. ฤทธิ์ของเอนไซม์ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ MBA จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความแข็งของโพลีอะคริลาไมด์ เนื่องจากเกิดโครงร่าง

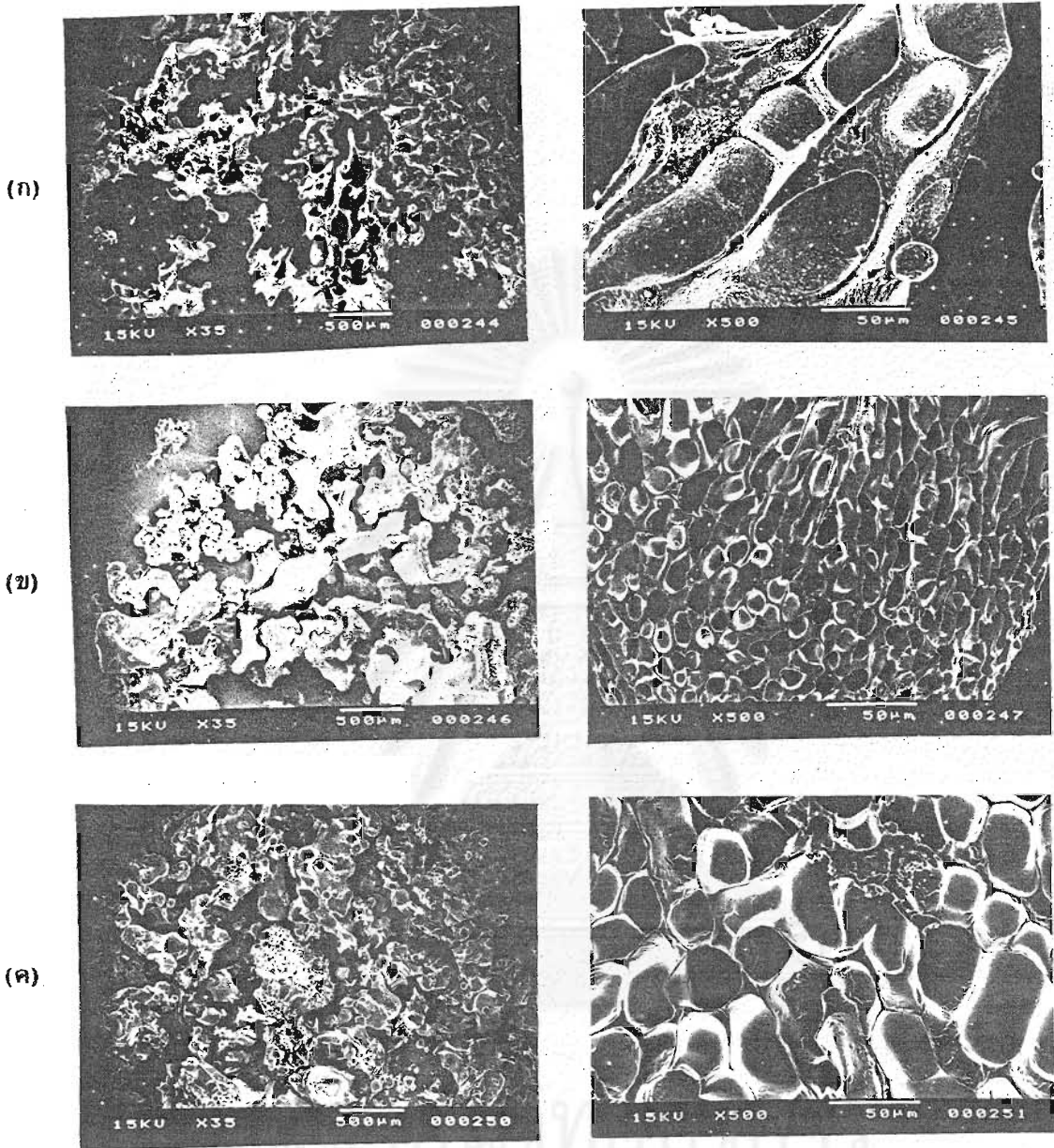
ตารางที่ 4.8 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นตัวเชื่อมขวางต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึงและเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์

ความเข้มข้นของMBA (mM)	ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต)	เปอร์เซนต์ การตรึง	เปอร์เซนต์ คอนเวอร์ชัน
15	150 ± 2	34 ± 1	89 ± 2
30	118 ± 4	27 ± 1	89 ± 1
60	109 ± 1	26 ± 1	90 ± 2
90	102 ± 2	24 ± 1	90 ± 3
120	97 ± 1	24 ± 1	90 ± 2



รูปที่ 4.18 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นตัวเชื่อมขวางต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง

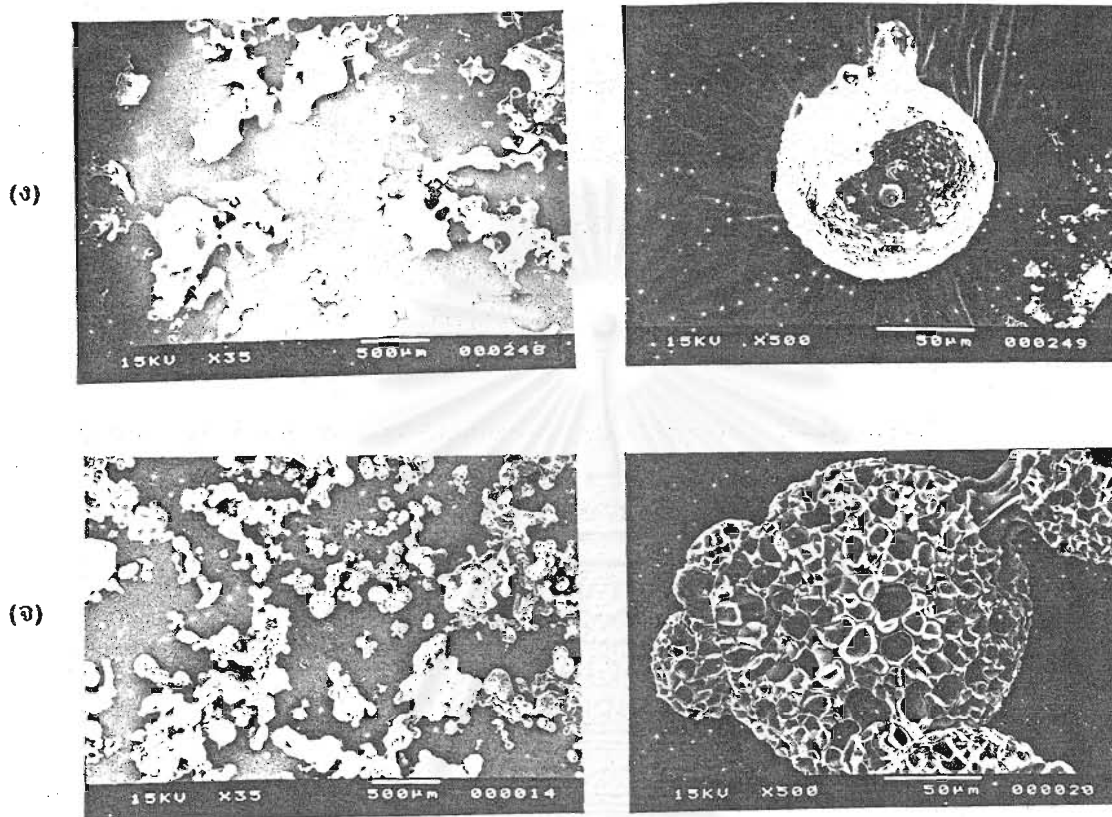
และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์



รูปที่ 4.19 ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นของตัวเชื่อมขวาง ต่าง ๆ กัน

(ก) 15 (ข) 30 (ค) 60 (ง) 90 (จ) 120 มิลลิโมลาร์

ซ้าย : กำลังขยาย 35 เท่า ขวา : กำลังขยาย 500 เท่า



รูปที่ 4.19 (ต่อ) ภาพ SEM ของโพลีเอคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นของตัวเชื่อมขวางต่าง ๆ กัน

(ก) 15 (ข) 30 (ค) 60 (ง) 90 (จ) 120 มิลลิโมลาร์ ช้ำย : กำลังขยาย 35 เท่า

ขวา : กำลังขยาย 500 เท่า

ตาข่ายเกิดขึ้น โพลีเอคริลาไมด์ที่มี MBA 120 มิลลิโมลาร์ให้ฤทธิ์ของเอนไซม์ 97 ยูนิต มีเปอร์เซ็นต์การตรึง 24% ขณะที่ปัดที่มี MBA 15 มิลลิโมลาร์ให้ฤทธิ์ของเอนไซม์ 150 ยูนิตและมีเปอร์เซ็นต์การตรึง 34%

Jayakumari และ Pillai [19] ตรึงปาเปนนโพลิสไตรีน-ไดไวนิลเบนซีน (DVB) และไดไวนิลเบนซีน-อะคริลาไมด์ที่มีตัวเชื่อมขวางอยู่ด้วย โดยวิธี Dicyclexylcarbodiimide (DCC) ได้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเชื่อมขวางต่อฤทธิ์ของเอนไซม์และปริมาณการตรึง พบว่าฤทธิ์ของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับความแข็งของโพลีเมอร์ที่เป็นตัวพุง ฤทธิ์ของเอนไซม์และปริมาณเอนไซม์ของไดไวนิลเบนซีน-

อะคริลาไมด์ที่มีตัวเชื่อมขวางอยู่ด้วยสูงกว่าโพลิสไตรีน-ไดไวนิลเบนซีน เนื่องจากว่าไดไวนิลเบนซีน-อะคริลาไมด์ มี hydrophilic nature สูงกว่า

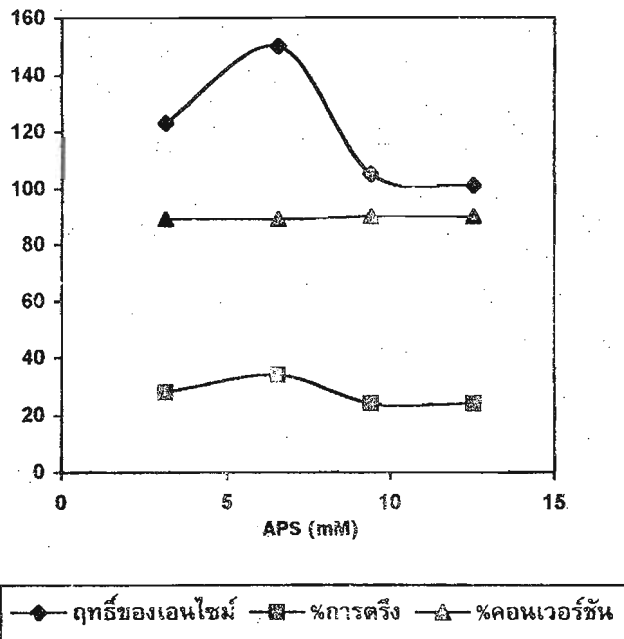
เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันมีค่าคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ MBA ลักษณะของโพลีอะคริลาไมด์ดูได้จาก SEM ดังรูป 4.19 บัดมีลักษณะทรงกลมมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ MBA เพิ่มขึ้น ในการศึกษาตัวแปรถัดไปเพื่อหาภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการตรึงเอนไซม์บนโพลีอะคริลาไมด์จะใช้ความเข้มข้นของ MBA 15 มิลลิโมลาร์

4.10 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเริ่มปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate, APS) ใช้เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา ตาราง 4.9 และรูปที่ 4.20 แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเริ่มปฏิกิริยาที่ 3.13, 6.56, 9.39 และ 12.52 มิลลิโมลาร์ต่อฤทธิ์เอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน กำหนดให้ความเข้มข้นของ AM (3.14 mM) แอลคาไลน์โปรตีเอส (1.5 mg/5 cm³) MBA (15 mM) TEMED (95.50 mM) Pluronic PE 8100 (5.6 mM) อัตราการกวน 300 prm เวลา 2 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30^oซ. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ APS ฤทธิ์ของเอนไซม์และเปอร์เซนต์การตรึงจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีความเข้มข้นของ APS 6.56 มิลลิโมลาร์ จะให้ฤทธิ์สูงสุดจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น APS มากขึ้นพบว่าฤทธิ์ของเอนไซม์ลดลง การเพิ่มความเข้มข้น

ตารางที่ 4.9 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเริ่มปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์

ความเข้มข้นของ APS (mM)	ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต)	เปอร์เซนต์ การตรึง	เปอร์เซนต์ คอนเวอร์ชัน
3.13	123 ± 4	28 ± 1	89 ± 1
6.56	150 ± 2	34 ± 1	89 ± 2
9.39	105 ± 1	24 ± 1	90 ± 3
12.52	101 ± 1	24 ± 1	90 ± 3

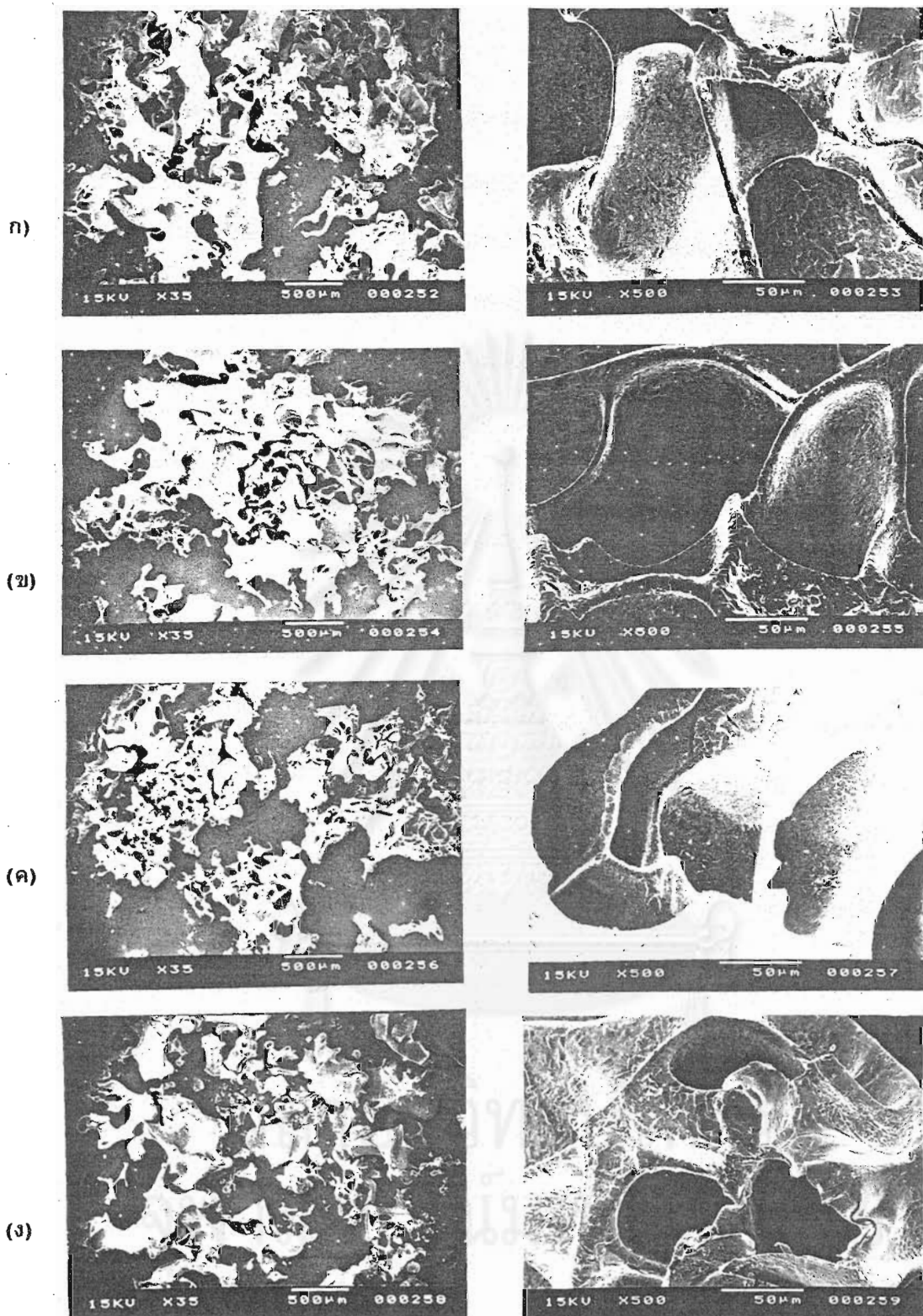


รูปที่ 4.20 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเริ่มปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

เปอร์เซ็นต์การตรึง เปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส

บนบีดโพลีอะคริลาไมด์

APS เป็นการเพิ่มจำนวนแรดดิคัล (radical) ซึ่งทำให้อัตราการโพลิเมอไรเซชันเพิ่มขึ้นทำให้ได้สายโซ่สายสั้น ๆ จำนวนมาก ความสามารถในการตรึงเอนไซม์บนโพลิเมอร์ที่มี hydrophilic nature สูงจะลดลง เนื่องจากโพลิเมอร์มีสายโซ่สายสั้น ๆ จำนวนมาก การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ APS ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชัน จากรูป 4.21 แสดง SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นของตัวเริ่มปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน



รูปที่ 4.21 ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นของตัวเริ่มปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน

(ก) 3.13 (ข) 6.56 (ค) 9.39 (ง) 12.52 มิลลิโมลาร์

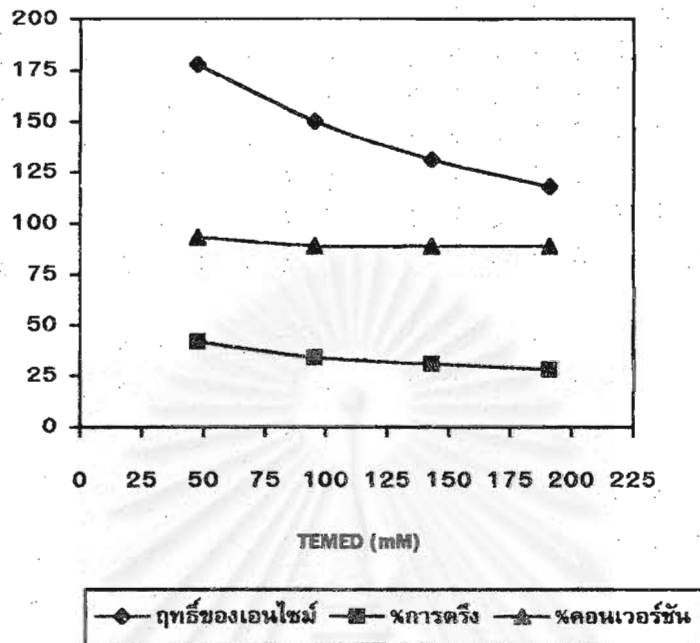
ซ้าย : กำลังขยาย 35 เท่า ขวา : กำลังขยาย 500 เท่า

4.11 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) ใช้ร่วมกับแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตเป็นตัวเริ่มปฏิกิริยาแบบรีดอกซ์ (redox initiator) โดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ TEMED ที่ 47.75, 95.50, 143.25, และ 191.05 มิลลิโมลาร์ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ AM (3.14 mM) แอลคาไลน์โปรตีเอส (1.5 mg/5 cm³) MBA (15 mM) APS (6.56 mM) Pluronic PE 8100 (10.6 mM) อัตราการกวน 300 rpm เวลา 2 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30°C. ตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.22 แสดงฤทธิ์ของเอนไซม์เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ TEMED เพิ่มขึ้น ฤทธิ์ของเอนไซม์และเปอร์เซนต์การตรึงลดลง ฤทธิ์ของเอนไซม์สูงสุดที่ความเข้มข้นของ TEMED 47.75 มิลลิโมลาร์ ให้ฤทธิ์ 178 ยูนิต คอนเวอร์ชันและการตรึงเอนไซม์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ TEMED เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.10 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์

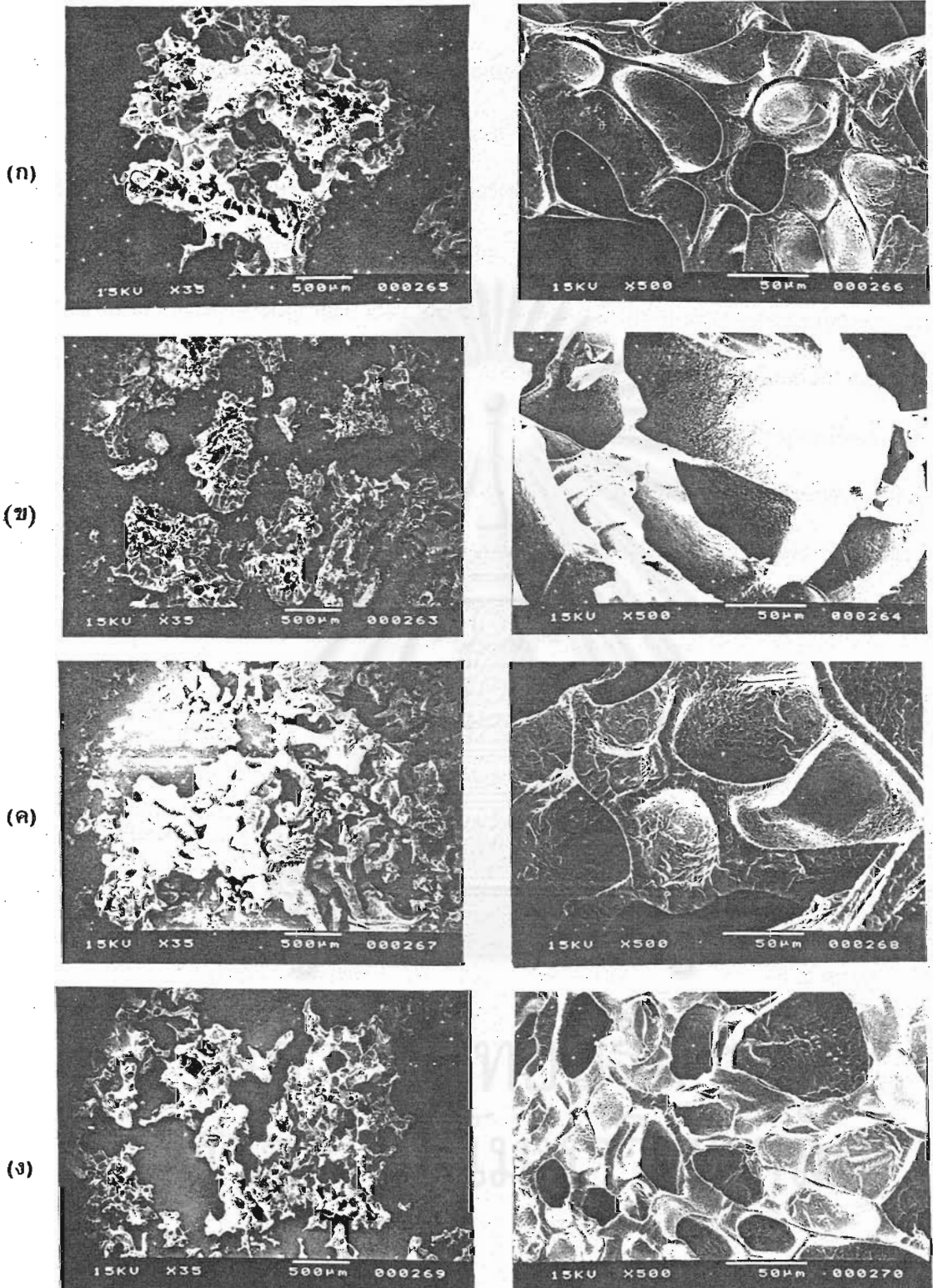
ความเข้มข้นของ TEMED (mM)	ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต)	เปอร์เซนต์การตรึง	เปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน
47.75	178 ± 2	42 ± 1	93 ± 2
95.50	150 ± 2	34 ± 1	89 ± 2
143.25	131 ± 4	31 ± 1	89 ± 3
191.05	118 ± 1	28 ± 1	89 ± 1



รูปที่ 4.22 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

เปอร์เซ็นต์การตรึง และเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส บนเบ็ดโพลีอะคริลาไมด์

การเพิ่มปริมาณ TEMED เป็นการเพิ่มจำนวนเรดดิคัลในการเริ่มปฏิกิริยาและเพิ่มอัตราเร็วในการเกิดโพลิเมอร์โซเชชัน จึงทำให้ได้โพลีอะคริลาไมด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจำนวนมากและละลายน้ำได้ ซึ่งมีผลทำให้คอนเวอร์ชันลดลง รูปที่ 4.23 แสดงภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่มีความเข้มข้น TEMED ต่าง ๆ กัน โพลีอะคริลาไมด์มีลักษณะเป็นแผ่นที่มีรูพรุน การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ TEMED ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโพลิเมอร์



รูปที่ 4.23 ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นตัวเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน

(ก) 47.75 (ข) 95.50 (ค) 143.25 (ง) 191.05 มิลลิโมลาร์

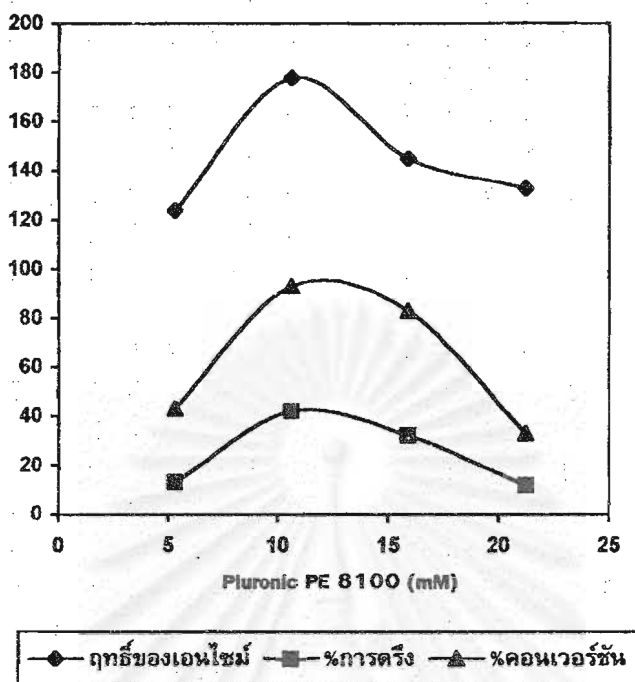
ซ้าย : กำลังขยาย 35 เท่า ขวา : กำลังขยาย 500 เท่า

4.12 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซอร์เฟคเตนต์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

Pluronic PE 8100 ใช้เป็นตัวเซอร์เฟคเตนต์ โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Pluronic PE 8100 ต่าง ๆ กัน สำหรับศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชัน กำหนดให้มีความเข้มข้น AM (31.4 mM) แอลคาไลน์โปรตีเอส (1.5 mg/5 cm³), MBA (15 mM), TEMED (47.75 mM) อัตราการกวน 300 rpm เวลา 2 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 30^oซ. ผลการทดลองพบว่าสามารถตรึงเอนไซม์ได้สูงสุดที่ 178 ยูนิต 42% การตรึงและ 93% คอนเวอร์ชัน ขนาดของบีดมีผลต่อความเข้มข้นของเซอร์เฟคเตนต์ ที่ความเข้มข้นเซอร์เฟคเตนต์ต่ำ ๆ หยดโมโนเมอร์ขนาดเซอร์เฟคเตนต์ที่จะเสถียร (stabilize) หยดโมโนเมอร์ ที่ความเข้มข้นของเซอร์เฟคเตนต์สูง ๆ จะมีหยดโมโนเมอร์ขนาดเล็กจำนวนมาก บีดจะมีทั้งที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและต่ำ บีดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำก็ไม่สามารถเกิดบีดที่คงตัวและตกตะกอนได้ ดังนั้นเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันลดลงเมื่อความเข้มข้นของเซอร์เฟคเตนต์เพิ่มขึ้น ที่ความเข้มข้นของ

ตารางที่ 4.11 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซอร์เฟคเตนต์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์

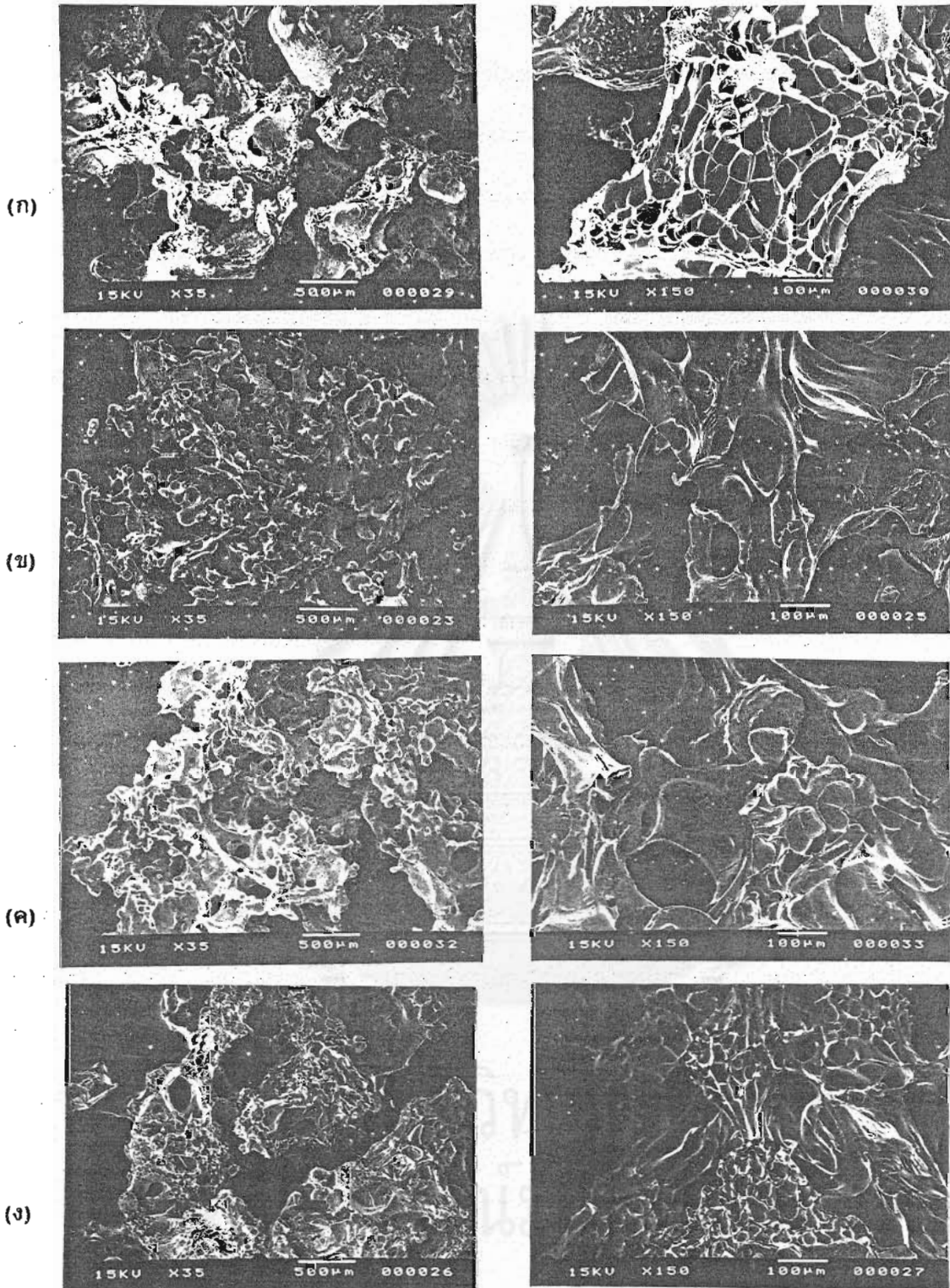
ความเข้มข้นของ Pluronic PE 8100 (mM)	ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต)	เปอร์เซนต์ การตรึง	เปอร์เซนต์ คอนเวอร์ชัน
5.3	124 ± 1	13 ± 1	43 ± 4
10.6	178 ± 2	42 ± 1	93 ± 2
15.9	145 ± 2	32 ± 1	83 ± 5
21.2	133 ± 1	12 ± 1	33 ± 1



รูปที่ 4.24 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซอร์เฟคแตนต์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

เปอร์เซ็นต์การตรึง และเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส บนบีดโพลีอะคริลาไมด์

Pluronic PE 8100 10.6 มิลลิโมลาร์ ให้คอนเวอร์ชันสูงถึง 93% จากรูป 4.25 แสดง SEM ของโพลีอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นของ Pluronic PE 8100 ต่าง ๆ กัน การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซอร์เฟคแตนต์ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโพลีอะคริลาไมด์



รูปที่ 4.25 ภาพ SEM ของโพลีเอครีลาไมด์ที่ความเข้มข้นของเซอร์เฟคเตนท์ต่าง ๆ กัน

(ก) 5.6 (ข) 10.6 (ค) 15.9 (ง) 21.2 มิลลิโมลาร์

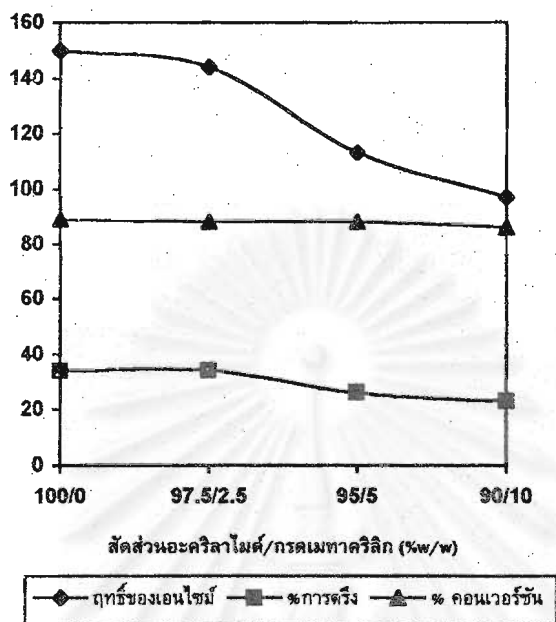
ซ้าย : กำลังขยาย 35 เท่า ขวา : กำลังขยาย 500 เท่า

4.13 ผลของการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอะคริลาไมด์/กรดเมทาคริลิกต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

โดยการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอะคริลาไมด์และกรดเมทาคริลิกที่ 100/0, 97.5/2.5, 95/5 และ 90/10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ AM (3.14 mM), แอลคาไลน์โปรตีเอส (1.5 mg/ 5 cm³), MBA (15 mM), TEMED (95.50 mM), Pluronic PE 8100 (10.6 mM) อัตราการกวน 300 rpm เวลาในการโพลีเมอไรเซชัน 2 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30^oซ. ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4.12 และรูป 4.26 ไม่มีรายงาน reactivity ของโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ในสารละลายคาร์บอนเนต-ไบคาร์บอนเนต pH 10.5 ที่อุณหภูมิ 30^oซ. ให้พิจารณา reactivity ของโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ในเกลือโซเดียมที่อุณหภูมิ 30^oซ. แทน [48] พบว่า r_1 และ r_2 ของอะคริลาไมด์และกรดเมทาคริลิก คือ 0.42 และ 0.59 ตามลำดับ เมื่อ $r_1 r_2 = 0.25$ ($0 < r_1 r_2 < 1$) นั่นคือ $r_1 < 1$ และ $r_2 < 1$ พบว่าโคโพลีเมอไรเซชันอยู่ระหว่างแบบอุดมคติ ($r_1 r_2 = 1$) และแบบสลับ ($r_1 r_2 = 0$) ซึ่งมีแนวโน้มการโคโพลีเมอไรเซชันเป็นแบบสลับมากกว่าแบบอุดมคติ [55] พิจารณาฤทธิ์ของเอนไซม์และเปอร์เซ็นต์การตรึงจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดเมทาคริลิกเพิ่มขึ้น เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลีอะคริลาไมด์ให้ฤทธิ์สูงสุด 150 ยูนิต ในขณะที่ในโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ที่ 97.5/2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักให้ฤทธิ์สูงสุด 144 ยูนิต

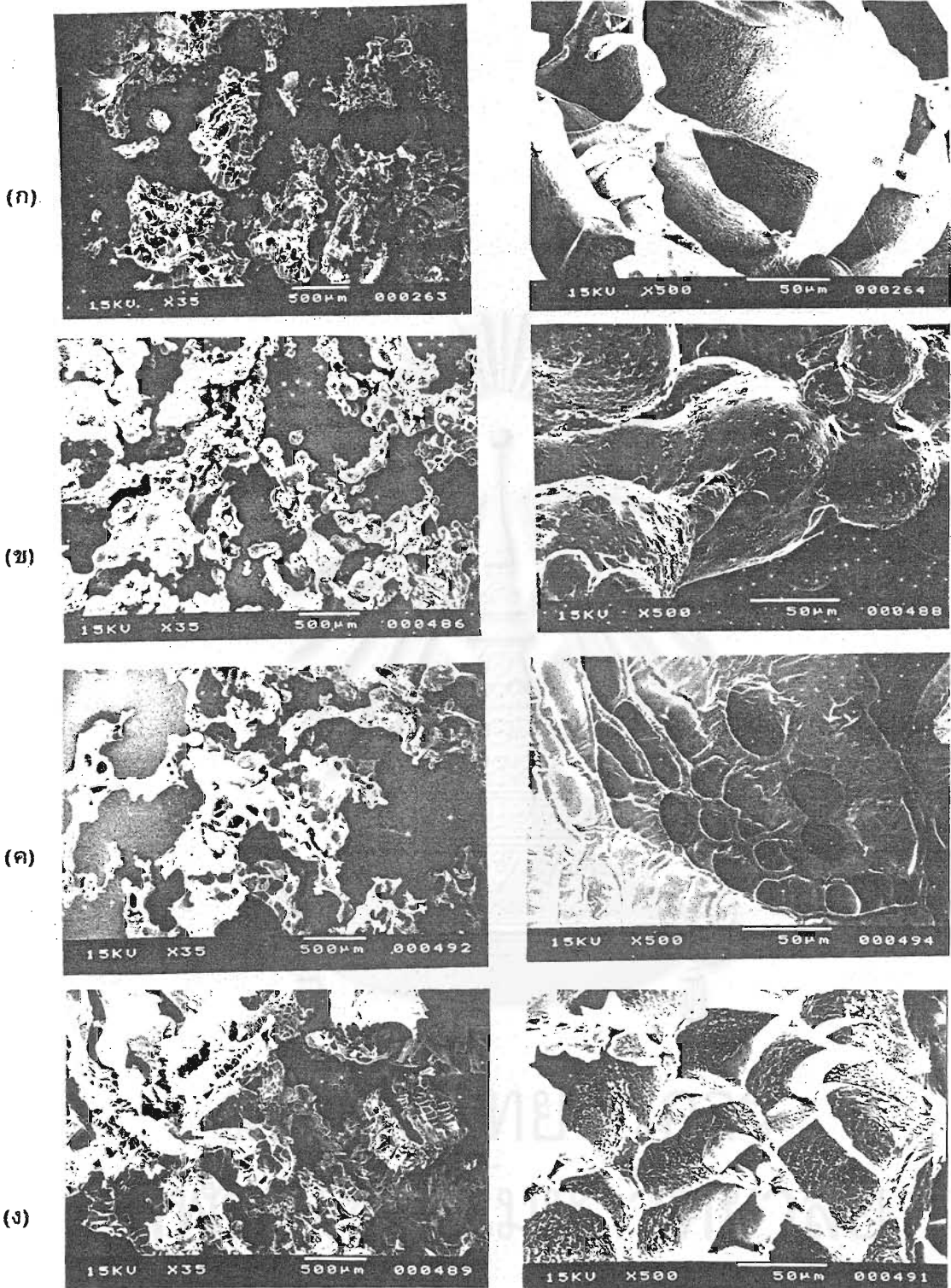
ตารางที่ 4.12 ผลของการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอะคริลาไมด์/กรดเมทาคริลิกต่อฤทธิ์ของเอนไซม์เปอร์เซ็นต์การตรึง และเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)

สัดส่วน AM/MAA (% W/W)	ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต)	เปอร์เซ็นต์ การตรึง	เปอร์เซ็นต์ คอนเวอร์ชัน
100/0	150 ± 2	34 ± 1	89 ± 2
97.5/2.5	144 ± 1	34 ± 1	88 ± 3
95/5	113 ± 2	26 ± 1	88 ± 5
90/10	97 ± 1	23 ± 1	86 ± 3



รูปที่ 4.26 ผลของการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอะคริลาไมด์/กรดเมทาคริลิกต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ เปรอร์เซนต์การตรึง และเปอร์เซนต์คอนเวอร์ชันสำหรับการตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสเบบนิค โพลีอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)

กรดเมทาคริลิกใช้เป็นตัวเพิ่ม hydrophilic ให้กับโพลิเมอร์ การดูดซับน้ำของโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดเมทาคริลิกเพิ่มขึ้น แต่ความแข็งแรงของเจลจะลดลง จึงทำให้ความสามารถในการตรึงเอนไซม์ลดลง คอนเวอร์ชันของโพลิอะคริลาไมด์ไฮโมโพลิเมอร์สูงกว่าโคโพลิเมอร์ของโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)ที่ภาวะทดลองเดียวกัน รูปที่ 4.27 แสดง SEM ของโพลิอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอะคริลาไมด์และกรดเมทาคริลิกไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของบีดโพลิเมอร์



รูปที่ 4.27 ภาพ SEM ของโพลีอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)

(ก) 100/0, (ข) 97.5/2.5, (ค) 95/5, (ง) 90/10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

ซ้าย : กำลังขยาย 35 เท่า ขวา : กำลังขยาย 500 เท่า

4.14 การดูดซึมน้ำ

4.14.1 ในน้ำกลั่นและสารละลายเกลือ

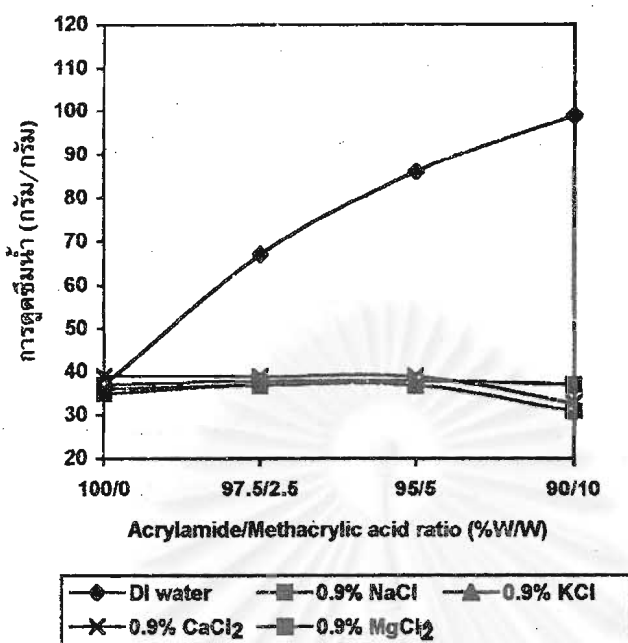
ตารางที่ 4.13 และ รูปที่ 4.28 แสดงผลของการดูดซึมน้ำในน้ำกลั่น, 0.9% NaCl, 0.9% KCl, 0.9% MgCl₂, และ 0.9% CaCl₂ ของโพลีอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ที่ สัดส่วนของอะคริลาไมด์และกรดเมทาคริลิก 100/0, 97.5/2.5, 95/5, และ 90/10 เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนัก การดูดซึมน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดเมทาคริลิกเพิ่มขึ้น กรดเมทาคริลิกเพิ่มความ เป็น hydrophilic พันระไฮโดรเจน และการผลึกกันของประจุ การดูดซึมน้ำมีค่า 37, 67, 86, และ 99 กรัมต่อกรัม สำหรับโพลีอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ที่ 100/0, 97.5/2.5, 95/5, และ 90/10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ

ตารางที่ 4.13 การดูดซึมน้ำของโพลีอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)ในน้ำกลั่น และสารละลายเกลือ

สัดส่วน AM/MAA (% W/W)	สัดส่วนการดูดซึมน้ำ				
	น้ำกลั่น	0.9% NaCl	0.9% KCl	0.9% CaCl ₂	0.9% MgCl ₂
100/0*	37 ± 9	37 ± 3	36 ± 1	39 ± 3	35 ± 2
97.5/2.5*	67 ± 4	38 ± 3	37 ± 4	39 ± 3	37 ± 2
95/5*	86 ± 6	38 ± 2	38 ± 1	39 ± 2	37 ± 3
90/10*	99 ± 6	37 ± 2	37 ± 1	37 ± 4	31 ± 2
90/10**	84 ± 1	30 ± 2	29 ± 2	29 ± 1	22 ± 3

* โพลีเมอร์ที่ได้รับการตรึงเอนไซม์

** โพลีเมอร์ที่ไม่ได้รับการตรึงเอนไซม์



รูปที่ 4.28 การดูดซึมน้ำของโพลีอะครีลาไมด์และโพลี(อะครีลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)ในน้ำกลั่นและสารละลายเกลือ

ความสามารถในการดูดซึมน้ำในน้ำกลั่นและในสารละลายเกลือของโพลีอะครีลาไมด์ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากหมู่เอไมด์ให้ค่าความดันออสโมติกคงที่ การดูดซึมน้ำของโพลี(อะครีลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ในน้ำกลั่นจะสูงกว่าใน 0.9% สารละลายเกลือทั้งหมด การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอะครีลาไมด์/กรดเมทาคริลิกไม่มีผลต่อการดูดซึมน้ำในสารละลายเกลือ ค่า Ionic strength และค่าออกซิเดชันของแคตไอออนไม่มีผลต่อการดูดซึมน้ำ เนื่องจากเมมเบรนของโพลี(อะครีลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)แต่ละตัวแสดงค่าความดันออสโมติกค่อนข้างใกล้เคียงกัน แคตไอออนในสารละลายต่าง ๆ สามารถผ่านเมมเบรนได้เท่า ๆ กันและบางส่วนของแคตไอออนสามารถไปแลกเปลี่ยนไฮโดรเจนในกรดเมทาคริลิกจึงเกิดการเชื่อมขวางของเจลเมมเบรนทำให้ค่าแรงดันออสโมติคลดลง

นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบความสามารถในการดูดซึมน้ำระหว่างที่มีการตรึงเอนไซม์และไม่มีการตรึงเอนไซม์ของโคโพลิเมอร์สัดส่วน 90/10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโพลี(อะครีลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)

ผลแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีผลต่อความสามารถในการดูดซึมน้ำ ซึ่งอาจจะพูดได้ว่าเอนไซม์สามารถเร่งใน โพลีเมอร์ได้โดยใช้ physico-chemical interaction การที่มีเอนไซม์ตั้งอยู่บนโซ่ทำให้ความอิสระของกลุ่ม คาร์บอซีเลกซ์มีน้อยลงที่จะเชื่อมขวางกับแคตไอออนในสารละลายเกลือ เจลโพลีเมอร์ที่ไม่ได้เร่งด้วยเอนไซม์ มีความอิสระของกลุ่มคาร์บอซีเลกซ์มากกว่า จึงให้แคตไอออนเข้าไปเชื่อมขวางได้มากกว่า ทำให้เมมเบรนของ เจลมีความสามารถในการดูดซึมน้ำน้อยลง

4.14.2 ผลของอุณหภูมิต่อการดูดซึมน้ำ

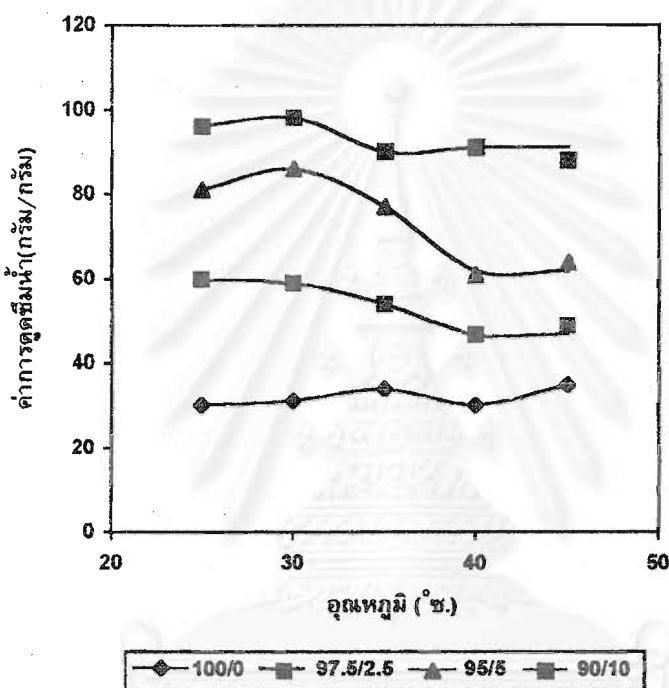
ผลของการดูดซึมน้ำที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรด เมทาคริลิก) แสดงดังตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.29 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมิมีผลต่อโพลี(อะคริ ลามีด์-โค-กรดเมทาคริลิก)แต่ไม่มีผลต่อโพลีอะคริลาไมด์

ตารางที่ 4.14 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการดูดซึมน้ำของโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์ -โค-กรดเมทาคริลิก)

อุณหภูมิ (°ซ.)	สัดส่วนของอะคริลาไมด์/กรดเมทาคริลิก (% W/W)			
	100/0	97.5/2.5	95/5	90/10
25	30 ± 2	60 ± 2	81 ± 6	96 ± 7
30	31 ± 2	59 ± 6	86 ± 9	98 ± 3
35	34 ± 1	54 ± 2	77 ± 1	90 ± 1
40	30 ± 3	47 ± 2	61 ± 2	91 ± 4
45	35 ± 8	49 ± 5	64 ± 2	88 ± 5

Kawaguchi [56] สังเคราะห์โพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ในสารละลาย แอลกอฮอล์พบว่าบีดพองตัวที่อุณหภูมิต่ำและหดตัวเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นมากกว่า 32°ซ. โพลีอะคริลาไมด์และ

โพลีกรดเมทาคริลิก ไม่มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงเช่นนี้ แต่จะเกิดรูปแบบการหดตัวและพองตัวเมื่อนำโมโนเมอร์ทั้งสองชนิดโคโพลิเมอไรเซชัน ทั้งนี้เกิดจากปฏิกิริยาของ hydrophilic ของกรดเมทาคริลิกเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างของหมู่เอไมด์ของไซโพลิอะคริลาไมด์



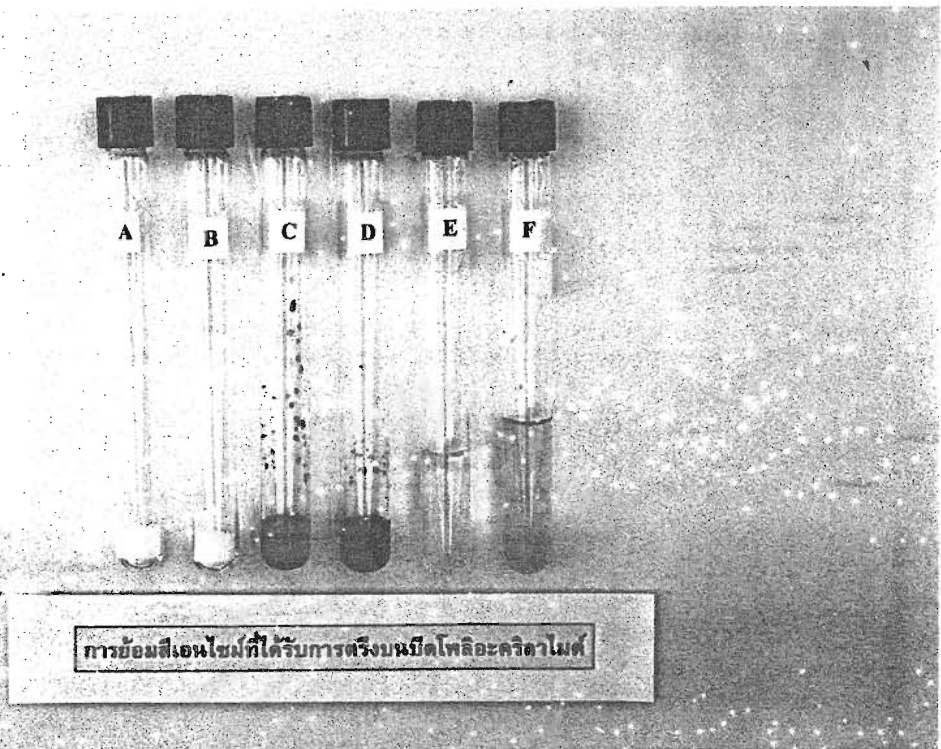
รูปที่ 4.29 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการดูดซึมน้ำของโพลิอะคริลาไมด์และโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)

ความใสของบีดแตกต่างกันเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความใสของบีดเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น โพลิอะคริลาไมด์มีความใสน้อยกว่าโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ความใสเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดเมทาคริลิกเพิ่มขึ้น เนื่องจากโพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) เป็น thermal reversible hydrogel โพลิ(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)มี LCST (Lower Critical Solution Temperature) ที่ประมาณ 30-35°C.

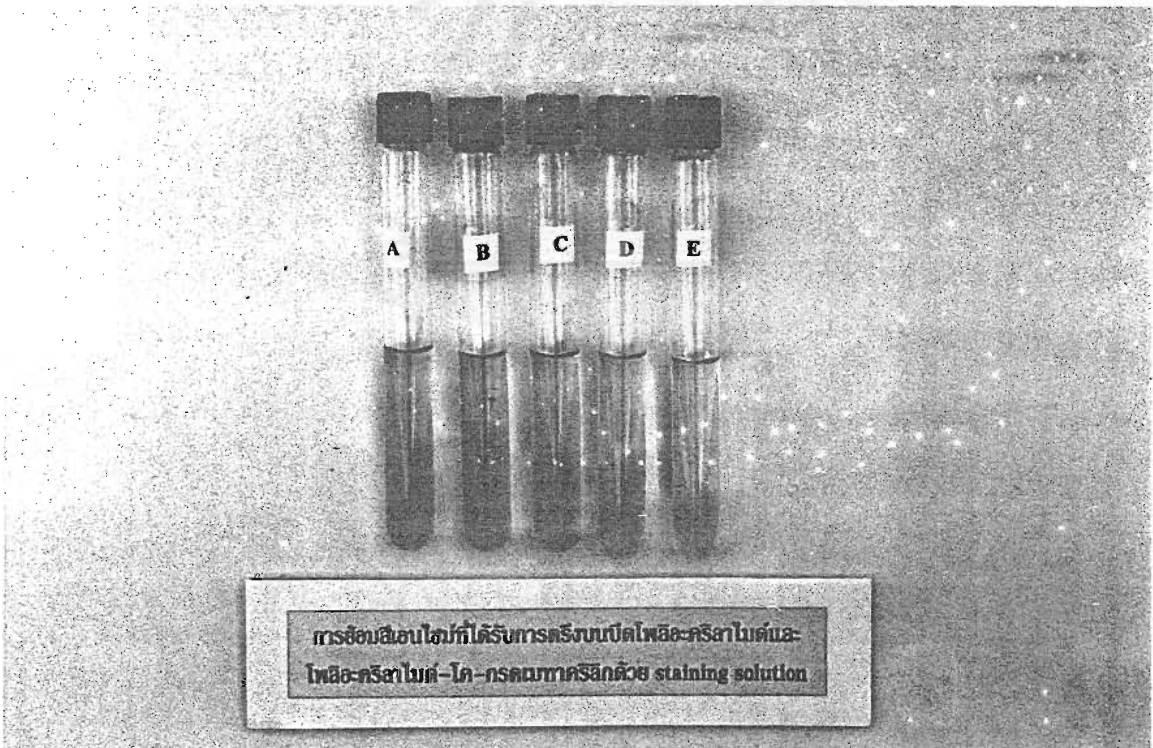
นอกจากนี้ Kawaguchi [56] ยังได้พบว่ามีการพองตัวและหดตัวของโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ที่อุณหภูมิประมาณ 32°C . บิดมีขนาด $3\ \mu\text{m}$ ที่อุณหภูมิต่ำและมีขนาด $0.5\ \mu\text{m}$ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 32°C . นอกจากนี้ Gutowska และคณะ [57] สังเคราะห์ thermosensitive hydrogel ของ N-isopropyl acrylamide, N-isopropylacrylamide/acrylic acid, N-isopropylacrylamide/butyl methacrylate การรวมตัวระหว่างสารที่มีส่วน hydrophobic และ hydrophilic โคลิโนเมอร์มีอิทธิพลต่อการพองและหดตัวของ thermosensitive hydrogel ส่วน hydrophobic ของโคลิโนเมอร์จะเป็นตัวลดอุณหภูมิของเจลที่หดตัว ขณะที่ส่วน hydrophilic ของโคลิโนเมอร์จะเป็นตัวเพิ่มอุณหภูมิของเจลที่หดตัว จากที่กล่าวข้างต้น โพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) เป็น thermal reversible hydrogel มี LCST ซึ่งเป็นผลจากการทำปฏิกิริยาของ hydrophobic กับกรดเมทาคริลิก ทำให้ค่า LCST เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของกรดเมทาคริลิกเพิ่มขึ้น

4.15 การย้อมสีโปรตีน (Protein Staining)

ภายหลังจากการย้อมสีบีดที่ตรงเอ็นไซม์จะเห็นสีน้ำเงินปรากฏขึ้น รูปที่ 4.30 แสดงผลของการย้อมสีโปรตีนของเอ็นไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์ หลอด A, C, E เป็นโพลีอะคริลาไมด์ที่ไม่มีเอ็นไซม์และหลอด B, D, F เป็นหลอดโพลีอะคริลาไมด์ที่มีการตรึงเอ็นไซม์ หลังจากการย้อมสีด้วย staining solution และล้างบีดด้วย destaining solution แล้ว หลอด F บีดมีสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นการย้อมสีของเอ็นไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลีอะคริลาไมด์ เปรียบเทียบกับหลอด E ซึ่งเป็นหลอดของโพลีอะคริลาไมด์ที่ปราศจากการตรึงเอ็นไซม์ บีดมีลักษณะใสไม่มีสี ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอ็นไซม์สามารถตรึงบนโพลีเมอร์ได้ เนื่องจากโพลีเมอร์มีลักษณะเป็นตาข่ายที่แน่นอนหาพอที่จะสามารถตรึงเอ็นไซม์ให้อยู่ในช่องว่างนั้นได้และไม่สามารถหลุดออกผ่านตัวกลางที่อยู่รอบ ๆ ได้ ความเข้มของสีน้ำเงินที่ย้อมโปรตีนสามารถบอกปริมาณเอ็นไซม์เบื้องต้นว่ามีมากหรือน้อยได้ก่อนทำการวิเคราะห์หาปริมาณเอ็นไซม์โดยทดสอบฤทธิ์ของเอ็นไซม์โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรต รูปที่ 4.31 แสดงถึงการย้อมสีของเอ็นไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ที่มีสัดส่วน 100/0, 97.5/2.5, 95/5, และ 90/10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยแสดงเป็นหลอด A-D และมีฤทธิ์ 150, 114, 113, 97 ยูนิิตตามลำดับ



รูปที่ 4.30 การย้อมสีโปรตีนบนเม็ดโพลีอะคริลาไมด์



รูปที่ 4.31 การย้อมสีโปรตีนบนเม็ดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)

หลอด E เป็นหลอดที่โพลีเมอร์ปราศจากเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสีน้ำเงินเข้มขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์ในโพลีเมอร์บีดเพิ่มขึ้น หลอด E ซึ่งเป็นหลอดที่บีดไม่มีเอนไซม์บีดจะไม่มีสี

4.16 ผลของการย่อยโปรตีน

เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) ที่ 97.5/2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเป็นตัวแทนสำหรับศึกษาผลของการย่อยโปรตีนต่าง ๆ โดยใช้เคซีน Bovine Serum Albumin (BSA) เลือด เจลาติน และชนสัตว์ เป็นสับสเตรต เคซีน BSA และเจลาติน มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายคาร์บอนेट-ไบคาร์บอนेटบัฟเฟอร์โดยให้มีปริมาณชนสัตว์ 0.020 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 1 ซม³ แอลคาไลน์โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหมักฟอกเป็นเวลาช้านาน โดยใช้เอนไซม์สำหรับกำจัดโปรตีนที่อยู่บนร่างกายและผิวหนัง จากอาหารต่าง ๆ เช่น นม ไข่ เนื้อ ปลา เป็นต้น [2] ในกระบวนการซักล้างเอนไซม์สามารถใช้ในภาวะที่เป็นด่าง ร่วมกับอุณหภูมิสูง และมีเซอร์เฟกเตนต์อยู่ด้วย งานวิจัยนี้ใช้เคซีน, BSA และเลือดเป็นโปรตีนที่ติดอยู่บนเสื้อผ้า ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.15 โดยแสดงผลในรูป % relative activity (% RA) กำหนดให้ 1.2×10^6 และ 150 ยูนิตของฤทธิ์ของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงมีค่าเท่ากับ 100 %RA ตามลำดับ เอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงมีความสามารถในการย่อยโปรตีนดีกว่าเอนไซม์ที่ได้รับการตรึง เนื่องจากเอนไซม์ถูกตรึงอยู่บนโพลีเมอร์เพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพจากความร้อน ความสามารถในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงจึงช้ากว่าเอนไซม์เอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงและเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงสามารถย่อย เคซีน, BSA, และเลือด ในหัวข้อ 4.17 กล่าวถึงเอนไซม์ถูกตรึงในช่องว่างของโพลีเมอร์และไม่หลุดออกเมื่อทำการล้างหลาย ๆ ครั้ง สับสเตรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถผ่านรูพรุนของตัวพุงโพลีเมอร์เข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์และปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ออกมาออกบีด พิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของ เคซีน, BSA และเลือด ปรากฏว่าเคซีนมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 23,600 [58] น้อยกว่า BSA (ประมาณ 66,000) [59] และเลือด พบว่าฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ย่อยเคซีนสูงกว่า BSA และเลือด นอกจากนี้โปรตีเอสมีบทบาทในอุตสาหกรรมฟอกหนังสัตว์ การวิจัยนี้ใช้เจลาตินและชนสัตว์เป็นตัวแทนโปรตีนที่พบบนหนังสัตว์ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าทั้งเอนไซม์ที่ได้รับการและไม่ได้รับการตรึงไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ เนื่องจากเจลาตินมีลักษณะเป็นเจลไม่สามารถผ่านรูพรุนของตัวพุงโพลีเมอร์ได้ ในชนสัตว์

เอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงสามารถย่อยชนสัตว์ได้ แต่พบว่าเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงไม่สามารถย่อยชนสัตว์ได้ เนื่องจากว่าชนสัตว์ไม่สามารถผ่านรูพรุนโพลีเมอร์เข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ถูกตรึงได้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์สามารถถูกตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)ได้ และคิดว่าเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลีเมอร์ทั้งสองชนิดนี้สามารถนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมผงซักฟอกได้ แต่ไม่เหมาะสมสำหรับอุตสาหกรรมฟอกหนังสัตว์

ตารางที่ 4.15 ผลของการย่อยโปรตีนต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึง

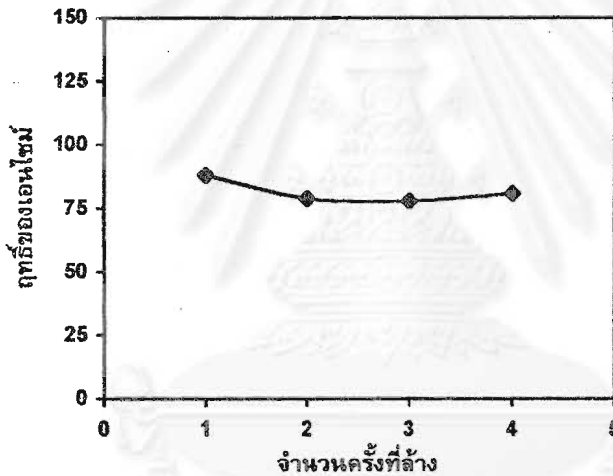
สับสเตรต	% Relative Activity		
	เอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง	เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลีอะคริลาไมด์	เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)
เคซีน	97.4 ± 1.8	99.2 ± 0.6	96.0 ± 0.9
BSA	55.6 ± 1.2	26.8 ± 2.1	22.9 ± 1.3
เจลาติน	-	-	-
เลือด	105.4 ± 1.6	26.7 ± 1.9	25.5 ± 2.3
ชนสัตว์	17.4 ± 0.6	-	-

4.17 เสถียรภาพของเอนไซม์ที่อยู่บนบีดภายหลังจากการชะล้าง

นำบีดที่แห้งและทราบค่าฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์ล้างด้วยสารละลายคาร์บอนेट-ไบคาร์บอนेटบัฟเฟอร์ pH 10.5 จำนวน 1-3 ครั้ง นำบีดที่ชะล้างแต่ละครั้งทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ ผลแสดงดังตาราง 4.16 และรูป 4.32 พบว่าฤทธิ์ของเอนไซม์มีค่าใกล้เคียงกันภายหลังจากการล้างบีดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1-3 ครั้ง แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์สามารถตรึงบนโพลีเมอร์ได้ และไม่หลุดออกภายหลังจากการล้างบีดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

ตารางที่ 4.16 ผลของการล้างบีตหลาย ๆ ครั้งต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

จำนวนครั้งที่ล้าง	ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ยูนิต)
1	88 ± 2
2	79 ± 3
3	78 ± 1
4	81 ± 3



รูปที่ 4.32 ผลของการล้างบีตหลาย ๆ ครั้งต่อแอกติวิตีของเอนไซม์

4.18 ผลของเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

ตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.33 แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45°C . โดยเปลี่ยนแปลง pH ตั้งแต่ 7.5-11.0 เปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึง ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรต วัดปริมาณไทโรซีนที่ปลดปล่อย ในภาคผนวก 3 แสดงถึงกราฟมาตรฐานไทโรซีนที่ pH ต่าง ๆ กัน รายงานผลในรูปแบบ % relative activity (%RA)

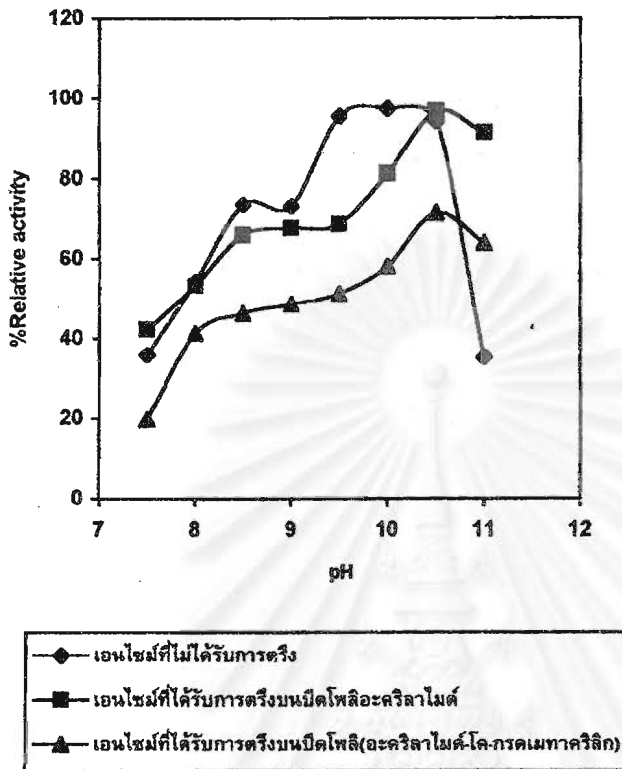
กำหนดให้ ฤทธิ์ของเอนไซม์ 6.3×10^6 และ 172 ยูนิตของเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงและที่ได้รับการตรึงมีค่าเท่ากับ 100 %RA ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงมีฤทธิ์สูงสุดที่ pH 10.0 ขณะที่เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงมีฤทธิ์ของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 10.5

Aunstrup [35] รายงานว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสมีฤทธิ์สูงสุดที่ pH 10.0 ฤทธิ์ของเอนไซม์มากกว่า 80% อยู่ในช่วง pH 8-11 เอนไซม์จะสูญเสียฤทธิ์อย่างรวดเร็วที่ pH ต่ำกว่า 4 และสูงกว่า 11.5

ตารางที่ 4.17 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

pH	% Relative Activity		
	เอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง	เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลีอะครีลาไมด์	เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลี(อะครีลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)
7.5	35.9 ± 2.9	42.3 ± 3.1	19.7 ± 1.2
8.0	54.2 ± 0.9	53.2 ± 0.4	41.4 ± 1.1
8.5	73.5 ± 3.4	65.9 ± 0.8	46.3 ± 2.4
9.0	73.1 ± 1.0	67.7 ± 0.4	48.6 ± 1.2
9.5	95.6 ± 1.2	68.6 ± 1.3	51.1 ± 2.1
10.0	97.4 ± 2.8	81.3 ± 1.4	58.0 ± 0.3
10.5	94.3 ± 2.5	96.6 ± 1.1	71.4 ± 3.3
11.0	35.2 ± 3.0	91.5 ± 1.3	64.0 ± 1.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



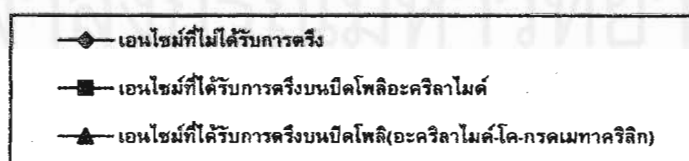
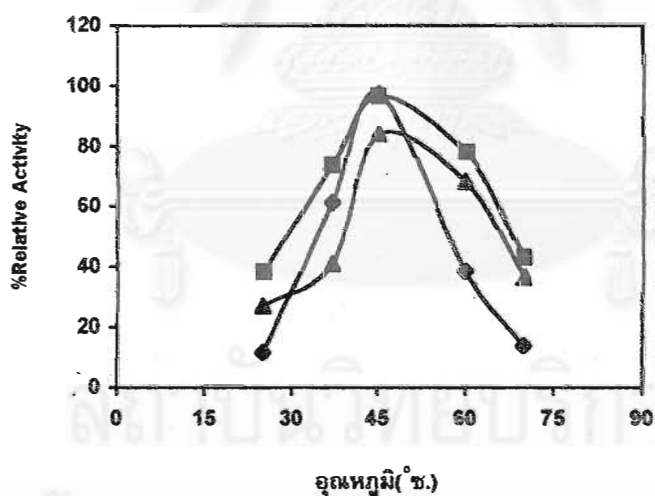
รูปที่ 4.33 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

4.19 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

ตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.34 แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 25 ถึง 70°C. ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึงมีฤทธิ์สูงสุดที่อุณหภูมิ 45°C. ที่อุณหภูมิต่ำเอนไซม์มีความไวในการทำปฏิกิริยาก่อนข้างช้า ในขณะที่อุณหภูมิสูง ๆ เอนไซม์จะสูญเสียสภาพได้ ผลการทดลองรายงานเป็น %RA โดยกำหนดให้ฤทธิ์ของเอนไซม์ 4.4×10^6 และ 172 ยูนิตของเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงและได้รับการตรึงมีค่าเท่ากับ 100%RA พิจารณาที่อุณหภูมิจะพบว่าเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงมีเสถียรภาพดีกว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง เนื่องจากว่าเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงมีโพลิเมอร์เป็นตัวป้องกันไม่ให้เอนไซม์มีการสูญเสียสภาพ

ตารางที่ 4.18 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

อุณหภูมิ (°ซ.)	% Relative Activity		
	เอนไซม์ ที่ไม่ได้รับการตรึง	เอนไซม์ที่ได้รับการตรึง บนโพลีอะคริลาไมด์	เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบน โพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)
25	11.7 ± 0.6	38.3 ± 2.5	27.0 ± 0.9
37	61.2 ± 3.3	73.4 ± 0.6	41.0 ± 0.8
45	97.4 ± 1.3	96.6 ± 1.5	84.0 ± 0.1
60	38.6 ± 2.6	77.8 ± 0.6	68.3 ± 2.1
70	14.0 ± 1.8	43.0 ± 1.5	36.5 ± 0.4



รูปที่ 4.34 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

4.20 ผลของการเก็บรักษาต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

ตารางที่ 4.19 แสดงผลของการเปรียบเทียบเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึงต่อฤทธิ์ของเอนไซม์เมื่อเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C . ถึง 60°C . รายงานผลในรูปฤทธิ์ของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ ภายหลังจากการเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ทุก ๆ สัปดาห์เป็นเวลา 1 เดือน โดยกำหนดให้ฤทธิ์ 1.5×10^4 , 145 และ 124 ยูนิต ของเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง และเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) มีค่าเท่ากับ 100%RA ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลีเมอร์มีเสถียรภาพดีกว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์มีเสถียรภาพดีกว่าเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีดโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) เอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึงสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ถึง 4°C . เป็นเวลา 1 เดือน โดยไม่มีการสูญเสียฤทธิ์ของเอนไซม์ เอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงสูญเสียฤทธิ์ของเอนไซม์ถึง 51% หลังจากการเก็บที่อุณหภูมิ 60°C . เป็นเวลา 1 เดือน ขณะที่เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) สูญเสียฤทธิ์ของเอนไซม์ 37% และ 44% ตามลำดับ เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงมีเสถียรภาพดีกว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง เนื่องจากว่าเอนไซม์มีโพลีเมอร์เป็นเกราะป้องกันการสูญเสียสภาพของเอนไซม์เนื่องจากการย่อยตัวเอง (autodigestion) การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ และความชื้นเป็นกรด-เบส

ตารางที่ 4.19 ผลของการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

อุณหภูมิ (°ซ.)	เอนไซม์	% Relative Activity				
		0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	30 วัน
-20	ที่ไม่ได้รับการตรึง	100.0 ± 1.8	101.3 ± 1.1	99.2 ± 2.8	102.0 ± 0.8	100.8 ± 2.2
	โพลีอะคริลาไมด์	100.0 ± 1.7	99.6 ± 0.4	102.3 ± 0.3	99.9 ± 1.9	101.4 ± 0.7
	โพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)	100.0 ± 2.3	100.6 ± 1.8	100.1 ± 1.5	100.3 ± 1.2	100.4 ± 0.4
4	ที่ไม่ได้รับการตรึง	100.0 ± 1.8	100.1 ± 0.5	100.0 ± 0.3	100.4 ± 1.5	100.0 ± 2.1
	โพลีอะคริลาไมด์	100.0 ± 1.7	100.1 ± 0.7	100.0 ± 1.7	100.1 ± 0.9	100.0 ± 0.3
	โพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)	100.0 ± 2.3	100.2 ± 1.4	100.6 ± 1.5	99.9 ± 2.2	100.1 ± 0.5
25	ที่ไม่ได้รับการตรึง	100.0 ± 1.8	98.3 ± 1.5	94.4 ± 0.5	90.9 ± 1.5	70.7 ± 0.7
	โพลีอะคริลาไมด์	100.0 ± 1.7	101.5 ± 2.1	92.1 ± 0.8	85.6 ± 0.8	79.5 ± 0.9
	โพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)	100.0 ± 2.3	100.2 ± 0.7	97.3 ± 0.7	86.4 ± 0.4	74.8 ± 1.2

สถาบันวิจัยประชากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.19 (ต่อ) ผลของการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันต่อฤทธิ์ของเอนไซม์

อุณหภูมิ (°ซ.)	เอนไซม์	% Relative Activity				
		0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	30 วัน
37	ที่ไม่ได้รับการตรึง	100.0 ± 1.8	97.0 ± 1.3	82.2 ± 0.8	69.1 ± 1.3	59.2 ± 0.8
	โพลีอะคริลาไมด์	100.0 ± 1.7	97.3 ± 0.4	87.8 ± 1.7	78.8 ± 0.9	76.2 ± 2.4
	โพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)	100.0 ± 2.3	96.1 ± 0.9	89.7 ± 2.3	76.8 ± 1.6	70.1 ± 0.5
45	ที่ไม่ได้รับการตรึง	100.0 ± 1.8	78.8 ± 1.5	65.2 ± 2.2	59.4 ± 1.8	55.6 ± 0.7
	โพลีอะคริลาไมด์	100.0 ± 1.7	90.9 ± 1.5	85.4 ± 2.6	77.3 ± 1.1	71.9 ± 1.1
	โพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)	100.0 ± 2.3	89.8 ± 1.6	86.6 ± 3.2	73.9 ± 0.5	63.3 ± 0.3
60	ที่ไม่ได้รับการตรึง	100.0 ± 1.8	60.5 ± 1.3	58.8 ± 0.9	52.9 ± 2.1	49.3 ± 0.7
	โพลีอะคริลาไมด์	100.0 ± 1.7	87.5 ± 0.4	77.0 ± 0.4	73.1 ± 1.7	63.3 ± 0.8
	โพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)	100.0 ± 2.3	84.1 ± 0.8	75.4 ± 1.5	62.8 ± 0.7	58.0 ± 0.6

5.1.4 การดูดซึมน้ำของโพลีอะคริลาไมด์จะต่ำกว่าโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) สำหรับ โคโพลิเมอร์ระหว่างอะคริลาไมด์และกรดเมทาคริลิกพบว่าการดูดซึมน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดเมทาคริลิกเพิ่มขึ้น การดูดซึมน้ำของโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)ในสารละลายเกลือต่าง ๆ จะต่ำกว่าในน้ำกลั่น

5.1.5 เอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึงสามารถย่อยสับสเตรตได้หลายชนิด เช่น เคซีน BSA และเลือด เอนไซม์ที่ได้รับและไม่ได้รับการตรึงไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ เอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงมีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ได้รับการตรึง

5.1.6 เอนไซม์ที่ไม่ได้รับและไม่ได้รับการตรึงมี ฤทธิ์สูงสุดที่อุณหภูมิ 45°C. เอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึงมีฤทธิ์ของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 10 ขณะที่เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงทำงานได้ดีที่ pH 10.5 เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงมีเสถียรภาพดีกว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง

5.1.7 โพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) มีลักษณะเป็นรูพรุน นอกจากนี้พบว่าการสังเคราะห์วิธีนี้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงเกิดขึ้นคือ ปฏิกิริยา imidization ทำให้โพลิเมอร์ละลายน้ำได้ยากขึ้น

5.1.8 เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสามารถตรึงบนโพลิเมอร์ได้และไม่หลุดออกเมื่อล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์หลาย ๆ ครั้ง

5.1.9 เอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลิเมอร์สามารถย้อมสีด้วย staining solution โดยย้อมติดสีน้ำเงิน ความเข้มของสีน้ำเงินบอกถึงปริมาณเชิงคุณภาพของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนโพลิเมอร์ได้ก่อนทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรต

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ขยายสเกลของการตรึงเอนไซม์บนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)

5.2.2 เพิ่มประสิทธิภาพของการตรึงเอนไซม์บนโพลิเมอร์โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดของโมโนเมอร์หรือวิธีการตรึง

5.2.3 ใช้วิธีการตรึงนี้สำหรับการตรึงตัวเร่งปฏิกิริยาอื่น ๆ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

แอลคาไลน์โปรตีเอสสามารถตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์และโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) โดยวิธีอินเวอร์สซัสเพนชันโพลีเมอเรชัน โดยศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโมโนเมอร์ ตัวเชื่อมขวาง เอนไซม์ ตัวเริ่มปฏิกิริยา ตัวเร่งปฏิกิริยาและเซอร์เฟคเตนต์ต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ นอกจากนี้ได้ศึกษาอัตราการกวน เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการโพลีเมอเรชันอีกด้วย งานวิจัยนี้แสดงผลของฤทธิ์ของเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์การตรึง และเปอร์เซ็นต์คอนเวอร์ชันเป็นที่น่าพอใจสำหรับการนำไปใช้งานสำหรับอุตสาหกรรมเทคโนโลยีทางชีวภาพและพบว่าเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงมีเสถียรภาพดีกว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้รับการตรึง

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 ฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของอะคริลาไมด์, N,N'-methylene-bis-acrylamide (MBA), N,N,N',N'-tetraethylmethylenediamine (TEMED) เพิ่มขึ้น ฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น

5.1.2 ภาวะที่สามารถตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลีอะคริลาไมด์ได้สูงสุดประกอบด้วย AM (3.14 mM), แอลคาไลน์โปรตีเอส (1.5 mg/5 cm³), MBA (15 mM), APS (6.56 mM), TEMED (47.75 mM), Pluronic PE 8100 (10.6 mM) , อัตราการกวน 300 rpm เวลา 2 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30^oซ. โดยมีฤทธิ์ของเอนไซม์ 178 ยูนิต, 42% การตรึงและ 93% คอนเวอร์ชัน

5.1.3 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนบีดโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)ที่ 97.5/2.5, 95/5, 90/10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีภาวะเช่นเดียวกับ 5.1.2 ยกเว้นเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ TEMED เป็น 95.5 mM ฤทธิ์ของเอนไซม์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดเมทาคริลิกเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีดโพลีอะคริลาไมด์สูงกว่าเอนไซม์ที่ได้รับการตรึงบนบีดโพลี(อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก)

เอกสารอ้างอิง

1. Kokufuta, E., "Functional Immobilized Biocatalysts," Prog. Polym. Sci., **17**, 647-697, 1992.
2. Aunstrup, K., "Proteinases," in Rose, A. H. (ed.), Economic Microbiology, **Vol. 114**, pp. 49-113, Academic, London, 1980.
3. Kurenkov, V. F., and Myagchenkov, V. A., "Heterophase Polymerization of Acrylamide," Polym. Plast. Technol. Eng., **30(4)**, 367-404, 1991.
4. Thomas, W. M., and Wang, D. W., "Acrylamide Polymers," in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2 nd ed., **Vol. 1**, pp. 169-211, John Wiley & Sons, New York, 1985.
5. Goldstein, L., and Manecke, G., "The Chemistry of Enzyme Immobilization," in Wingard, L. B., Jr., Katchalski-katzir, E., and Goldstein, L. (eds.), Applied Biochemistry and Bioengineering: Immobilized Enzyme Principles, **Vol. 1**, pp. 23-127, Academic, New York, 1979.
6. Johnson, J. C., Immobilized Enzymes: Preparation and Engineering (Recent Advances), Noyes Data, New Jersey, 1979.
7. Bernfeld, P., and Wan, J., "Antigens and Enzymes Made Insoluble by Entrapping Them into Lattices of Synthetic Polymers," Science, **142**, 678-679, 1963.
8. Harrison, L. A., and Flint, K. P., "The Use of Immobilized Enzymes to Detect River Pollutants," in Hopton, J. W., and Hill, E. C. (eds.), Industrial Biological Testing, pp. 181-195, Blackwell Scientific, Oxford, 1987.
9. Park, T. G., and Hoffman, A. S., "Immobilization of *Arthrobacter simplex* in a Thermally Reversible Hydrogels: Effect of Temperature Cycling on Steroid Conversion," Biotechnol. Bioeng., **35**, 152-159, 1990.

10. Chibata, I., Tosa, T. and Sato, T., "Immobilized Aspartase-Containing Microbial Cells: Preparation and Enzymatic Properties," Appl. Microbiol., **27**, 878-885, 1974.
11. Hulst, A. C., Tramper, J., Riet, K., and Westerbeek, J. M. M., "A New Technique for the Production of Immobilized Biocatalyst in Large Quantities," Biotechnol. Bioeng., **27**, 870-876, 1985.
12. Moreno, J. M., and Fagain, C. O., "Immobilization of Alanine Aminotransferase by Covalent Binding and Entrapment," Biotechnol. Appl. Biochem., **23**, 231-235, 1996.
13. Yamamoto, K., Tosa, T., and Chibata, I., "Continuous Production of L-Alanine Using *Pseudomonas sacunhae* Immobilized with Carrageenan," Biotechnol. Bioeng., **22**, 2045-2054, 1980.
14. Mosbach, K. and Nilsson, K., "Method of Encapsulation Biomaterial in Bead Polymers," US Patent 4,647,536, (Mar. 3, 1987).
15. Kotorman, M., Siman, L. M., Szajani, B., and Boross, L., "Immobilization of Lactate Dehydrogenase on Polyacrylamide Beads," Biotechnol. Appl. Biochem., **8**, 53-59, 1986.
16. Mitz, M. A., and Summaria, L. J., "Synthesis of Biologically Active Cellulose Derivatives of Enzymes," Nature, **189**, 576-577, 1961.
17. Weliky, N. Brown, F.S., and Dale, E., "Carrier-Bound Proteins: Properties of Peroxidase Bound to Insoluble Carboxymethylcellulose Particles," Arch. Biochem. Biophys., **131**, 1-8, 1969.
18. Hayashi, T., Hirayama, C., and Iwatsuki, M., "Papain Immobilization onto Porous Poly(γ -methyl L-glutamate) Beads," J. Appl. Polym. Sci., **44**, 143-150, 1992.
19. Jayakumari, V. G. and Pillai, V. N. R., "Immobilization of Papain on Crosslinked Polymer Supports: Role of the Macromolecular Matrix on Enzymatic Activity," J. Appl. Polym. Sci., **42**, 583-590, 1991.

20. Kitano, H., Nakamura, K., and Ise, N., "Kinetic Studies of Enzyme Immobilized on Anionic Polymer Latices: Alkaline Phosphatase, α -Chymotrypsin, and β -Galactosidase," J. Appl. Biochem., **4**, 34-40, 1982.
21. Omi, S., Kaneko, K., Takesue, M., Tsujimura, H., Satoh, A., and Iso, M., "Synthesis of NAD Polystyrene Microspheres and Application as a Carrier of Glucoamylase Immobilization," J. Appl. Polym. Sci., **51**, 1239-1249, 1994.
22. Sato, T., Mori, T., Tosa, T., and Chibata, I., "Studies on Immobilized Enzymes: IX. Preparation and Properties of Aminoacylase Covalently Attached to Halogenoacetylcelluloses," Arch. Biochem. Biophys., **147**, 788-796, 1971.
23. Okita, W. B., Bonham, D. B., and Gainer, J. L., "Covalent Coupling of Microorganisms to a Cellulosic Support," Biotechnol. Bioeng., **27**, 632-637, 1985.
25. Axen, R., Porath, J., and Ernback, S., "Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides," Nature, **214**, 1302-1304, 1967.
26. Filippisson, H., and Hornby, W. E., "The Preparation and Properties of Yeast β -fructofuranosidase Chemically Attached to Polystyrene," Biochem. J., **120**, 215-219, 1970.
27. Beddows, C. G., Mirauer, R. A., Guthrie, J. T., Abdel-Hay, F. I., and Morrish, C. E. J., "The Use of Graft Copolymers as Enzyme Supports: I. The immobilization of β -Galactosidase and Papain onto Nylon Polyacrylamide Graft Copolymers," Polym. Bull., **1**, 749-753, 1979.
28. Abdel-Hay, F. I., Guthrie, J. T., Morrish, C. E. J., and Beddows, C. G., "The Use of Graft Copolymer as Enzyme Supports: II. The Immobilization of β -Galactosidase and Glucose Oxidase on Cellulose-Polyacrylamide Graft Copolymer," Polym. Bull., **1**, 755-761, 1979.
29. Hayashi, T., and Ikada, Y., "Protease Immobilization onto Porous Chitosan Beads," J. Appl. Polym. Sci., **42**, 85-92, 1991.

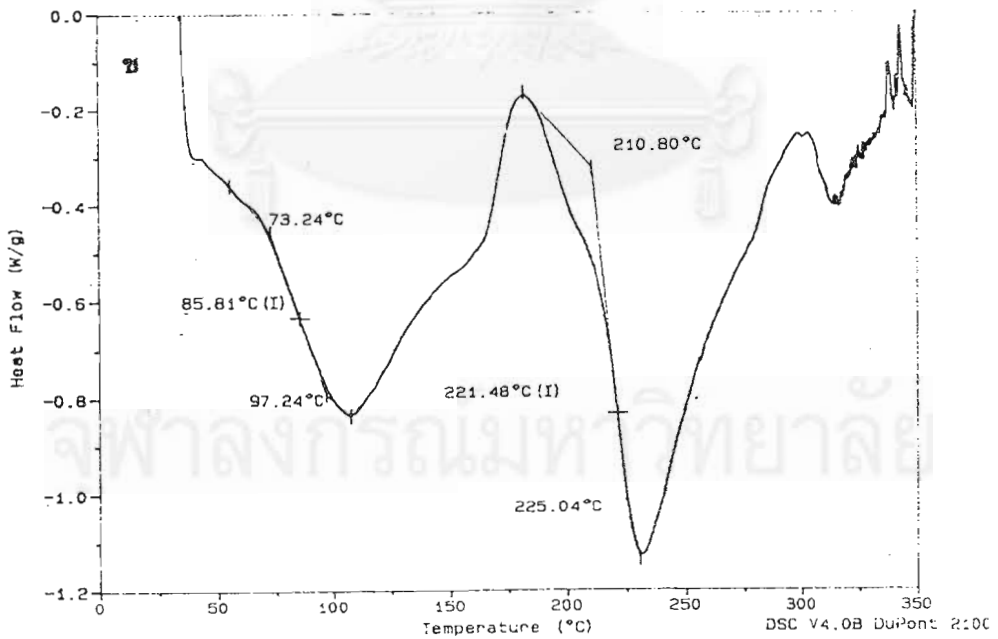
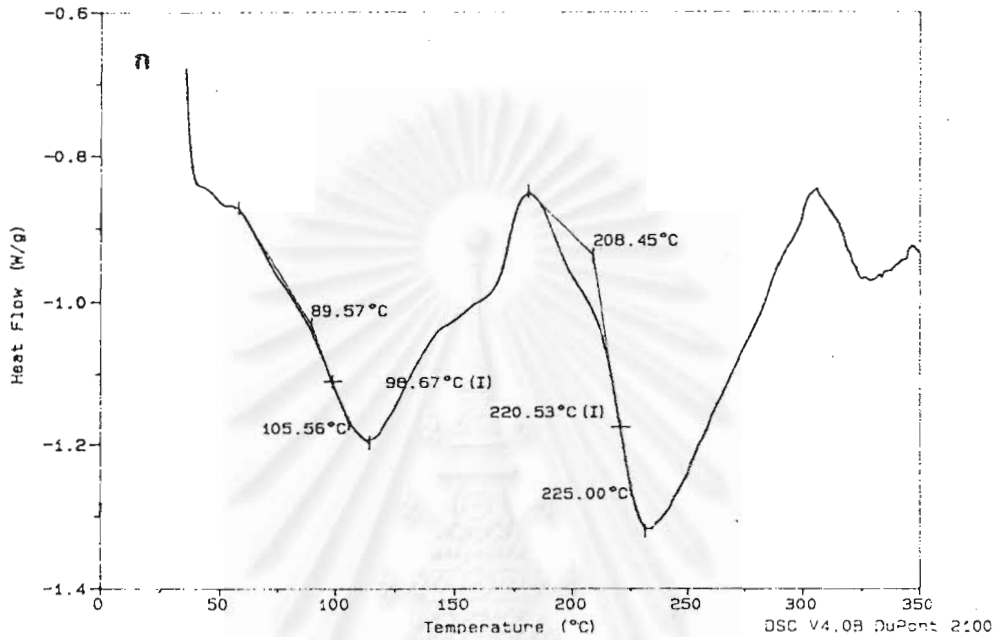
31. Mosbach, K., Method in Enzymology, **Vol. 44**, pp. 11-243, Academic, New York, 1976.
32. Mosbach, K., Method in Enzymology, **Vol. 135**, pp. 3-596, Academic, New York, 1987.
33. Fox, J. W., Shannon, J. D., and Bjarnason, J. B., "Proteinases and Their Inhibitors in Biotechnology," in Leatham, G. F., and Himmel, M. E., Enzymes in Biomass Conversion, pp. 62-79, American Chemical Society, Washington DC, 1991.
34. Pero, J., and Sloma, A., "Proteases," in Sonenshein, A. L., Huch, J. A., and Losick, R. (eds.), Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, pp. 939-952, American Chemical Society, Washington DC, 1993.
35. Aunstrup, K., "Proteolytic Enzymes," in Wingard, L. B. Jr., Katchalski-Katzir, E., and Goldstein, L., (eds.), Applied Biochemistry and Bioengineering: Enzyme Technology, **Vol. 2**, pp. 49-57, Academic, New York, 1979.
36. Keay, L. and Wildi, B.S., "Proteases of the Genus *Bacillus*: I. Neutral Proteases," Biotechnol. Bioeng., **12**, 179-212, 1970.
37. Keay, L., Moser, P. W., and Bernard, S., "Proteases of the Genus *Bacillus*: II. Alkaline Proteases," Biotechnol. Bioeng., **12**, 213-249, 1970.
38. Ottesen, M. and Svendsen, I. B., "The Sutilisins," in Perlmann, G. E., and Lorand, L. (eds.), Methods in Enzymology: Proteolytic Enzymes, **Vol. 19**, pp.99-220, Academic, New York, 1970.
39. Crabb, W. D., "Subtilisin: Commercially Relevant Model for Large-Scale Enzyme Production," in Leatham, G. F. and Himmel, M. E., Enzymes in Biomass Conversion, pp. 82-93, American Chemical Society, New York, 1991.
40. Matsubara, H., Kasper, C. B., Brown, D. M., and Smith, E. L., " Subtilisin BPN: I. Physical Properties and Amino Acid Composition," J. Biol. Chem., **240**(3), 1125-1130, 1965.

41. Happaport, H. P., Riggsby, W. S., and Holden, D. A., "A *Bacillus subtilis* Proteinase: I. Production, Purification, and Characterization of a Proteinase from a Transformable Strain of *Bacillus subtilis*," J. Biol. Chem., **240**(1), 78-86, 1965.
42. Horikoshi, K., "Production of Alkaline Enzymes by Alkalophilic Microorganisms: I. Alkaline Protease Produced by *Bacillus* No. 221," Agr. Biol. Chem., **35**(9), 1407-1414, 1971.
43. Nemeč, J. W., and Bauer, W., Jr., "Acrylic and Methacrylic Acid Polymers," in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2nd ed., **Vol. 1**, pp. 211-234, John Wiley & Sons, New York, 1985.
44. Husser, E. R., Stehl, R. H., Price, D. R., and Delap, R. A., "Liquid Chromatographic Determination of Residual Acrylamide Monomer in aqueous and Nonaqueous Dispersed Phase Polymeric Systems," Anal. Chem., **49**(1), 154-158, 1977.
45. Dunn, M. J., "Electrophoretic Analysis," in Harris, E. L. V., and Angel, S., Protein Purification Methods: a Practical Approach, pp. 18-37, IRL Press, New York, 1990.
46. Hummel, D. O., "Atlas of Polymer and Plastics Analysis," 3rd ed., **Vol. 1**, pp. 683-684, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1991.
48. Brandrup, J., and Immergut, E. H., (eds.), "Polymer Handbook," 2nd ed., pp. III-111-112, III-146-147, John Wiley & Sons, New York, 1975.
49. MacWilliams, D. C., "Acrylamide and Other Alpha, Beta Unsaturated Amides, in Functional Monomers; Their Preparation, Polymerization, and Application," **Vol. 1** pp 2-197, Dekker, New York, 1973.
50. Thomas, D., and Hill, F., "Nonionic Polymer - The Acrylic Group," in Molyneux, P. (ed.), Water-Soluble Synthesis Polymers: Properties and Behavior, **Vol. 1**, pp. 75-117, CRC, New York, 1985.

51. Graillat, C., Pichot, C., Guyot, A., and El Aasser, M. S., "Inverse Emulsion Polymerization of Acrylamide, I. Contribution to the Study of Some Mechanistic Aspects," J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed., **24**, 427-449, 1986.
52. Bikales, N. M., and Kolodny, E. R., "Acrylamide," in Mark, H. F., Gaylord, N. G., and Bikales, N. M. (eds.), Kirk-Otmer Encyclopedia of Chemical Technology, 2 nd ed., **Vol. 1**, pp. 274-284, John Wiley Sons, New York, 1963.
53. Nuyken, O., and Lattermann, G., "Polymers of Acrylic Acid, Methacrylic Acid, Maleic Acid, and Their Derivatives," in Kricheldorf, H. R. (ed.), Handbook of Polymer Synthesis: Part A, pp. 223-336, Marcel Dekker, New York, 1992.
54. Hunkeler, D., "Mechanism and Kinetics of the Persulfated-Initiated Polymerization of Acrylamide," Macromolecules, **24**, 2160-2171, 1991.
55. Odian, G., "Chain Copolymerization," in Principles of Polymerization, 3 rd ed. pp. 452-531, John Wiley & Sons, New York, 1991.
56. Kawaguchi, H. "Environmentally Sensitive Hydrogel Microspheres," New Tcehnology Japan, **22(10)**, 40, 1995.
57. Gutowska, A., Bae, Y. H., Feijen, J., and Kim, S. W., "Heparin Release from thermosensitive hydrogels," J. Controlled Release, **22**, 95-104, 1992.
58. Windholz, M., Budacari, S., Stroumtsos, L. Y., and Fertig, M. N., (eds), The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals and Drugs, 9 th ed., pp. 240, Merck, New Jersey, 1976.
59. Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents, pp. 64, Sigma Chemical, 1995.

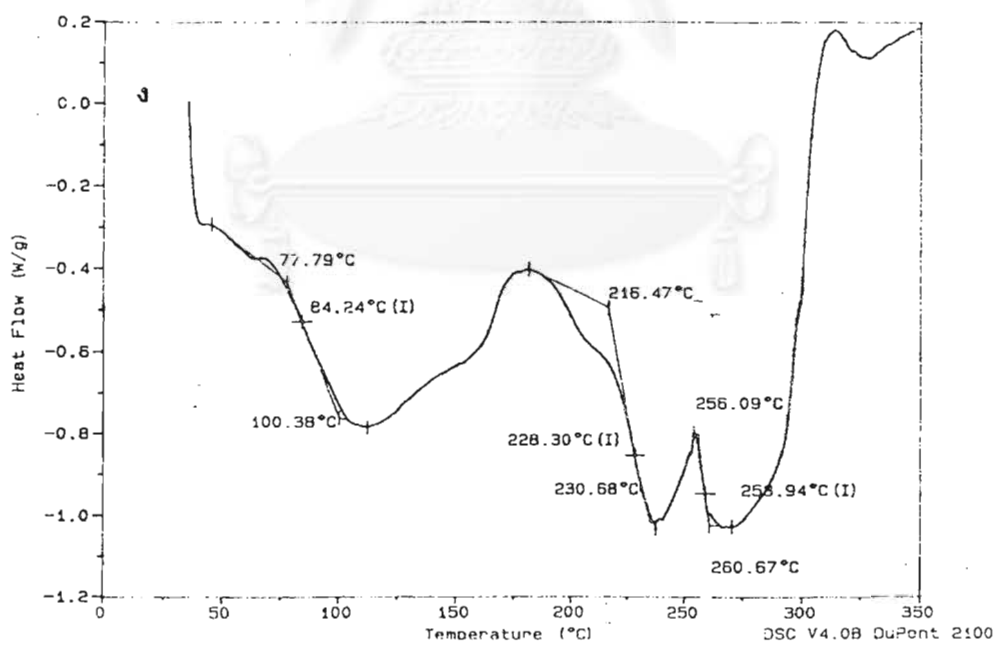
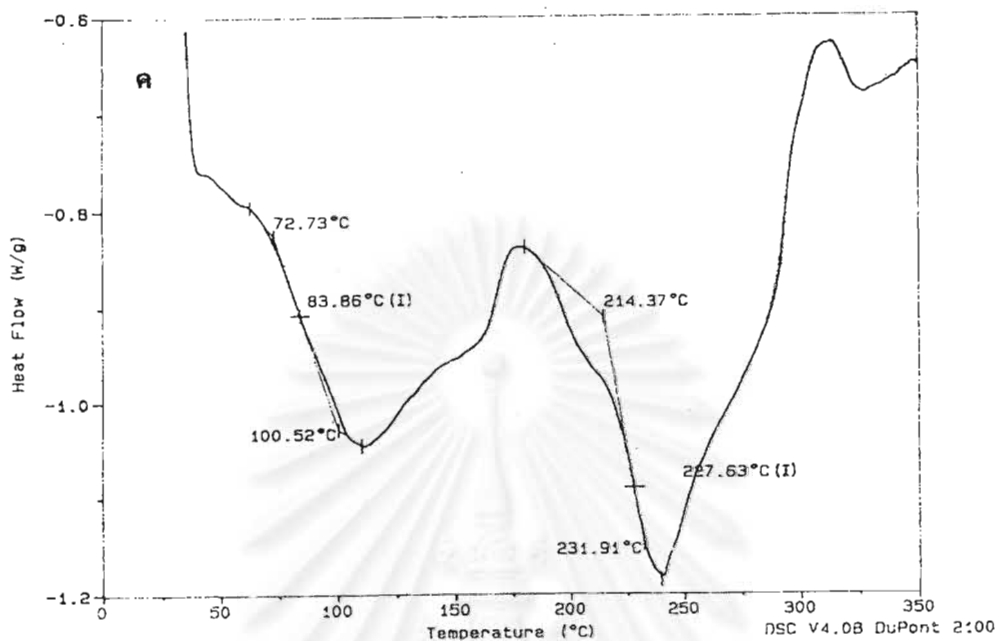
ภาคผนวก 1

DSC เทอร์โมแกรม



รูปที่ A-1.1 DSC เทอร์โมแกรมที่ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์/กรดเมทาคริลิกต่าง ๆ กัน

ก) 100/0 (ข) 97.5/2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

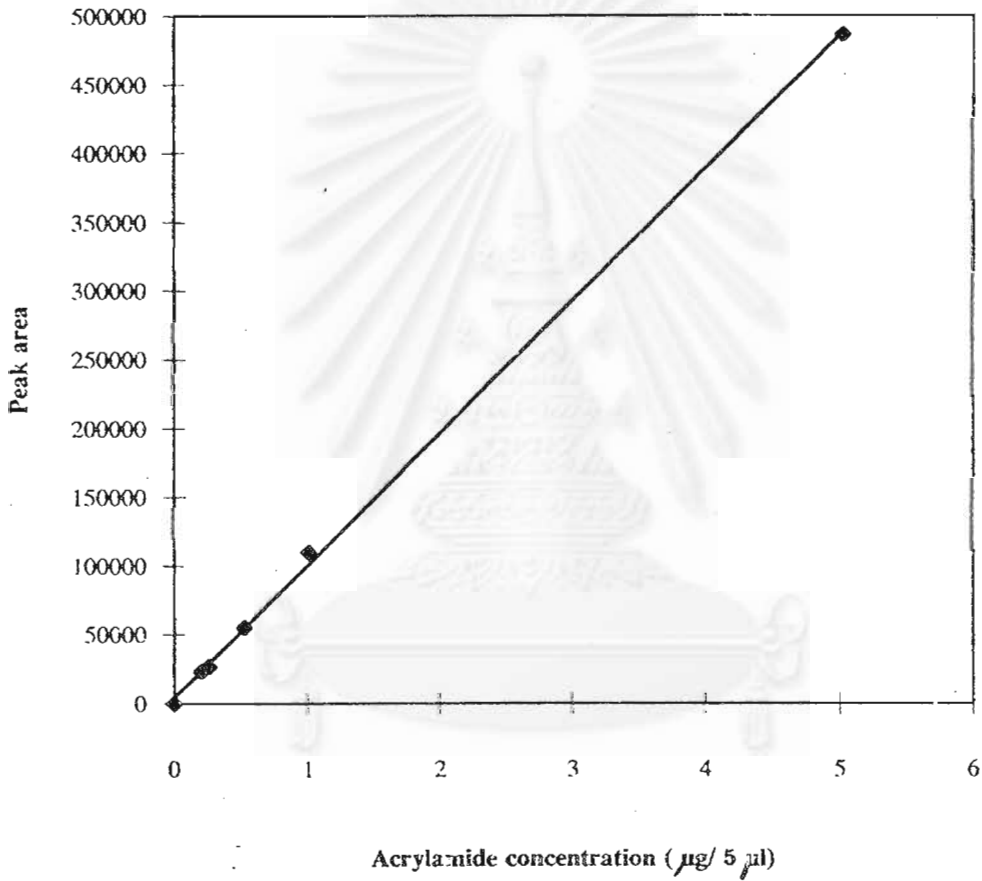


รูปที่ A-1.1 (ต่อ) DSC เทอร์โมแกรมที่ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์/กรดเมทาคริลิกต่าง ๆ กัน

(ค) 95/5 (ง) 90/10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

ภาคผนวก 2

กราฟมาตรฐานของอะคริลาไมด์และ HPLC โครมาโตแกรม

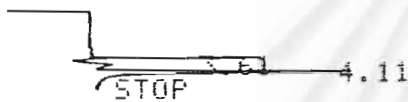


รูปที่ A-2.1 กราฟมาตรฐานของอะคริลาไมด์



ก

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.64	11.8205		3085
0		4.13	88.1794	V	23017
	TOTAL		99.9999		26102



ข

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.61	5.8503		1663
0		4.11	94.1496	V	26772
	TOTAL		99.9999		28435



ค

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.59	1.912		1073
0		4.09	98.0879	V	55076
	TOTAL		99.9999		56149

รูปที่ A-2.2 HPLC โครมาโตแกรมของอะคริลาไมด์มาตรฐาน

(ก) $0.20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (ข) $0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (ค) $0.50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$

STOP 4.1

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.62	1.4865		1656
0		4.1	98.5134	V	109790
	TOTAL		99.9999		111447

STOP 4.13

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.61	1.3991		6897
0		4.13	98.6008	V	486047
	TOTAL		99.9999		492944

รูปที่ A-2.2 (ต่อ) HPLC โครมาโตแกรมของอะคริลาไมด์มาตรฐาน

(ง) $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (จ) $5.0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$

4.13

STOP

ก

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		4.13	99.9999		454804
	TOTAL		99.9999		454804

STOP

4.12

ข

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.66	2.6161		3012
0		4.12	97.3838	V	112149
	TOTAL		99.9999		115161

STOP

4.15

ค

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.68	1.6934		1765
0		4.15	98.3065		102516
	TOTAL		100		104282

รูปที่ A-2.3 HPLC โครมาโตแกรมของอะคริลาไมด์ที่เหลือที่เวลาต่าง ๆ

(ก) 5 นาที (ข) 10 นาที (ค) 15 นาที



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.65	2.0094		1619
0		4.13	88.8328	V	71580
0		4.5	9.1577	V	7379
	TOTAL		99.9999		80579



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.69	1.8479		1468
0		4.18	96.7012	V	76824
0		4.56	1.4508	T	1152
	TOTAL		100.		79445



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.65	1.3142		998
0		4.12	98.6857	V	74990
	TOTAL		99.9999		75989

รูปที่ A-2.3 (ต่อ) HPLC โครมาโตแกรมของอะคริลาไมด์ที่เหลือที่เวลาต่าง ๆ

(ง) 20 นาที (จ) 25 นาที (ฉ) 30 นาที



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.62	1.6733		1200
0		4.12	96.7637	V	69396
0		4.52	1.5629	T	1120
TOTAL			99.9999		71717

ช



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.69	6.4116		5356
0		4.16	82.651	V	69042
0		4.54	10.9372	V	9136
TOTAL			99.9999		83535

ช



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.67	4.0959		2596
0		4.14	84.9583	V	53864
0		4.52	10.9456	V	6939
TOTAL			99.9999		63401

ฉ



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.66	4.4955		3470
0		4.15	85.0495	V	65660
0		4.53	10.4549	V	8071
TOTAL			99.9999		77202

ญ

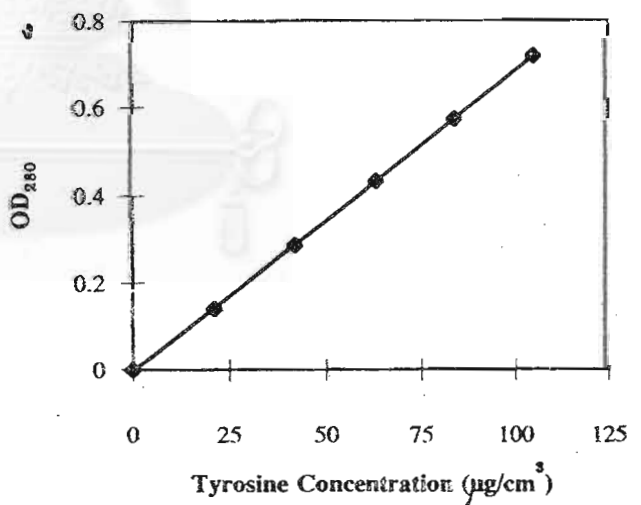
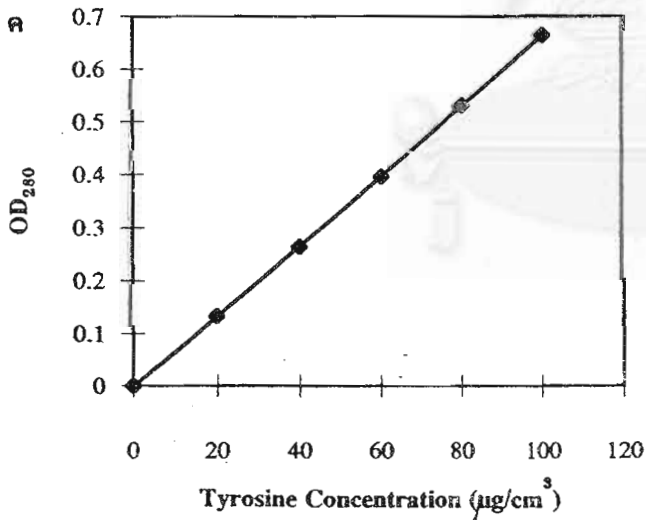
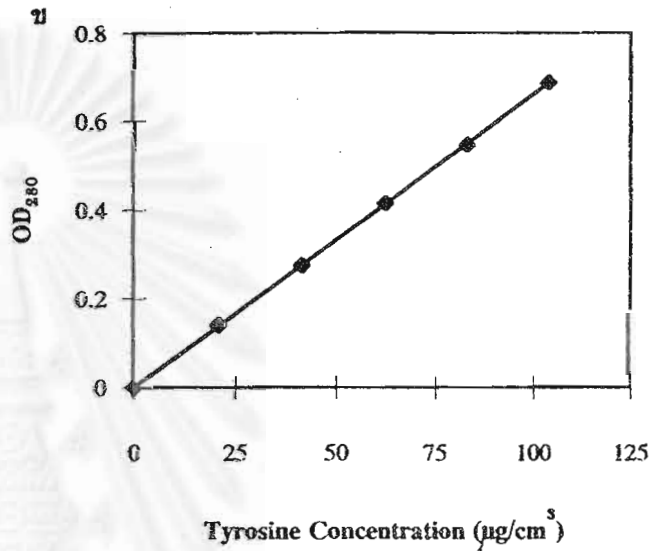
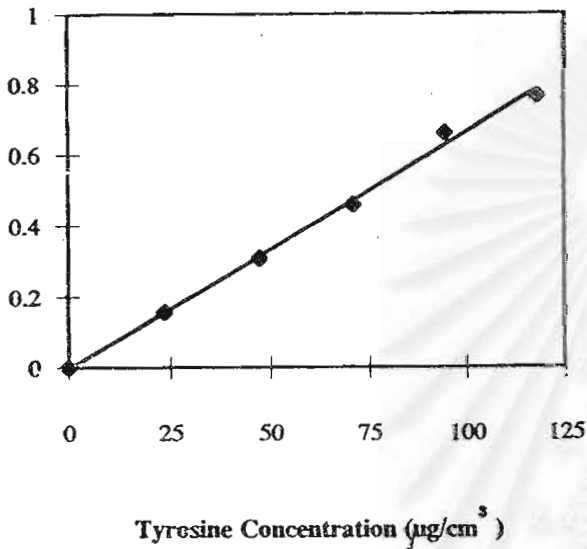
รูปที่ A-2.3 (ต่อ) HPLC โครมาโตแกรมของอะคริลาไมด์ที่เหลือที่เวลาต่าง ๆ

(ช) 45 นาที (ช) 60 นาที (ฉ) 90 นาที (ญ) 120 นาที

ภาคผนวก 3



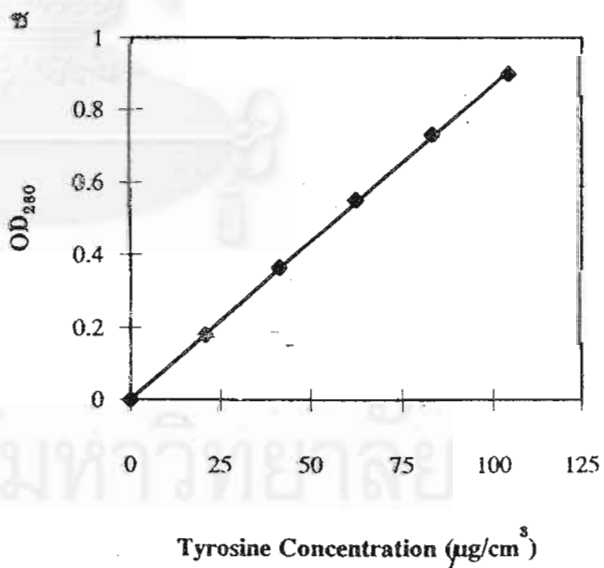
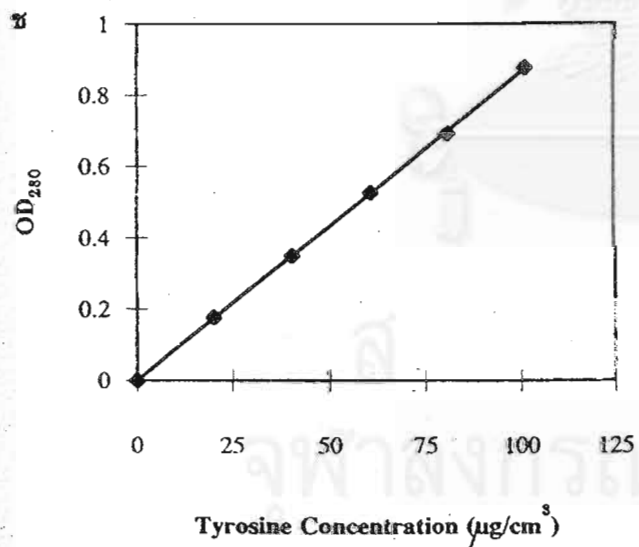
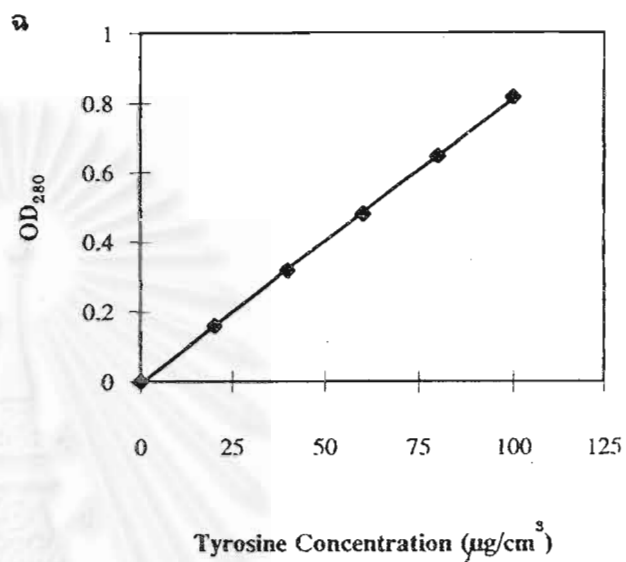
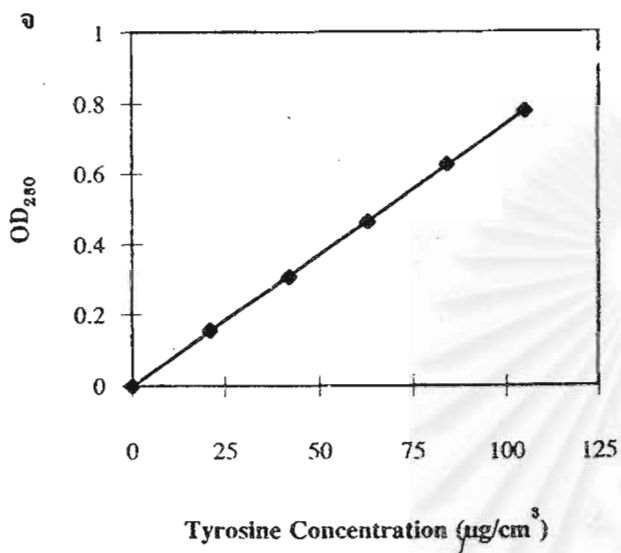
กราฟมาตรฐานไทโรซีน



รูปที่ A-3.1 กราฟมาตรฐานของไทโรซีนในสารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ กันที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

(ก,ข) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5 และ 8.0)

(ค,ง) ในสารละลายทริส-บัฟเฟอร์ (pH 8.5 และ 9.0)



รูปที่ A-3.2 กราฟมาตรฐานของไทโรซีนในสารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ กันที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

(จ,ฉ,ช) ในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (pH 9.5, 10.0, และ 10.5)

(ข) ในสารละลายคาร์บอเนตคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (pH 11.0)