ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเตรียมและการใช้เม็ดวุ้นและเม็ดวุ้นแม่เหล็กจับจำเพาะ

ชื่อผู้เขียน นางสาวอารีรัตน์ สาขุน

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

อ.ดร.ดารารัตน์	ทองขาว	ประธานกรรมการ
รศ.ดร.พูนศุข	ศรีโยธา	กรรมการ
ผศ.ดร.ภาวิณี	คณาสวัสดิ์	กรรมการ

บทคัดย่อ

เม็ดอะกาโรสเป็นที่นิยมใช้ในการแยกสารโดยเจลฟิลเตรชันและแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี เม็ดอะกาโรสสำเร็จรูปจากต่างประเทศมีราคาแพง และไม่สามารถดัดแปลงให้ติดแม่เหล็กเพื่อใช้แยกสารได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากอะกาโรสเป็นโพลีแซคคาไรด์ไร้ประจุที่สกัดจากวุ้น การนำวุ้นมาทำเป็นเม็ดใช้เองแล้วแก้ไขการมีประจุของโพลีแซคคาไรด์อื่นที่อยู่ในวุ้นโดยเกลือแกง จะช่วยลดต้นทุนการผลิตสารในขั้นตอนการทำสารให้บริสุทธิ์

ในการเลือกชนิดของวุ้นเพื่อทำเป็นเม็ด ได้ทดลองสกัดอะกาโรสจากวุ้นสี่ชนิดที่ซื้อจากตลาดและสองชนิดจากต่างประเทศ พบว่าวุ้นผงตรามดให้ปริมาณอะกาโรสสูงที่สุด ในการเลือกตัวกลางไม่ชอบน้ำเพื่อทำวุ้นให้เป็นเม็ด ได้ทดลองใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ผสมอีมัลซิไฟเออร์และน้ำมันต่าง ๆ พบว่าน้ำมันพืชตรากุ๊กให้ปริมาณเม็ดวุ้นในขนาดที่ต้องการ (75-180 ไมโครเมตร) มากที่สุด ดังนั้นการเตรียมเม็ดวุ้นหรือเม็ดวุ้นแม่เหล็กจึงนำสารละลายวุ้นผงตรามดเข้มข้น 4 % หรือสารละลายวุ้นผงตรามดเข้มข้น 4 % ผสมแมกเนไทท์ 1 % มาตีให้เป็นเม็ดในน้ำมันพืชตรากุ๊ก ปริมาณเม็ดวุ้นและเม็ดวุ้นแม่เหล็กที่เตรียมได้คือ 17.3 และ 17.0 มล.ต่อกรัมวุ้น หรือผลิตผลร้อยละประมาณ 60 % ลักษณะของเม็ดเมื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ารูปร่างเป็นทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแต่ละเม็ดต่างกันไม่เกินสามเท่าและเม็ดวุ้นแม่เหล็กมีแมกเนไทท์กระจายอยู่ทั่วไปภายในเม็ดทรงกลม

จากการทดลองใช้เม็ดวุ้นแยกขนาดของสารโดยเจลฟิลเตรชันพบว่า ช่วงน้ำหนักโมเลกุลของสารที่แยกได้ และประสิทธิภาพในการแยกสารแต่ละขนาดของเม็ดวุ้นใกล้เคียงกับ Sepharose 4B มาก รวมทั้งการแยกไลโซไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนเบสจึงจับกับเม็ดวุ้นและ Sepharose 4B ในสารละลายที่มีความแรงอิออนต่ำ และถูกชะออกจากเม็ดวุ้นและ Sepharose 4B พร้อมกันด้วยสารละลายที่มีความแรงอิออนสูง

จากการทดลองใช้เม็ดวุ้นแม่เหล็กแยกเลคตินที่จับจำเพาะกับกาแลคโตส พบว่าสามารถแยกเลคตินออกจากสิ่งสกัดของเมล็ดละหุ่งได้มากกว่าเม็ดวุ้น แต่น้อยกว่า Sepharose 4B เล็กน้อย สามารถแยกเลคตินออกจากสิ่งสกัดของเมล็ดคำบูชาได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับเม็ดวุ้น และ Sepharose 4B เมื่อนำเม็ดเจลทั้งสามชนิดไปอุ่นกับกรดก่อนใช้จับกับเลคติน และไม่สามารถแยกเลคติน หรือโปรตีนอื่นออกจากสิ่งสกัดของเมล็ดขนุนได้เลยไม่ว่าจะใช้เม็ดเจลชนิดใดก็ตาม ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเลคตินโดย SDS-PAGE ชี้ให้เห็นว่าเลคตินที่แยกได้โดยเม็ดเจลทั้งสามชนิดมีคุณภาพเหมือนกัน จากการทดลองตรึง Con A กับเม็ดวุ้นแม่เหล็กโดยใช้ cyanogen bromide แล้วนำไปแยกเปอร์ออกซิเดสออกจากสิ่งสกัดของหัวแรดิช พบว่าสามารถแยกเอนไซม์ได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับ Con A ที่ตรึงกับเม็ดวุ้น และ Con A ที่ตรึงกับ Sepharose 4B ด้วยวิธีการเดียวกัน SDS-PAGE ของเอนไซม์ที่แยกได้โดย Con A ที่ตรึงกับเม็ดเจลทั้งสามชนิดมีคุณภาพเหมือนกัน และเหมือนกับเอนไซม์ที่แยกได้โดย Con A-Sepharose 4B ที่ซื้อสำเร็จรูปจากบริษัท Sigma ผลการทดลองใช้เม็ดวุ้นแม่เหล็กจับจำเพาะในการแยกสารดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการนำวุ้นมาทำเป็นเม็ดแทนอะกาโรสไม่ได้ลดประสิทธิภาพของการแยกหรือคุณภาพของสารที่ได้ ในขณะที่ช่วยลดต้นทุนการผลิต ประหยัดเวลา และเทคนิคการแยกสารเพราะสามารถใช้แม่เหล็กดูดไว้ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Preparation and Application of Agar Beads and Affinity Magnetic Agar Beads

Author Ms.Areerat Sakhun

M.S. Chemistry

Examining Committee :

Lecturer Dr.Dararat Tongkao **Chairman**

Assoc.Prof.Dr.Poonsook Sriyotha **Member**

Assist.Prof.Dr.Pawinee Kanasawud **Member**

Abstract

Agarose beads are commonly used in gel filtration and affinity chromatography. They are commercially expensive and cannot be adapted to facilitate the separation by magnet. Since agarose is uncharged polysaccharide extracted from agar, the beads directly made from the agar and used in the presence of salt will reduce production cost in the purification step.

Selection of commercial agar to form beads was carried out by agarose extraction from the agar of six brands and found that Ant brand agar gave maximal agarose yield. Selection of hydrophobic phase in bead forming from mixture of organic solvent/ emulsifier and several oils showed Cook vegetable oil gave maximal amount of agar beads in desirable size (75-180 μm). Therefore, the agar beads or magnetic agar beads were prepared by

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

stirring 4 % Ant agar solution or 4 % Ant agar solution containing 1 % magnetite in the Cook oil. The bead pack volume of 17.3 or 17.0 ml/g agar and percentage yield of about 60 % were obtained. Microscopic examination of the beads showed spherical shape, regular size of diameter within three times of each other and magnetite granules dispersed inside the magnetic agar beads.

Gel filtration on the agar beads showed the same fractionation range and resolution of biomolecular separation as Sepharose 4B. Lysozyme, a basic protein, adsorbed the agar beads as well as Sepharose 4B in low ionic strength solution. However, it could be simultaneously eluted from the columns by high ionic strength solution.

Application of the magnetic agar beads in isolation of galactose-binding lectins was performed. The beads separated more amount of lectin from castor bean crude extract than the agar beads but less than Sepharose 4B. The beads separated almost the same amount of lectin from sunn hemp seed extract as the agar beads and Sepharose 4B after all the beads had been acid-treated. The three types of beads could not bind lectin or any proteins in jack fruit seed extract. SDS-PAGE of each lectin eluted from the three types of beads showed similar protein patterns. Immobilization of Con A in the beads by cyanogen bromide and separation of peroxidase from radish root extract showed more or less the same amount of enzyme obtained by specific binding to Con A - magnetic agar beads, Con A - agar beads and Con A - Sepharose 4B. SDS-PAGE of the enzyme eluted

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

form the three types of beads showed similar protein patterns, and also similar to the enzyme eluted form Con A - Sepharose 4B commercially available from Sigma. All of the application tested incicates that the agar can be used instead of agarose without affecting the efficiency of separation or the quality of products. The affinity magnetic agar beads tend to reduce the preparation cost, operation time and techniques by magnet sorting.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved