

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การสกัด เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสจากเมล็ดพืชบางชนิดที่กำลังงอก และการทำให้บริสุทธิ์

ชื่อผู้เขียน นายรุ่ง พันธุ์ศรีวงศ์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

อาจารย์ ดร. บัณฑิต	ลิละศาสตร์	ประธานกรรมการ
อาจารย์ ดร. ไพโรจน์	กิจฉะพานิช	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์	สาระเวก	กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสจากเมล็ดพืชที่กำลังงอก 5 ชนิด คือ ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าวเหนียว พบว่าส่วนสกัดหยาบเอนไซม์จากต้นอ่อนถั่วเขียว มีค่าแอกติวิตีสูงสุด จึงคัดเลือกถั่วเขียวเป็นแหล่งเอนไซม์ที่นำมาศึกษาคุณสมบัติต่อไป เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของอายุของต้นอ่อนกับแอกติวิตี พบว่าเมื่ออายุ 3 วัน มีแอกติวิตีสูงสุดในทุกส่วน และเมื่ออายุ 6 วัน เฉพาะบริเวณยอดมีแอกติวิตีสูงสุด ส่วนสกัดหยาบเอนไซม์ที่ได้จากยอด มี pH ที่เหมาะสมเป็น 6.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 55 °C และเอนไซม์จะเสียสภาพที่อุณหภูมิ 70-80 °C ในเวลา 10 นาที ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 4 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนด้วย 25-75% ของสารละลายอิมิตัวแอมโมเนียมซัลเฟต การทำไดอะไลซิสด้วยถุงไดอะไลซิสที่มีมวลโมเลกุล Cut off 10,000 และแยกด้วย CM-Sephadex C-50 ตามด้วย Sephadex G-200 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเป็น 4.05, 5.74, 28.83 และ 142.38 เท่า ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ 57.50% 53.11% 36.99% และ 4.68% ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์

โดย polyacrylamide gel electrophoresis จะได้แถบของโปรตีนเพียง 1 แถบ มีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.38 และตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์บนเจลโดยวิธีของ Bessey เป็นการยืนยันได้ว่าเป็นแอกติวิตีของเอนไซม์แอซิติลฟอสฟาเตสจริง

เอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วมี pH ที่เหมาะสมเป็น 6.2 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 55°C เช่นเดียวกับส่วนสกัดหยาบเอนไซม์ จากการหามวลโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน มีค่าประมาณ 57,000 มีค่า K_m และ V_{max} สำหรับ p-nitrophenyl phosphate เป็น 1.67 mM และ 27.03 $\mu\text{mol}/\text{min}$ ตามลำดับ



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

column and Sephadex G-200 column. The increased purity values obtained were 4.05, 5.74, 28.83 and 142.38 folds and the percentage yields were 57.50%, 53.11%, 36.99% and 4.68% respectively.

The test of enzyme purification by polyacrylamide gel electrophoresis yielded only one protein band with the value of mobility of 0.38 and the activity test of the enzyme on gel by Bessey's method confirmed that it was acid phosphatase.

The purified enzyme had the optimum pH at 6.2 and the optimum temperature at 55°C in the same way as the crude enzyme. It was found that the molecular weight of this enzyme was about 57,000 with the value of K_m and V_{max} for p-nitrophenyl phosphate as 1.67 mM and 27.03 $\mu\text{mol}/\text{min}$ respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved