หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G - 10 แบบ Rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., USA.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environment incubator shaker) รุ่น G - 27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge)รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงชนิดลำแสงคู่ (Double beam Spectrophotometer) รุ่น 210 - 5763 ของบริษัท Hitachi, Japan

เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น ø70 ของบริษัท Beckman, USA.

เครื่องระเหิดแห้ง (Freeze dryer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Eyela, Japan

การคัดแยก (screening) เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากตัวอย่างดิน

1) การคัดแยก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (solid medium)

1.1) ชั่งตัวอย่างดินมา 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 9 มล. ผสมให้เข้าด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) นำไปเจือจางตามลำดับแล้วดูดสารแขวนลอยในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มล. เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose Agar (PDA) ด้วยแท่งแก้วงอให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้องจนสายใยราขึ้น แยกโคโลนีเดี่ยวมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงชนิดเดิม บ่มไว้จนเห็นสายใยเจริญเต็มที่

1.2) นำเชื้อราที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 1.1 มาจุด (spot) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นที่มีเดกซ์แทรน 1.0% ตามสูตรซึ่งปรับปรุงจากFukumotoและคณะ (30) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 - 7 วัน แล้วนำมาตรวจสอบความสามารถในการย่อยเดกซ์แทรนของเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ โดยการเทราดด้วยเอธานอล 95% ให้ท่วมอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการย่อยสลายเดกซ์แทรน (โดยปกติเดกซ์แทรนจะมีหน่วยกลูโคสต่อกันมากกว่า 50 หน่วยขึ้นไป เมื่อทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เช่น เอธานอลจะตกตะกอนทำให้เห็นเป็นสีขาวขุ่น แต่หากเดกซ์แทรนถูกย่อยโดยเดกซ์แทรนเนส เป็นหน่วยย่อยลงแล้วจะไม่ถูกตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ทำให้เห็นเป็นบริเวณใสได้)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2) <u>การเก็บรักษาเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส</u>

นำเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกมาจากข้อ 1.2 ที่ให้บริเวณใส ไปจุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเดกซ์แทรนความเข้มข้น 1.0% ตามสูตรของ Fukumoto และคณะ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อสร้างสปอร์เต็มที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3) <u>การคัดเลือกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว</u> (liquid medium)

นำเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ ที่เก็บรักษาไว้ในข้อ 2 มาทำการทดสอบ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร Fukumoto และคณะ (30)ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวย (Erlenmeyer flask) ตามวิธีการในข้อ 4 เมื่อเชื้อราเจริญจนเหมาะสม แล้วทำการแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 หรืออาจใช้วิธีปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใสมาตรวจสอบแอคติวิตี ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดย 1 มล. ของส่วนผสมปฏิกิริยา (reaction mixture) ตามวิธีในข้อ 5

4) <u>การเลี้ยงเชื้อราในขวดแก้วทรงกรวย</u>

ใส่น้ำกลั่นผสม 0.1% ของ Tween 80 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ลงในหลอดเก็บเชื้อดังที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 2 ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาลอยอยู่ในน้ำนับสปอร์เริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 2×10^7 สปอร์ต่อมล. โดยใช้ Haemacytometer (ภาคผนวก ค) ถ่าย 1 มล. ของสปอร์แขวนลอยลงใน 50 มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามสูตรอาหารของ Fukumoto

และคณะ(ภาคผนวก ก) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ใช้อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวออกมา 5 มล. นำไปตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ตามวิธีการในข้อ 5

5) <u>การตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา</u>

โดยใช้วิธีการของ Fukumoto และคณะ(30)ดังนี้ ส่วนผสมของปฏิกิริยาจำนวน 1 มล. ประกอบด้วย 0.4 มล.ของสารละลายเดกซ์แทรน T2000 (Pharmacia) ความเข้มข้น 0.625% ละลายใน 0.05 โมลาร์ pH 5.5 และน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งผ่านการแยกเซลล์ออกไปแล้ว 0.1 มล. บ่มสับสเตรทกับบัฟเฟอร์ก่อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมเอนไซม์ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างของส่วนผสมที่เวลา 0,5,10 และ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที แล้วตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีการของ Somogyi-Nelson (51,52)

[1 หน่วย (Unit) ของเดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรน T2000 แล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ]

5.1) การเตรียมสับสเตรท ชั่งเดกซ์แทรน T2000 (Pharmacia, Sweden) 0.625 กรัม ละลายในอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.5 และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดเตรียมสาร (volumetric flask)

6) <u>การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์</u>

นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์มาปริมาณ 1 มล. เติมสารละลายอัลคาไลน์ - คอปเปอร์ รีเอเจนต์ (วิธีการเตรียมในภาคผนวก ข) จำนวน 1 มล.ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงอย่างเร็ว แล้วเติม เนลสันรีเอเจนต์ 1 มล. (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เติมน้ำขจัดไอออนแล้ว 5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร หาค่าปริมาณน้ำตาลริดิวซ์จากผล ต่างที่เวลาต่างๆจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมล.

7) <u>การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน</u>

ใช้วิธีการของ Lowry และคณะ (53) นำ 1.0 มล. ของสารละลายที่ ต้องการวิเคราะห์มาเติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข) 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมสารละลายผสม Lowry D 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันแล้ว ตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบ เทียบหาค่าของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่ใช้ โบวีนซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมล.

8) <u>การตรวจวิเคราะห์การเจริญของเซลล์(Growth)</u>

โดยวิธีทำน้ำหนักแห้ง (dry weight) ของเซลล์ นำเซลล์ที่ทราบปริมาตร น้ำเลี้ยงเชื้อแน่นอน มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จนน้ำหนัก คงที่ ชั่งหาน้ำหนักแห้ง แล้วคำนวณหาน้ำหนักแห้งต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ

9) <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนส</u>

9.1) การหาชนิดของเดกซ์แทรนที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Fukumoto โดยใช้เดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลชนิดต่างๆ ได้แก่ เดกซ์แทรน T-10, T-40, T-2000 และเดกซ์แทรนคุณภาพอุตสาหกรรม ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 17,200, 153,000, และ3-50x10^5 ตามลำดับ และเดกซ์แทรนที่ทำการผลิตเองจาก <u>Leuconostoc mesenteroides</u> เตรียมโดยวิธีในภาคผนวก ก ข้อ 5 ที่ความเข้มข้น 1.0% เป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้วิธีการในข้อ 4 นำมาตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีการในข้อ 5

9.2) การหาปริมาณของเดกซ์แทรนที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Fukumoto ที่มีเดกซ์แทรนชนิดอุตสาหกรรม (น้ำหนักโมเลกุล 3-50x10^5 ของบริษัท Sigma, D-5501) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นเป็น 0.25,0.50,0.75,1.0,1.5 และ 2.0% โดยใช้วิธีการในข้อ 4 แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีการในข้อ 5

9.3) การหาชนิด และปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Fukumoto ที่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจนต่างๆดังนี้

แหล่งอาหารอินทรีย์ไนโตรเจน

เปปโตน, ผงยีสต์สกัด, corn steep liquor ที่ความเข้มข้น 0.2 ,0.5 และ 1.0% โดยน้ำหนัก

แหล่งอาหารอนินทรีย์ไนโตรเจน

โซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 และ 1.0%

โปตัสเซียมไนเตรท ความเข้มข้น 0.2,0.5 และ 1.0%

แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรด แอมโมเนียมซัลเฟตและ

แอมโมเนียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2,0.5 และ 1.0%

ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีการในข้อ 5

9.4) ผลของเกลือแร่ต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหารเหลวที่ใช้เดกซ์แทรนความเข้มข้น 1.0%เป็นแหล่งคาร์บอนและ โซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 0.2%เป็นแหล่งไนโตรเจน และได้มีการแปรผันชนิด และปริมาณของเกลือแร่ดังนี้

ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2 และ 0.3%

โปตัสเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0, 0.025, 0.050 และ 0.10% ตามลำดับ

เฟอริกซัลเฟต ความเข้มข้น 0, 0.0005, 0.0010 และ 0.002%

และทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวตามปกติ แต่ได้มีการแปรผันแร่ธาตุบางชนิดลงไปแล้วคือ

คอปเปอร์ซัลเฟต	ความเข้มข้น	1×10^{-5}	และ 2×10^{-5}	โมลาร์ตามลำดับ
แมงกานีสซัลเฟต	"	"	"	"
โคบอลท์คลอไรด์	"	"	"	"
แบเรียมคลอไรด์	"	"	"	"

แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9.5) ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรของ Fukumoto ที่ได้มีการปรับปรุงแล้วโดยแปรผันความเป็นกรดด่างเริ่มต้น เป็น 3.5,4.0,4.5,5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,8.0 และ 9.0 ตามลำดับ

ตรวจหาแอคติวิตีด้วยวิธีการในข้อ 5

9.6) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร Fukumoto ที่ได้ปรับปรุงแล้วโดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อเป็น 25 30,35,40,45,50 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ตรวจหาแอคติวิตีด้วยวิธีการในข้อ 5 ข้างต้น

9.7) ผลของ tween 80 ต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรข้างต้น โดยเติมสารtween 80 ลงไป 0.1% และ 0.2% ตรวจหาแอคติวิตีด้วยวิธีการในข้อ 5 ข้างต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10) การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

10.1) <u>ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์</u>

บ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาที่ความเป็นกรดด่างในช่วงต่างๆ โดยการผันแปรความเป็นกรดด่างในช่วงต่างๆโดยใช้ 0.05 โมลาร์ของ

อะซีเตทบัฟเฟอร์ในช่วง pH 4-6

ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ในช่วง pH 6-8 และ

ซิเตรท- ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ในช่วง pH 4-7

ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยวิธีการในข้อ 5

10.1) <u>ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง</u> (pH stability)

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ กัน คือ

อะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 4.0-5.5

ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 5.5-8.0 และ

ซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 4-7

เป็นเวลา 0 ถึง 120 นาที แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสทุกๆ 15 นาที ในชั่วโมงแรก และช่วงละ 30 นาทีในชั่วโมงที่ 2 ด้วยวิธีการในข้อ 5 ข้างต้น โดยใช้เอนไซม์ที่บ่มในอะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 เป็นตัวเปรียบเทียบ

10.3) <u>อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์</u>

บ่มเอนไซม์ในอ่างน้ำที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40,45,50,55,60 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 ถึง 120 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ทุกๆ 15 นาที ในชั่วโมงแรก และช่วงละ 30 นาทีในชั่วโมงที่ 2 โดยใช้วิธีการในข้อ 5 ข้างต้น

10.4) ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ (thermal stability)

บ่มเอนไซม์ให้เจือจางใน 0.05 โมลาร์อะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 40 45 50 55 60 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 ถึง 120 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสทุกๆ 15 นาทีในชั่วโมงแรก และทุก 30 นาทีในชั่วโมงที่ 2 ด้วยวิธีการดังกล่าวในข้อ 5 ข้างต้น โดยใช้เอนไซม์ที่บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นตัวเปรียบเทียบ

10.5) การศึกษาชนิด และปริมาณของเกลือแร่ และสารบางชนิดที่มีผลต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส

โดยการเติมเกลือแร่ และสารที่ใช้ทดสอบ ปริมาณต่างๆ กัน ลงในปฏิกิริยาของการหาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ดังต่อไปนี้

ซิสเตอีน, ซีสเตอีน-ไฮโดรคลอไรด์, ลอรีลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate) Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), para-Chloromercuribenzoic acid (PCMB) , แมกนีเซียมซัลเฟต , แคลเซียมคลอไรด์ , เฟอริคคลอไรด์ , เฟอรัสซัลเฟต , คอปเปอร์ซัลเฟต , โคบอลท์คลอไรด์ , แมงกานีสคลอไรด์ , เมอคิวริคคลอไรด์ , แคลเซียมคาร์บอเนต, ไดโปตัสเซียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟต, โปตัสเซียมคลอไรด์, โซเดียม คลอไรด์, ซิงค์คลอไรด์ และซิงค์ซัลเฟต ความเข้มข้น 0 ถึง 15 มิลลิโมลาร์

วัดแอคติวิตี ของเดกซ์แทรนเนส ตามวิธีการในข้อ 5

10.6) ความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบน้ำตาลบางชนิดของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางใน 0.05 โมลาร์อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับสับสเตรทความเข้มข้น 0.625% ชนิดต่างๆดังนี้ เดกซ์แทรน T-10 ,T-40 ,เดกซ์แทรนคุณภาพอุตสาหกรรมน้ำหนักโมเลกุล 17,200 , 153,000 ,$3\text{-}50\times10^{6}$,เดกซ์ทริน ,แป้ง ,แอลฟา-เซลลูโลส ตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์

ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายในเวลา 15 นาที โดยเปรียบเทียบกับการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 ที่สภาวะมาตรฐาน

10.7) <u>การตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเดกซ์แทรน</u>

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางแล้วกับสับสเตรทที่สภาวะมาตรฐานเป็นเวลา 120 นาที เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำไปต้มในน้ำเดือด 5นาที แล้วนำไปวิเคราะห์น้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยโครมาโตกราฟีกระดาษ Whatman No.1 แบบ ascending เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน กลูโคส ,ไอโซมอลโตส ,และมอลโตไทรโอส ความเข้มข้น 1มก.ต่อมล. ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร ในภาชนะที่ทำให้อิ่มตัวด้วยสารละลายผสมของ n-propanol:น้ำ อัตราส่วน 70:30 เมื่อสารละลายซึมถึงตำแหน่งใกล้ขอบบนมากที่สุดนำมาทำให้แห้ง แล้วทำให้เกิดสีโดยวิธี อัลคาไล ซิลเวอร์ ไนเตรท (55) ภาคผนวก ข.3

10.8) <u>ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์</u>

ทำการผันแปรความเข้มข้น 0 ถึง 0.5 โมลาร์ของอะซีเตทบัฟเฟอร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรดด่าง 5.5 ซึ่งเป็นสภาวะความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทดลองหาแอคติวิตีของเอนไซม์ ตรวจสอบแแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีการในข้อ 5 ข้างต้น

10.9) <u>ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเข้มข้นบัฟเฟอร์</u>

บ่มเอนไซม์ให้เจือจางใน อะซีเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 0.5 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่าง 5.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธีการในข้อ 5 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่บ่มในอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมเอนไซม์เข้มข้น (Concentrated enzyme)

11) การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 มาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 5 วัดปริมาตรแล้วเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดลงไปช้าๆ พร้อมทั้งกวนเบาๆ ตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 45 กวนเบาๆ ต่ออีก 1-2 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ / นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาทีนำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายอะซีเตท บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.5 โดยใช้สารละลายให้น้อยที่สุด นำมาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือเปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสก่อนตกตะกอนตามวิธีการในข้อ 5

12) การเตรียมเอนไซม์ระเหิดแห้ง

นำน้ำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ และเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 1) มาทำการระเหิดแห้ง (freeze drying) จนกระทั่ง เอนไซม์แห้ง นำมาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย