บทที่ 2
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องปั่น (super blender) บริษัท National , Taiwan
2. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge) รุ่น J-21C บริษัท Beckman Instrument Inc., U.S.A.
3. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงแบบตั้งโต๊ะที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (bench top refrigerated centrifuge) บริษัท Buchi Laboratechik AG, Switzerland รุ่น 1110
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท Mettler Toledo , Switzerland รุ่น MP220
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) บริษัท Jenway Ltd.,U.K. รุ่น 6400
6. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo , Switzerland รุ่น AB 204-5
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท fisher scientific , U.S.A.
8. ชุดอิเลคโทรโฟริซิสแบบแผ่น (slab gel electrophoresis equipment) บริษัท Bio – Rad , U.S.A.
9. ไมโครปิเปต บริษัท Gilson Medical Electronic S.A., Franch รุ่น Pipet man P20 , P100 , P200 , P1000
10. เครื่องเก็บแยกส่วน (fraction collector) บริษัท Phamacia Sweden รุ่น FRAC-100
11. เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (conductivity meter) บริษัท Radiometer , Denmark รุ่น CDM – 83
12. เครื่องผสมสาร (Touch mixer) บริษัท Fisher Scientific , U.S.A. รุ่น 232
13. เครื่องปั๊ม บริษัท Buchi Laboratechik AG , Switzerland รุ่น CH – 9230
14. เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (Texture analyzer) รุ่น TA – XT 21

2.2 วัสดุภัณฑ์

1. กระดาษกรอง (filter paper) เบอร์ 1 บริษัท Whatman International Ltd., England.
2. ใยแก้ว (glass wool)
3. Aquasorb
4. ถุงไดอะไลซิส (cellulose dialysis tubing) เส้นผ่าศูนย์กลาง 25 mm. MW. cut off = 6,000 – 8,000 ดาลตัน บริษัท Sigma Chemical Company., U.S.A.
5. ซีเอ็มเซลลูโลส (CM-cellulose) บริษัท Sigma, U.S.A.
6. เซฟาเด็กซ์-จี-50 บริษัท Phamacia , U.S.A.

2.3 เคมีภัณฑ์

1. ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (xylan from oat spelts , 10 % arabinose and 15 % glucose contain) บริษัท Sigma, U.S.A.
2. ไซแลนจากเปลือกไม้เบิร์ช (xylan from birchwood , 90 % xylose residues) บริษัท Sigma , U.S.A.
3. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) บริษัท BDH, U.S.A.
4. อะคริลาไมด์ (acrylamide) บริษัท Sigma , U.S.A.
5. N,N'- เมธิลีนบิสอะคริลาไมด์ (N,N'-methylene bis acrylamide) บริษัท Sigma, U.S.A.
6. แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) บริษัท Sigma , U.S.A.
7. เททระเมธิลีนไดอามีน (N,N,N',N'- tetramethylenediamine, TEMED) บริษัท Sigma, U.S.A.
8. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) บริษัท Sigma , U.S.A.
9. สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลูจี-250 (comassie brilliant blue G-250) บริษัท Fluka , Switzerlan
10. 2 – mercaptoethanol บริษัท Sigma , U.S.A.
11. โซเดียมคลอไรด์ บริษัท UNIVAR , Australia

12. * LMW electrophoresis calibration kit (โปรตีนมาตรฐาน)บริษัท Phamacia , U.S.A.
13. * โบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA) บริษัท Sigma , U.S.A.
14. * ดี – ไซโลส (D – xylose) บริษัท Sigma , U.S.A.
15. * ดี – กลูโคส (D – glucose) บริษัท Sigma , U.S.A.
16. * 2,4,6 Trinitrobnzenesulfonic acid (TNBS) Sigma , U.S.A.
17. * Iodoacetamide (IAM) Sigma , U.S.A.
18. * Diethylpyrocabonate (DEPC) Sigma , U.S.A.
19. * N-Bromosuccinimide (NBS) Sigma , U.S.A.
20. * Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) Sigma , U.S.A.
21. * N-Acetylimidazol (NAI) Sigma , U.S.A.
22. * Ethyl dimethylaminopropyl carbodiimide (EDAC) Sigma , U.S.A.

* คือสารเคมี เกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

2.4 พืชทดลอง

กล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum*) ในระยะเวลาของการสุกต่าง ๆ กัน (ภาคผนวกที่ 8)

2.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อในระหว่างการสุกของผลกล้วย

ทำการวัดความแน่นเนื้อด้วยเครื่อง Texture Analyzer : TA-XT 21 ใช้หัวเจาะรุ่น P_2 2 mm DIA Cylinder Stainless โดยเก็บตัวอย่างกล้วยจากหวีเดียวกันในวันที่ 1,2,3,4,5,6,7 นำผลกล้วยตัวอย่างที่ปอกเปลือกแล้ววางที่แท่นวางวัสดุ วัดแรงต้านของการกดจากผิวสัมผัสจนถึงระยะกดในเนื้อ 2 เซนติเมตร ทำการวัดความแน่นเนื้อ 3 ตำแหน่ง ที่บริเวณปลาย กลาง และโคนผล ค่าความแน่นเนื้อที่วัดได้จะเป็นค่า Maximum force มีหน่วยเป็นเซนตรินิวตัน (cN) ทำการหาค่าเฉลี่ยของ Maximum force ที่วัดได้ทั้ง 3 ค่าก็จะได้ค่าความแน่นเนื้อของกล้วย 1 ผล

2.6 การสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ของไซลาเนส

2.6.1 การสกัดแยกไซลาเนสอย่างหยาบ

ดัดแปลงจากวิธีของ Pathak and Sanwal (1998)

นำตัวอย่างกล้วยในระยะต่าง ๆ ของการสุก ที่ผ่านการวัดความแน่นเนื้อแล้วมาทำการตัดเอาส่วนไส้กลางทิ้งไป สับเนื้อกล้วยให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (super blender) ละลายผงละเอียดของเนื้อกล้วยที่ได้ด้วย 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 3.1) ในสัดส่วน 1:1 จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อแยกเก็บส่วนของน้ำใสหรือเอนไซม์อย่างหยาบ วัดแอคติวิตีและปริมาณของโปรตีนเพื่อหาค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์อย่างหยาบ ระยะสุกของผลกล้วยที่ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดจะถูกเลือกในการทำการทดลองขั้นต่อ ๆ ไปโดยทำการเตรียมเอนไซม์อย่างหยาบในขั้นตอนนี้ให้มากเพียงพอตลอดการทดลอง

2.6.2 การหาความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนไซลาเนส

นำเอนไซม์อย่างหยาบที่ได้จากขั้นตอน 2.6.1 มาตกตะกอนโปรตีนโดยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดแล้วอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งกวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นลำดับส่วนคือ 0–20 , 20 - 40 , 40 - 60 , 60 - 80 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 40 , 60 , 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กวนสารแขวนลอยของเอนไซม์ต่อเป็นเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายด้วย 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ในปริมาณที่น้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ทำการไดอะไลส์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนสิ่งปนเปื้อนออกไป วัดปริมาตร ตรวจวัดแอคติวิตีของไซลาเนส และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

2.6.3 การแยกเอนไซม์ด้วยซีเอ็ม-เซลลูโลสโครมาโทกราฟี

แช่ซีเอ็ม-เซลลูโลสใน 0.5 N NaOH ด้วยปริมาตรที่มากเกินพอเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่ง pH เท่ากับ 8.0 แช่เจลต่อด้วย 0.5 N HCl เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเจลด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่ง pH เท่ากับ 7.0 แช่เจลใน 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 3.1) แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตรยาว 15 เซนติเมตร ผ่านสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 2-3 เท่าลงในคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงเพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุล จากนั้นใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 80 % ลงบนผิวหน้าเจล ชะโปรตีนที่ไม่จับกับซีเอ็ม-เซลลูโลสออกด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ติดตามโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับกับเจลออกด้วยความเข้มข้น 0-500 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนใน 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 3.2) เก็บแยกส่วนสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วัดแอคติวิตีของไซลาเนสและติดตามความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์โดยการวัดการนำไฟฟ้าของโซเดียมคลอไรด์ในสารละลาย ทำการรวมเอาลำดับส่วนที่พบกิจกรรมของเอนไซม์เข้าด้วยกันแล้วทำให้เข้มข้นด้วยการกลบด้วย aquasorb แล้วไดอะไลส์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 วัดปริมาตร ตรวจวัดปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของไซลาเนส

2.6.4 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนเซฟาเด็กซ์เจลฟิลเตรชัน จี-50

แช่เซฟาเด็กซ์จี-50 ในน้ำกลั่น แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงทำการเปลี่ยนน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปไล่ฟองอากาศออกโดยใช้ pump ทำการบรรจุเจลที่ผ่านการไล่อากาศแล้วลงในคอลัมน์ขนาด 1.5 x 90 เซนติเมตรให้ได้เจลสูง 85 เซนติเมตร ผ่านสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ด้วยอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุล นำไซลาเนสที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม-เซลลูโลส มาผ่านลงคอลัมน์ แล้วชะโปรตีนด้วย 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ด้วยอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บลำดับส่วนละ 1 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำไป

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของไซลาเนสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมเอาลำดับส่วนที่พบกิจกรรมของเอนไซม์เข้าด้วยกันแล้วทำให้เข้มข้นด้วยการกลบด้วย aqua sorb แล้วไดอะไลส์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของไซลาเนส

2.6.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของไซลาเนสโดยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์ชนิดแผ่น (SDS – Polyacrylamide gel Electrophoresis) (Laemmli , 1970)

2.6.5.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจล 15 เปอร์เซ็นต์

เตรียม separating gel 15 % (2 แผ่น) โดยใช้สารละลาย 30 % พอลิอะคริลาไมด์ 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 5.4) สารละลายทริส – คลอไรด์เอสดีเอสบัฟเฟอร์ pH 8.8 (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 5.2) 2.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ ๆ 50 ไมโครลิตรและ TEMED 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายเจลไปบรรจุลงในแบบเจล (gel mold) ซึ่งเป็นแผ่นกระจกขนาด 8 x 6 x 0.075 cm (ระหว่างแผ่นแก้วมี spacer คั่นอยู่) จนสารละลายมีความสูงประมาณ 5 เซนติเมตร จากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจนจึงเทน้ำกลั่นออกจากผิวหน้าเจล

เตรียม Stacking gel 5 % โดยผสมสารละลาย 30 % พอลิอะคริลาไมด์ ปริมาตร 670 ไมโครลิตร สารละลายทริส – คลอไรด์เอสดีเอสบัฟเฟอร์ pH 6.8 (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 5.3) 1 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 2.3 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ ๆ 30 ไมโครลิตรและ TEMED 5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเทสารผสมนี้ลงบนผิวหน้าเจลของส่วน separating gel โดยให้ระดับสารละลายต่ำกว่าขอบประมาณ 2 มิลลิลิตร ค่อย ๆ ใส่หวี (comb) ลงไป ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นเจลแข็งตัวแล้วจึงค่อย ๆ ดึงหวีออก ล้างผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น 2 - 3 ครั้ง แล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.6.5.2 **การเตรียมตัวอย่าง**

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือ สารละลายผสมของแอลฟา-แลคตาบูมิน (α-Lactabumin) ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor) คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase) โอวัลบูมิน (Ovalbumin) อัลบูมิน (Albumin) และฟอสฟอริเลส บี (Phosphorylase b) ซึ่งมีมวลโมเลกุล 14.4 20.1 35 45 66 และ 97 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์ ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 5.7) ในอัตราส่วน 4 : 1 โดยปริมาตรผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปทำอิเลคโทรโฟริซิส

2.6.5.3 **การทำอิเล็กโทรโฟริซิส**

บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่สารละลายทริส – เอสดีเอสไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ pH 8.3 (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 5.1) ลงในอ่างบัฟเฟอร์ชั้นบนและชั้นล่างให้ท่วมปลายทั้ง 2 ข้างของแผ่นเจล หยอดสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้จาก ข้อ 2.6.5.2 ลงในหลุมเจลที่เตรียมไว้ ในปริมาณหลุมละ 20 ไมโครลิตร แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 20 มิลลิแอมแปร์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ต่อแผ่นเจล จนกระทั่งสังเกตเห็นแถบสี เคลื่อนที่ลงจนใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล จึงหยุดผ่านกระแสไฟฟ้า

2.6.5.4 **การติดตามแถบโปรตีน**

ถ่ายเจลจากข้อ 2.6.5.3 ออกจากแผ่นกระจก แล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมโปรตีน (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 5.8) เป็นเวลาประมาณ 30 นาที ต่อจากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสี (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 5.9) หลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งแผ่นเจลใสและเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏชัดเจน

2.6.5.5 **การคำนวณหามวลโมเลกุลของเอนไซม์**

วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสีน้ำเงินของโปรตีนที่ได้จากการย้อมด้วย comassie brilliant Blue และระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่ในแผ่นเจล นำมาคำนวณหาอัตราการเคลื่อนที่ ดังนี้

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่ (Relative mobility)} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบสีโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

หามวลโมเลกุลโดยเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

2.7 การวัดแอคติวิตีของไซลาเนส

ทำตามวิธีของ Somogyi และ Nelson (1951)

เติมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและสารละลายไซแลนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (saturated substrate) ลงในสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 850 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสพร้อมเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 15 นาที เติมสารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 1.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน ปิดปากหลอดทดลองด้วยลูกแก้วแล้วต้มในน้ำเดือด 15 นาทีเมื่อครบกำหนดเวลานำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที แล้วเติมสารละลายเนลสัน (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 1.2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานไซโลสที่ความเข้มข้น 0 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 1)

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Enzyme Unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไซแลนให้เกิด xylose equivalent 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะการทดลอง

แอคติวิตีจำเพาะ (Specific activity) คือจำนวนหน่วยเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม

2.8 การวัดแอคติวิตีของเซลลูเลส

ทำตามวิธีของ Miller (1959)

เติมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและสารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 850 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสพร้อมเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 15 นาที เติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 1.3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปปิดปากหลอดทดลองด้วยลูกแก้วแล้วต้มในน้ำเดือด 15 นาทีเมื่อครบกำหนดเวลานำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 2)

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Enzyme Unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสให้เกิด glucose equivalent 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะการทดลอง

2.9 การวัดปริมาณโปรตีน

ทำตามวิธีของ Lowry (1951)

นำสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 2.3) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมสารละลายผสม D (ภาคผนวกที่ 1 ข้อ 2.4) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้น 0 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ 3)

2.10 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการของเอนไซม์ที่เตรียมได้

2.10.1 การหามวลโมเลกุลด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนเจลฟิลเตรชัน จี-50

หา void volume และ total volume โดยการผ่านสารละลาย บลูเด็กซ์แทรน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ ชะคอลัมน์ด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 วัดพีคของบลูเด็กซ์แทรนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และวัดพีคของโพแทสเซียมไดโครเมตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร หลังจากนั้นผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งได้แก่ โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) มวลโมเลกุล 68 กิโลดาลตัน โอวัลบูมิน (ovalbumin) มวลโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) มวลโมเลกุล 27 กิโลดาลตัน และ ไซโตโครม ซี (cytochrome C) มวลโมเลกุล 12.5 กิโลดาลตัน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร แล้วทำการชะคอลัมน์ด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 เก็บสารละลายซึ่งแยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน ติดตามโปรตีนที่ออกจากคอลัมน์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้ววัดปริมาตรที่สารละลายโปรตีนผ่านออกมาจากคอลัมน์ แล้วนำไปคำนวณค่า K_{av} ดังนี้

$$K_{av} = V_e - V_o / V_t - V_o$$

V_e คือ elution volume ของคอลัมน์ วัดได้จากปริมาตรของสารละลายบัฟเฟอร์ตั้งแต่ลำดับส่วนแรกจนถึงลำดับส่วนที่มีโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ออกมาจากคอลัมน์

V_o คือ void volume ของคอลัมน์ วัดได้จากปริมาตรของสารละลายบัฟเฟอร์ตั้งแต่ลำดับแรกจนถึงลำดับส่วนที่มีสารละลายบลูเด็กซ์แทรนผ่านออกมาจากคอลัมน์

V_t คือ ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ที่เจลบรรจุอยู่ (total bed volume) วัดได้จากปริมาตรของสารละลายบัฟเฟอร์ตั้งแต่ลำดับแรกจนถึงลำดับส่วนที่มีที่สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตผ่านออกจากคอลัมน์

จากนั้นผ่านสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์แล้วหา elution volume ของเอนไซม์โดยการวัดแอคติวิตีและปริมาณโปรตีน คำนวณค่า K_{av} แล้วเทียบหามวลโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังกล่าวข้างต้น

2.10. 2 การศึกษาหาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

ทำการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยา โดยส่วนผสมของสารละลายในปฏิกิริยาเหมือนกับข้อ 2.7 แต่ทำการบ่มปฏิกิริยาที่เวลาต่าง ๆ กัน (0 , 2 ,4 , 6 , 8 , 10 , 12 , 14 , 16 , 18 , 20 , 25 , 30 , 35 และ 40 นาที) วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น นำผลที่ได้ไปพลอตกราฟระหว่างเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยา และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในรูปของไซโลส เพื่อหาช่วงเวลาที่กราฟมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงเพื่อนำสภาวะที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อ ๆ ไป ความเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งจะใช้ช่วงแรกที่กราฟเป็นเส้นตรงนั้นเรียกว่าความเร็วเริ่มต้น (initial velocity, v_0)

2.10.3 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

กำหนดให้ปริมาณสับสเตรทมากเกินพอ (100 µl xylan sol^n 1% w/v) แล้วทำการแปรผันปริมาตรของเอนไซม์ที่ 10 , 20 , 30 , 40 , 50 , 60 , 70 , 80 , 90 และ 100 ไมโครลิตร วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีข้อ 2.7 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (initial velocity , v_0) และปริมาณเอนไซม์ (E)

2.10.4 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาวัดแอคติวิตีของไซลาเนส ตามวิธีข้อ 2.7 ส่วนผสมของสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วยเอนไซม์ 50 µl สารละลายไซแลน 100 µl (1% w/v) และ สารละลายบัฟเฟอร์ 850 µl ทำการแปรผันความเป็นกรด-ด่างในช่วง pH 3.5-9 เพื่อหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ โดยในช่วง pH 3.5-6 จะใช้อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6-8 จะใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และในช่วง pH 8-9 จะใช้ทริส - คลอไรด์บัฟเฟอร์ เพื่อหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

2.10.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาวัดแอคติวิตีของไซลาเนส ตามวิธีข้อ 2.7 โดยส่วนผสมของสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วยเอนไซม์ 50 µl สารละลายไซแลน 100 µl (1% w/v) และ 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาณ 850 µl แปรผันอุณหภูมิในช่วง 35-90 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

สำหรับการตรวจสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ทำการทดลองโดยนำเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาบ่มกับ 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 35-70 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 30 นาที เมื่อครบเวลาของการบ่มดังกล่าว ทำการวัดแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.7 เปรียบเทียบกับแอคติวิตีตั้งต้นของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ และกำหนดให้มีแอคติวิตีเป็น 100 เปอร์เซนต์

2.10.6 การวิเคราะห์หาค่า K_m (Michaelis constant)

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณ 50 µl มาผสมกับสารละลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelts xylan) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของไซแลนเป็น 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 , 0.5 , 0.6 , 0.7 , 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) ปรับปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วย 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีและหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด จากนั้นหาแอคติวิตีของไซลาเนสตามวิธีข้อ 2.7 สร้างกราฟ Lineweaver - Burk plot และหาค่า K_m จากกราฟ

หาค่า K_m ของเอนไซม์ต่อไซแลนจากเปลือกไม้เบิร์ช (Birchwood xylan) โดยวิธีการเช่นเดียวกันกับการหาค่า K_m ของเอนไซม์ต่อไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelts xylan)

2.10.7 การศึกษาถึงผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาศึกษาถึงผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการบ่มอิออนและเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของอิออนเป็น 0.1 , 1.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ อิออนที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ Ca^{2+} จากแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.5H_2O$)

Cu^{2+} จากคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)

Fe^{2+} จากเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)

Hg^{2+} จากเมอคิวรีคลอไรด์ ($HgCl_2$)

Mg^{2+} จากแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)

Sn^{2+} จากสแตนนัสคลอไรด์ ($SnCl_2$)

Zn^{2+} จากซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)

ทำการวัดแอคติวิตีของไซลาเนสตามวิธีข้อ 2.7 โดยมีแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มกับอิออนโลหะเป็นตัวเปรียบเทียบ

2.10.8 การศึกษากรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อแอคติวิตีของไซลาเนสโดยการดัดแปลงเอนไซม์ด้วยสารเคมี (Copeland , 2000)

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาบ่มกับ 1 มิลลิโมลาร์ ของสารดัดแปลงกรดอะมิโนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ตามวิธีข้อ 2.7 โดยมีแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มกับสารดัดแปลงกรดอะมิโนเป็นตัวเปรียบเทียบ สารดัดแปลงที่ใช้ในการศึกษาจะมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนได้แก่

ดัดแปลงไลซีนด้วย 2,4,6 Trinitrobnzenesulfonic acid (TNBS)

ดัดแปลงซีสเตอีนด้วย Iodoacetamide (IAM)

ดัดแปลงฮีสติดีนด้วย Diethylpyrocabonate (DEPC)

ดัดแปลงทริปโตฟานด้วย *N*-Bromosuccinimide (NBS)

ดัดแปลงเซอรีนด้วย Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

ดัดแปลงไทโรซีนด้วย *N*-Acetylimidazole (NAI)

ดัดแปลงหมู่คาร์บอกไซเลตด้วย Ethyldimethylaminopropyl carbodiimide (EDAC)