บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 Potatoes Dextrose Agar (PDA)

ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อราเพื่อให้สร้างสปอร์ และใช้ในการเก็บรักษาเชื้อรา ประกอบด้วย

มันฝรั่ง (สี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 0.5 เซนติเมตร)	200	กรัม/ลิตร
กลูโคส	20	กรัม/ลิตร
วุ้น	15	กรัม/ลิตร

ต้มมันฝรั่งจนเดือดเป็นเวลานาน 15 นาที นำเฉพาะส่วนน้ำใสมาผสมกับกลูโคสและวุ้น เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดขนาดจุ 20 มิลลิลิตรหลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที จากนั้นนำหลอดมาวางเอียง เมื่อวุ้นแข็งตัวจะได้ PDA slant

3.1.2 Czapek's dox media(Mandels และ Sternberg,1976)

ใช้สำหรับแยกเชื้อราจากกองขยะ และในการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลส ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต, $(NH_4)_2SO_4$	1.4	กรัม/ลิตร
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, KH_2PO_4	2.0	กรัม/ลิตร
ยูเรีย, Urea	0.3	กรัม/ลิตร
แคลเซียมคลอไรด์, $CaCl_2$	0.3	กรัม/ลิตร
แมกเนเซียมซัลเฟต, $MgSO_4.7H_2O$	0.3	กรัม/ลิตร
เฟอรัสซัลเฟต, $FeSO_4.7H_2O$	5.0	มิลลิกรัม/ลิตร
แมงกานีสซัลเฟต, $MnSO_4.H_2O$	1.6	มิลลิกรัม/ลิตร

ซิงค์ซัลเฟต, $ZnSO_4.7H_2O$ 1.4 มิลลิกรัม/ลิตร

โคบอลต์คลอไรด์, $CoCl_2$ 2.0 มิลลิลิตร/ลิตร

ถ้าใช้ในการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลส เติมแอลฟา-เซลลูโลส 1.0 เปอร์เซนต์ โพลี-เปปโทน 0.1 เปอร์เซนต์ ทวีน-80 (Tween-80) 0.2 เปอร์เซนต์ และปรับ pH เป็น 5.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร

3.2 การเตรียมสารละลาย

3.2.1 สารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของSomogyi-Nelson (Somogyi,1945)

3.2.1.1 สารละลายโซโมกิ อัลคาไล คอปเปอร์ (Somogyi's Alkali Copper)

สารละลายนี้ 1 ลิตรประกอบด้วยโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม โปตัสเซียม-โซเดียมตาร์เตรต 12 กรัม โซเดียมคาร์บอเนต 24 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนต 16 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต 4 กรัม เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสได้นานประมาณ 4 เดือน

3.2.1.2 สารละลายอาร์ซีโนโมลิบเดต (Arsenomolybdate)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 42 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายไดโซเดียมออร์โธอาร์ซิเนต ความเข้มข้น 12 เปอร์เซนต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่เตรียมได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมงก่อนใช้ หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้นานประมาณ 4 เดือน

3.2.1.3 สารละลายมาตรฐานกลูโคส

ละลายกลูโคสใน 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2 สารละลายสำหรับการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller,

1959)

3.2.2.1 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS)

นำกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 10 กรัม ฟีนอล 2 กรัม โซเดียมซัลไฟต์ 0.5 กรัม และโปตัสเซียม-โซเดียมตาร์เตรต 200 กรัม ละลายใน 2 เปอร์เซนต์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.2.3 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี (Lowry ,1951)

3.2.3.1 สารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (Alkali Copper)

เป็นส่วนผสมของ 1 เปอร์เซนต์คอปเปอร์ซัลเฟต 1 มิลลิลิตรกับ 1 เปอร์-เซนต์โปตัสเซียม-โซเดียมตาร์เตรต 1 มิลลิลิตร และ 2 เปอร์เซนต์โซเดียมคาร์บอเนต ใน 0.1 โมล/ลิตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.2.3.2 สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ (Phenol reagent)

ผสมโซเดียมทังสเตต 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดต 12.5 กรัม น้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร 85 เปอร์เซนต์กรดฟอสฟอริก 25 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ (reflux) ด้วยความร้อนต่ำๆนาน 10ชั่วโมง แล้วเติม ลิเธียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และน้ำโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาป้องกันแสง และนำไปเก็บในตู้เย็น ก่อนใช้เติมน้ำกลั่นใน อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

3.2.3.3 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ละลาย BSA (เกรดA) 100 มิลลิกรัมด้วย 0.1 โมล/ลิตรสารละลาย อะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.4 สารละลายสำหรับหาปริมาณกลูโคซามีน (Van de Loo ,1976)

3.2.4.1 อะเซติล อะซีโตนรีเอเจนต์ (Acetyl Acetone reagent)

เป็นสารละลาย 4 เปอร์เซนต์อะเซติล อะซีโตนใน 1.25 โมล/ลิตร โซเดียมคาร์บอเนต ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.2.4.2 เออร์ลิกรีเอเจนต์ (Erhlich's reagent)

ละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ 1.6 กรัมในส่วนผสมของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 30 มิลลิลิตรและเอทิลแอลกอฮอล์ 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นได้นาน 2-3 วัน

3.2.4.3 สารละลายมาตรฐานกลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์ (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่งดี-กลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์ 50 มิลลิกรัมละลายด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

3.2.5 สารละลายสำหรับวัดปริมาณกลูโคสโดยวิธีกลูโคส ออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส (Bergmeyer Bernt, 1965)

3.2.5.1 สารละลายผสมบัฟเฟอร์และเอนไซม์ (0.2 โมล/ลิตร ฟอสเฟต pH 7.0 , 40 ไมโครกรัมเปอร์ออกซิเดส/มิลลิลิตร , 250 ไมโครกรัมกลูโคส ออกซิเดส/มิลลิลิตร)

ละลาย 2.07 กรัมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 1.09 กรัมโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.2H_2O$) 6 มิลลิกรัมเปอร์-ออกซิเดส และ 38 มิลลิกรัมกลูโคส ออกซิเดส ด้วยน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นได้นาน 2-3 วัน

3.2.5.2 โครโมเจน (5 มิลลิกรัมออร์โธไดอะนิซีดีน ไดไฮโดร-คลอไรด์/มิลลิลิตร)

ชั่งออร์โธไดอะนิซีดีน ไดไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัมละลายด้วยน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นได้นาน 2-3 วัน

3.2.5.3 สารละลายกลูโคสรีเอเจนต์

นำสารละลายข้อ 3.2.5.1, 50 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายข้อ 3.2.5.2 0.5 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.2.5.4 สารละลายมาตรฐานกลูโคส

ละลายกลูโคส 25 มิลลิกรัมด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติม 70 เปอร์-เซนต์กรดเปอร์คลอริก 0.625 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

3.2.5.5 สารละลายกรดเปอร์คลอริก (0.34 โมล/ลิตร)

นำกรดเปอร์คลอริก (70 เปอร์เซนต์) 2.9 มิลลิลิตรมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.2.6 สารละลายสำหรับใช้ทำโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิส (Ornstein และ Davis ,1964)

3.2.6.1 สารละลายอะไครลาไมด์ (32 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์, 0.8 เปอร์เซนต์ BIS)

นำอะไครลาไมด์ 32 กรัม และ BIS 0.8 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานประมาณ 2 เดือน

3.2.6.2 สารละลาย TEMED ในทริสไฮโดรคลอไรด์

ประกอบด้วยทริส(ไฮดรอกซีเมทิล)เมทิลลามีน 18.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติม 1 โมล/ลิตร กรดไฮโดรคลอริก 24.0 มิลลิลิตร และTEMED 0.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานประมาณ 2 เดือน

3.2.6.3 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (0.14 เปอร์เซนต์)

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.14 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

3.2.6.4 สารละลายอะไครลาไมด์สำหรับสแตกกิงเจล (Stacking-gel)(5 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์ และ 1.25 เปอร์เซนต์BIS)

ละลายอะไครลาไมด์ 5กรัม และBIS 1.25 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.6.5 สารละลายทริส-ฟอสเฟต- TEMED บัฟเฟอร์ pH 7.2

ชั่งทริส 2.85 กรัมละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร เติม 12.8 มิลลิลิตร ของ 1 โมล/ลิตร กรดออร์โธฟอสฟอริก และ 0.1มิลลิลิตร TEMED เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.6.6 สารละลายไรโบฟลาวิน

ละลาย 3 มิลลิกรัมไรโบฟลาวินใน 40 เปอร์เซนต์ซูโครส 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.6.7 สารละลายทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.9

ละลายทริส(ไฮดรอกซีเมทิล)เมทิลลามีน 6.32 กรัม และไกลซีน 3.96 กรัม ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.2.6.8 สารละลาย 80 เปอร์เซนต์ซูโครส

ละลายซูโครส 80 กรัมด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานประมาณ 1-2 สัปดาห์

3.2.6.9 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining solution)

ผสม 0.25 เปอร์เซนต์โคโอมัสซี บริลเลียน บลู (Coomassie brilliant blue , ในน้ำ):เมทิลแอลกอฮอล์:กรดอะซีติก ในอัตราส่วน 45:45:1 โดยปริมาตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง (~ 30 องศาเซลเซียส) เมื่อใช้แล้วถ้ามีตะกอนกรองตะกอนออกก็สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก

3.2.6.10 น้ำยาล้างสีโปรตีน (Destaining solution)

ผสมกรดอะซีติก 75 มิลลิลิตรกับเมทิลแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3.3 การแยกเชื้อราที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกองขยะ

นำขยะประมาณ 10 กรัม มาแช่ด้วยน้ำที่ปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารแขวนลอย (suspension) ของขยะ 0.1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงใน Czapex's dox media ที่ปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร ที่มีกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งตัดเป็นแถบขนาด 2.0 × 10.0 เซนติเมตรจุ่มอยู่ ในขวดรูปชมพู่ (Conical flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร อินคิวเบต (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง (~ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ ถ้ามีเชื้อราที่สามารถย่อยสลายได้ จะเห็นไมซีเลียม (mycelium) อยู่บนกระดาษกรองตรงบริเวณรอยต่อของกระดาษกรองส่วนที่อยู่ในอากาศและส่วนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อได้เชื้อราจากขยะแล้วนำมาแยกให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์โดย streak บนจานเพาะเลี้ยงที่มี Potatoes Dextrose Agar

3.4 การเก็บรักษาเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองถูกเก็บรักษาไว้บน PDA slant ในหลอดที่มีจุกสำลีปิด และปิดทับด้วยกระดาษกาว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานประมาณ 1 ปี เมื่อต้องการใช้ในการทดลองให้นำเชื้อมาเลี้ยงบน PDA slant ใหม่

3.5 การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ

เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราเป็นเอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ดังนั้นหลังจากเลี้ยงเชื้อราใน Czapek's dox media ที่มี 1 เปอร์เซนต์แอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารต้นคาร์บอน โพลีเปปโทน 0.1 เปอร์เซนต์ ทวีน-80 0.2 เปอร์เซนต์ pH เริ่มต้น 5.0 (ตามข้อ 3.1.2) ที่อุณหภูมิและช่วงเวลาที่เหมาะสม แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10นาที แยกส่วนใสเป็น crude enzyme ส่วนตะกอนนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปวัดปริมาณกลูโคซามีนเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา

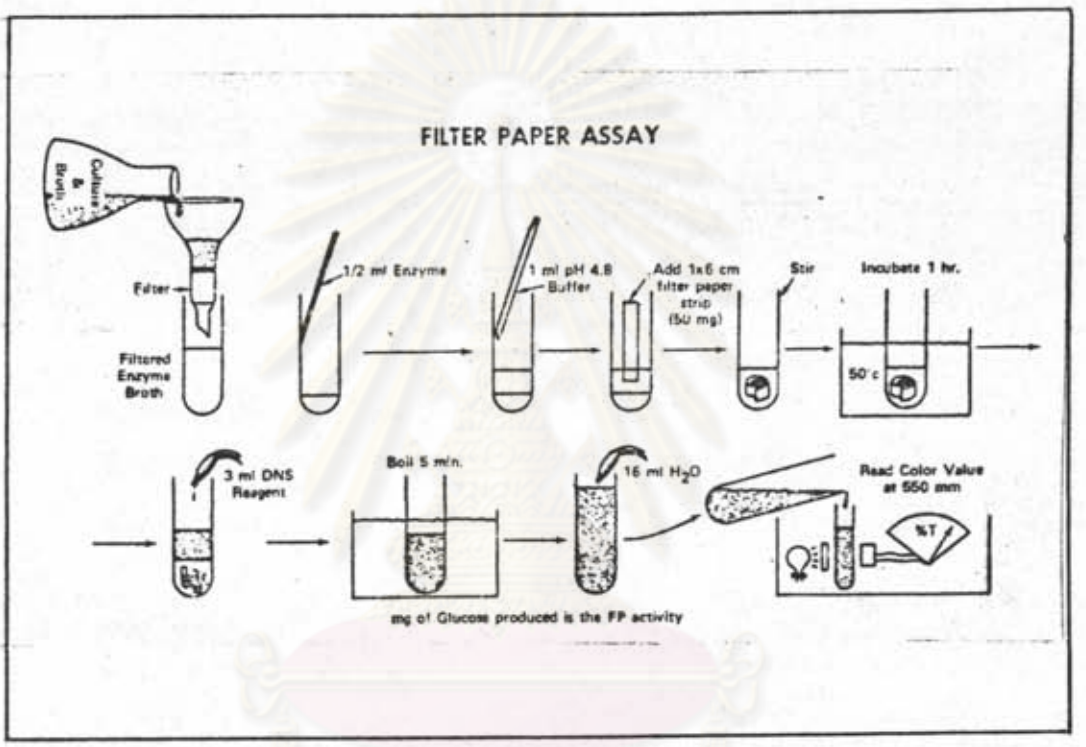
3.6 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ต่างๆ

3.6.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส (Wood และ McCrae , 1978)

อินคิวเบต 0.2 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์กับ 0.4 มิลลิลิตรของ 5 เปอร์เซนต์ (ใน0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0)แอลฟา-เซลลูโลส และ 1.4 มิลลิลิตร 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกริยาโดยการต้ม (100 องศาเซลเซียส) 5 นาที ปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีนาน 5นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สมมูลย์กับกลูโคสมาตรฐานโดยวิธีของ Somogyi-Nelson หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ให้ 1 ไมโครกรัมสมมูลย์กลูโคส (glucose equivalent) ในเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

3.6.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสโดยฟิลเตอร์เปเปอร์แอสเสย์ (Filter paper assay) (Mandels และ Sternberg ,1976)

ผสม 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์กับ 1.0 มิลลิลิตรของสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์(0.05 โมล/ลิตร,pH 4.8) ในหลอดทดลองขนาด 18 มิลลิเมตร ใส่กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ตัดขนาด 1×6 เซนติเมตร (ประมาณ 50 มิลลิกรัม) ผสมด้วยเครื่องผสม Vortex เพื่อให้กระดาษม้วนเป็นชดในสารละลาย (รูปที่ 4) อินคิวเบตที่ 50 องศาเซลเซียสนาน 1ชั่วโมง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS ,ข้อ 3.2.2.1) 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกริยา ต้มในน้ำเดือด 5 นาที นำไปวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร วิเคราะห์ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารละลายโดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นกับสีที่เกิดจากสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่มีปริมาณกลูโคสตั้งแต่ 100-600 ไมโครกรัม จำนวนมิลลิกรัมกลูโคสที่วัดได้คือค่าฟิลเตอร์เปเปอร์แอคติวิตี (FP activity) เมื่อต้องการเปลี่ยนค่า FP แอคติวิตีเป็นหน่วยFP ต่อมิลลิลิตร ทำได้โดยนำค่า FP แอคติวิตีที่ได้จากการทำฟิลเตอร์เปเปอร์แอสเสย์ คูณด้วย 0.185 แต่มีข้อแม้ว่าค่าFP แอคติวิตีนั้นจะต้องเท่ากับหรือน้อยกว่า 2.0 ในกรณีที่ FP แอคติวิตีมีค่าสูงกว่า 2.0 ต้องทำการเจือจางเอนไซม์จนให้ค่า FP แอคติวิตีเท่ากับ 2.0 แล้วนำจำนวนมิลลิลิตรของเอนไซม์ที่ให้ค่า FP แอคติวิตีเท่ากับ 2.0 ไปหาร 0.185 ก็จะได้หน่วย FP ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4 วิธีวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสโดยฟิลเตอร์เปเปอร์แอสเสย์ (Mandels และ Sternberg ,1976)

3.6.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซลาเนส (Okada และคณะ,1980)

ผสม 1.0 มิลลิลิตรของ 1เปอร์เซนต์ไซแลน (ใน 0.1 โมล/ลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์pH 6.5) กับ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกริยาโดยการต้ม (100 องศาเซลเซียส) 5 นาที และนำส่วนใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สมมูลย์กับไซโลสมาตรฐานโดยวิธีของ Somogyi-Nelson หน่วยของเอนไซม์ กำหนดให้เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1ไมโครกรัมสมมูลย์ไซโลส (xylose equivalent)ใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

3.6.4 การวัดแอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส (Wood ,1968)

ส่วนผสมของปฏิกริยาประกอบด้วย 0.5 มิลลิลิตรของ 5.0 มิลลิโมล/ลิตร ออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (o-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside) 0.5 มิลลิลิตรของ 0.2 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.0 และ 1.0 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ หลังจากอินคิวเบตไว้ 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส เติม 2.0 มิลลิลิตรของ 0.4 โมล/ลิตรไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 10.8 นำมาวัดการดูดแสงของออร์โธไนโตรฟีนอล (o-Nitrophenol)ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานออร์โธไนโตรฟีนอล หน่วยของเบตา-กลูโคซิเดสแอคติวิตีคือ ปริมาณเอนไซม์ที่ต้องการในการทำให้เกิด 25 ไมโครกรัมของออร์โธไนโตร-ฟีนอล ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

3.6.5 การวัดแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (Wood และ McCrae, 1977)

วัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นสมมูลย์กับกลูโคสมาตรฐานโดยวิธีของ Somogyi-Nelson เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร อินคิวเบตกับ 0.5 มิลลิลิตรของ 1 เปอร์เซนต์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ใน 0.25 มิลลิลิตรของ 0.2 โมล/ลิตร อะซีเตตบัฟเฟอร์pH 5.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หน่วยของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสแอคติวิตี คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 20 ไมโครกรัมสมมูลย์กลูโคส ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

3.6.6 การวัดแอคติวิตีของอะวิเซลเลส (Wood ,1979)

วัดแอคติวิตีของอะวิเซลเลสได้โดยอินคิวเบต 1.0 มิลลิลิตรของ 1 เปอร์เซนต์ สารละลายอะวิเซล 0.5 มิลลิลิตรของ 0.2 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์pH 4.8 กับสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกริยาโดยการต้มนาน 5 นาที และนำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำส่วนใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi-Nelson หน่วยของอะวิเซลเลสแอคติวิตี คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครกรัมสมมูลย์กลูโคส ในเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

3.7 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson , 1944; Somogyi ,1945)

ผสมสารละลายน้ำตาลตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (ประมาณว่ามีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ 20-150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)กับสารละลายโซโมกิ อัลคาไล คอปเปอร์ (ข้อ 3.2.1.1) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็น เติมสารละลายอาร์ซิโนโมลิบเดต (ข้อ 3.2.1.2) 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารละลายโดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นจากสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

3.8 การวัดการเจริญของเชื้อราโดยการวัดปริมาณกลูโคซามีน (Cochran และ Vercellotti ,1978)

นำส่วนตะกอนที่อบแห้งจากข้อ 3.5 ปริมาณ 0.25 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5.0 มิลลิลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง เพื่อสกัดไคติน (chitin) ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใส 2.0 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดที่มีน้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร ไฮโดรไลซ์ (hydrolyse) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไฮโดรไลเซต 3.0 มิลลิลิตรมาทำให้เป็นกลางด้วย 30 เปอร์เซนต์สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเติมน้ำให้มีปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

นำส่วนใสมาวัดปริมาณกลูโคซามีนโดยวิธีของ Morgan-Elson (ที่ปรับปรุง)

3.9 <u>การวัดปริมาณกลูโคซามีนโดยวิธีของ</u> Morgan-Elson (ที่ปรับปรุง) (Van de Loo ,1976)

ผสมสารละลายกลูโคซามีนที่เตรียมตามข้อ 3.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ประมาณว่ามีกลูโคซามีนอยู่ 25-250 ไมโครกรัม) กับสารละลายอะเซติล อะซีโตน (ข้อ 3.2.4.1) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 20 นาที เติมเอทิลแอลกอฮอล์ 10 มิลลิลิตร และสารละลายเออร์ลิกรีเอเจนต์ (ข้อ 3.2.4.1) 1 มิลลิลิตร หลังจาก 30 นาทีนำไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายมาตรฐานดี-กลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์

3.10 <u>การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของลอรี</u> (Lowry และคณะ,1951)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (ข้อ 3.2.3.1) 5.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ (ข้อ 3.2.3.2) 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดการดูดแสงของสารละลายสีซึ่งเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นจากสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัม

3.11 <u>วิธีวัดปริมาณกลูโคสด้วยกลูโคส ออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส</u> (Bergmeyer และ Bernt ,1965)

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณกลูโคส 0.1 มิลลิลิตรผสมกับกรดเปอร์คลอริค(ข้อ 3.2.5.5) 1.0 มิลลิลิตร (เพื่อตกตะกอนโปรตีน) เขย่าแรงๆ และปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส 0.2 มิลลิลิตรมาวัดปริมาณกลูโคสโดยผสมกับสารละลายกลูโคสรีเอเจนต์ (ข้อ 3.2.5.3) 5.0 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง และอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-40 นาที วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสีที่เกิดขึ้น

จากสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ข้อ 3.2.5.4)

3.12 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส ของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ

3.12.1 การศึกษาช่วงเวลาที่ใช้ในการเจริญและสังเคราะห์ เอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ

เลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะใน Czapek's dox media ตามข้อ 3.1.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยใช้จำนวนสปอร์ 8×10^6 สปอร์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้โดยใช้ความเร็ว 150 รอบต่อ นาที ติดตามการเจริญของราโดยวัดปริมาณกลูโคซามีน (ข้อ 3.8 และ 3.9) วัดการเปลี่ยนแปลงpH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายเอนไซม์ เมื่อเลี้ยงไว้เป็นเวลาต่างๆกัน คือ 0,2,4,6,8,10,12,14, 16 และ 18 วันตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับเชื้อราสายพันธุ์มาตรฐาน T. viride QM 9414

3.12.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ

ทำการทดลองในทำนองเดียวกันกับข้อ 3.12.1 โดยเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30,40,45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.12.3 การศึกษาจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการเจริญและสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ

เลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะในทำนองเดียวกันกับข้อ 3.12.1 แต่ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นต่างๆกัน คือ 6×10^4 , 9×10^4, 12×10^4, และ 18×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และอินคิวเบทไว้ที่อุณหภูมิตามที่ได้ผลจากข้อ 3.12.2 เป็นเวลาตามที่ได้ผลจากข้อ 3.12.1

3.12.4 การศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญและสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ

ทำการทดลองในทำนองเดียวกันกับข้อ 3.12.1 ต่างกันที่จำนวนสปอร์ที่ใช้ซึ่งได้ผลจากข้อ 3.12.3 เลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้น 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ เลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 3.12.3 ติดตามการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราทุกๆ 2 วัน

3.12.5 การศึกษาผลของกลูโคสต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ

ทำการทดลองในทำนองเดียวกันกับข้อ 3.12.1 แต่สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อรานั้นเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสตามผลการทดลองในข้อ 3.12.2 ถึง 3.12.4 และเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0,1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร/ลิตร

3.13 การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณมาก

ทำได้ 2 วิธีดังต่อไปนี้ คือ

3.13.1 เตรียมเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณมากโดยการเลี้ยงเชื้อในเฟอร์เมนเตอร์ (Fermenter)

เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยเลี้ยงเชื้อราซึ่งใช้จำนวนสปอร์ที่เหมาะสม(ผลจากข้อ 3.12.3)ใน Czapek's dox media (ข้อ 3.1.2) 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาดจุ 250 มิลลิลิตร จำนวน 5ขวด ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.12.2) ในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน แล้วใช้เชื้อตั้งต้นที่เตรียมได้นี้ใส่ใน Czapek's dox media(ข้อ 3.1.2) 5 ลิตร เลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์ขนาดจุ 10 ลิตรที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.12.2) อัตราเร็วของการปั่น (agitation) 300 รอบต่อนาที แรงดันอากาศ 2.5 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร และใช้น้ำมันพืชเป็นสารยับยั้งการเกิดฟอง (anti-foam)

20 มิลลิลิตร ติดตามการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่งพบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด จึงนำเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในเฟอร์เมนเตอร์นั้นมาปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสใช้เป็น crude enzyme เพื่อนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อไป

3.13.2 <u>เตรียมเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณมากโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่า</u>

เลี้ยงเชื้อราในทำนองเดียวกันกับข้อ 3.12.1 ในสภาวะที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.12 จำนวน 40 ขวด หลังจากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ใช้ส่วนใสเป็น crude enzyme ที่จะนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อไป

3.14 <u>ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์</u> (Wood ,1969 ,1979)

ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง (~30 องศาเซลเซียส)

3.14.1 <u>การทำสารละลาย</u> crude enzyme <u>ให้เข้มข้นโดยการกรอง</u>ผ่าน Diaflo Membrane PM-30 ด้วยเครื่องอุลตราฟิลเตรชัน(Ultrafiltration)

นำสารละลาย crude enzyme จากข้อ 3.13.1 และ 3.13.2 มากรองผ่านDiaflo Membrane PM-30 ด้วยเครื่องอุลตราฟิลเตรชัน ภายใต้ความดันของกาซไนโตรเจน 30 ปอนด์/ตารางนิ้ว จนกระทั่งมีความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า วัดปริมาตรทั้งหมด วัดปริมาณโปรตีน วัดแอคติวิตีของเซลลูเลส อะวิเซลเลส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และเบตา-กลูโคซิเดสของสารละลาย crude enzyme ที่เข้มข้น

3.14.2 <u>การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต</u>

เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งบดละเอียดลงในสารละลาย crude enzyme เข้มข้นจากข้อ 3.14.1 อย่างช้าๆ พร้อมทั้งคนเบาๆ จนสารละลายมีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 0-80 เปอร์เซนต์โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแฟรคชัน

(fraction)ละ 20 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นคนต่อไปอีก 30 นาที นำไปปั่นเก็บตะกอนที่เกิดขึ้นด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ของแต่ละแฟรคชันด้วย 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 วัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน แอคติวิตีของเซลลูเลสในแต่ละแฟรคชัน และวัดแอคติวิตีของอะวิเซลเลส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และเบตา-กลูโคซิเดสในแฟรคชันที่มีแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity)ของเซลลูเลสสูงที่สุด

3.14.3 <u>การทำเอนไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์ด้วยการกรองผ่านเจลโดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100</u> (Sephadex G-100)(Wood ,1968,1979)

3.14.3.1 <u>การเตรียมคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-100</u>

แช่เซฟาเด็กซ์ จี-100 ปริมาณ 35 กรัมใน 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ที่มี 0.02 เปอร์เซนต์โซเดียมเอไซด์ 500 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน หรือที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ นำมาบรรจุลงในหลอดแก้วตรงขนาด 2.0 x 100 เซนติเมตร ให้ได้เจลสูง 90 เซนติเมตร ผ่านสารละลาย 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเด็กซ์ จี-100 อีกประมาณ 18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยอัตราการไหล 8 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แรงดันสารละลายเท่ากับ 15 เซนติเมตรของน้ำ เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์

3.14.3.2 <u>การใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100</u>

เติมสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.14.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 ชะด้วย 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตรติดต่อกัน 100 หลอดด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน (Fraction collector) นำสารละลายทุกหลอดเว้นหลอดมาวัดการดูดแสงเหนือม่วงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเซลลูเลส อะวิเซลเลส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เบตา-กลูโคซิเดส และไซลาเนส ในกรณีที่ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์รวมแฟรคชันซึ่งมีแอคติวิตีของเอนไซม์เข้าด้วยกัน วัดปริมาตรทั้งหมดและวัดแอคติวิตีรวม แต่ในกรณีที่ใช้ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ นอกจากวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แต่ละชนิดในแต่ละแฟรคชันแล้ว จะต้องวัดปริมาตรของแต่ละ

I15911790

แฟรคชันด้วย

3.14.4 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) (Wood ,1968,1972,1979)

3.14.4.1 การเตรียมคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

แช่ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50ปริมาณ 3 กรัมในสารละลาย 0.5 โมล/ลิตร กรดอะซีติกปริมาณมากเกินพอ และปล่อยให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ เทส่วนใสพร้อมทั้งเจลที่เล็กๆทิ้ง และเติม 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ทำเช่นนี้หลายๆครั้ง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมงหรือต้ม 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลมาบรรจุลงในหลอดแก้วตรงขนาด 1.7× 30 เซนติเมตรให้ได้เจลสูง 25 เซนติเมตร ผ่านสารละลาย 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 อย่างน้อย 2 เท่าของ bed volumeเพื่อให้แน่ใจว่าคอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์ วัดpH ของสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์จนกระทั่งได้ pH 5.0

3.14.4.2 การใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 (ข้อ 3.14.3.2)ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร (มีโปรตีนประมาณ 10.0 มิลลิกรัม) เติมลงในคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ชะด้วย 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 5.0 มิลลิลิตรติดต่อกัน จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์ เปลี่ยนเป็นชะด้วย linear salt gradient (150 มิลลิลิตรของอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 และ 150 มิลลิลิตรของอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ที่มี 0.5 โมล/ลิตรโซเดียมคลอไรด์) เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 5.0 มิลลิลิตรติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายทุกหลอดเว้นหลอดมาวัดการดูดแสงเหนือม่วงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเซลลูเลส อะวิเซลเลส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เบตา-กลูโคซิเดส และไซลาเนส แล้วนำแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์มารวมกัน วัดปริมาตรและแอคติวิตีรวมของเอนไซม์แต่ละชนิด

3.15 วิธีแยกโปรตีนด้วยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิสชนิดแท่ง (Disc-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

การแยกเอนไซม์ด้วยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิส ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Ornstein และ Davis (Ornstein และDavis ,1964)

3.15.1 การเตรียมโพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแท่ง

ผสมสารละลาย TEMED (ข้อ 3.2.6.2) 2 ส่วน สารละลายอะไครลาไมด์ (ข้อ 3.2.6.1) 2 ส่วน และสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ข้อ 3.2.6.3) 4 ส่วนโดยปริมาตรเข้าด้วยกัน (ส่วนผสมนี้มีอะไครลาไมด์ 8 เปอร์เซนต์) บรรจุลงในหลอดแก้วขนาด 0.6× 10.0 เซนติเมตร ที่ปิดปลายข้างหนึ่งด้วยพาราฟิล์ม จนกระทั่งสารละลายในหลอดแก้วมีความสูง 8.0 เซนติเมตร ค่อยๆหยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่างรวดเร็วแต่แผ่วเบา แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน เทน้ำกลั่นออกจากหน้าเจล เตรียมสแตกกิง-เจล (stacking-gel)โดยผสมสารละลาย 5 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์ (ข้อ 3.2.6.4) 3 มิลลิลิตร สารละลายทริส-ฟอสเฟต- TEMED (ข้อ 3.2.6.5) 1.5 มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน ล้างหลอดแก้วที่มีเจลด้วย 0.1 มิลลิลิตรของสารผสมสแตกกิง-เจล และเติมสารผสมสแตกกิง-เจล 0.15 มิลลิลิตรลงในหลอดที่มีโพลีอะไครลาไมด์เจล ทิ้งไว้ให้เจลโพลิเมอร์ไรซ์อย่างสมบูรณ์ประมาณ 30 นาที ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.15.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์

นำสารละลายเอนไซม์จากขั้นตอนต่างๆในการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งต้องการวิเคราะห์ (มีปริมาณโปรตีน 100-200 ไมโครกรัม)จำนวน 400 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 80 เปอร์เซนต์ ซูโครส 50 ไมโครลิตร แล้วดูดส่วนผสมนั้นหยอดลงบนเจลที่เตรียมไว้

3.15.3 การทำอีเลคโตรโฟรีซิส (Electrophoresis)

บรรจุแท่งเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่บัฟเฟอร์ลงในอ่างบัฟเฟอร์ทั้งบนและล่างจนกระทั่งท่วมปลายแท่งเจลทั้งสองข้าง ผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปในเจลที่ยังไม่ได้หยอดสารละลายโปรตีน (prerun gel) โดยใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 3 มิลลิ

แอมแปร์/เจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน หลังจากนั้นจึงหยอดสารละลายโปรตีนลงบนหน้าเจล และหยด 0.01 เปอร์เซนต์บรอมฟีนอลบลู 1-2 มิลลิลิตรลงในบัฟเฟอร์ในอ่างบน ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 3 มิลลิแอมแปร์/เจล ตัดกระแสไฟฟ้าเมื่อแถบสีบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนถึงระยะทางประมาณ 1 เซนติเมตรจากปลายล่างของแท่งเจล

3.15.4 วิธีย้อมโปรตีนในโพลีอะไครลาไมด์เจล

นำเจล(ข้อ 3.15.3)ออกจากหลอดแก้ว แล้วนำไปแช่ในสารละลาย 10 เปอร์เซนต์กรดอะซีติก เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นย้อมสีโปรตีนด้วยน้ำยาย้อมสีโปรตีน (ข้อ 3.2.6.9) เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงนำเจลไปล้างสีส่วนที่ติดเจลออกด้วยน้ำยาล้างสี (ข้อ 3.2.6.10) จนเจลใส และแถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏชัดเจน นำแท่งเจลไปวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของบรอมฟีนอลบลูและโปรตีน

3.15.5 วิธีวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในโพลีอะไครลาไมด์เจล

นำเจล (ข้อ 3.15.3)ออกจากหลอดแก้ว ตัดแท่งเจลออกเป็นชิ้นขนาดชิ้นละ 0.5 เซนติเมตร บีบผ่านหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร แช่ใน 1.0 มิลลิลิตร 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสมาวัดแอคติวิตีของคาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลส และเบตา-กลูโคซิเดส

3.16 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

3.16.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ใช้วิธีกรองผ่านเจลโดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 และเซฟาเด็กซ์ จี-100

3.16.1.1 การเตรียมคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-200

แช่เซฟาเด็กซ์ จี-200 ปริมาณ 24 กรัมใน 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ที่มี 0.2 เปอร์เซนต์โซเดียมเอไซด์ ปริมาตร 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน หรือที่ 80 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่

นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ของ Pharmacia 26K ขนาด 2.6 X 100 เซนติเมตร ให้ได้เจลสูง 90.0 เซนติเมตร ผ่านสารละลาย 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์pH 5.0 ลงในคอลัมน์ที่บรรจุเซฟาเด็กซ์ จี-200 อีกประมาณ 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยอัตราการไหล 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แรงดันสารละลาย 10 เซนติเมตรของน้ำ เพื่อเม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยสารละลายบลูเด็กซ์แตรน 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.16.1.2 <u>การศึกษาน้ำหนักโมเลกุล</u>

3.16.1.2.1 <u>คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200</u>(ข้อ 3.16.1.1) ใช้สารละลายมาตรฐาน คือ คาตาเลส (Catalase , น้ำหนักโมเลกุล 240,000 ดาลตัน) อัลบูมิน (Albumin , BSA น้ำหนักโมเลกุล 67,000 ดาลตัน) และไซโตโครม-ซี (Cytochrome-C ,น้ำหนักโมเลกุล 12,270 ดาลตัน) ผสมกันให้มีความเข้มข้นตัวละ 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรผ่านลงในคอลัมน์

3.16.1.2.2 <u>คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100</u> (ข้อ 3.14.3.1) ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานอัลบูมิน ไคโมทริปซิโนเจน-เอ (Chymotrypsinogen A, น้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน) และไซโตโครม-ซี ผสมกันให้มีความเข้มข้นตัวละ 5,0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์

เก็บสารละลายซึ่งแยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 5.0 มิลลิลิตรติดต่อกันโดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน วัดปริมาตรของสารละลายโปรตีนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ทุกหลอด และวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตรสำหรับโปรตีนทั่วไป และ 410 นาโนเมตรสำหรับไซโตโครม-ซี นำไปคำนวณค่า K_{av} ดังนี้

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e คือ elution volume ของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์

V_o คือ void volume ของสารละลายบลูเด็กซ์แตรน

V_t คือ ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่ (total bed volume)

หลังจากนั้นผ่านสารละลายเอนไซม์ที่จะหาน้ำหนักโมเลกุล คือ เบตา-

กลูโคซิเดส (เตรียมจากข้อ 3.14.3.2) ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสและอะวิเซลเลส (เตรียมจากข้อ 3.14.4.2) ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 เก็บสารละลายแยกส่วนทุก 5.0 มิลลิลิตร นำไปวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วัดปริมาตร และวัดแอคติวิตีของเบตา-กลูโคซิเดส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และอะวิเซลเลส เพื่อหา elution volume ของเอนไซม์ที่ผ่านออกจากคอลัมน์คำนวณค่า K_{av} แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังกล่าวข้างต้น

3.16.2 <u>การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาของเอนไซม์</u>

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ต่างๆตามวิธีในข้อ 3.6 โดยอินคิวเบตสารละลายเอนไซม์กับสับสเตรตในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าpH ต่างๆ คือ 2.0-5.0 (0.2 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์), 6.0-7.0 (0.2 โมล/ลิตรฟอสเฟตบัฟเฟอร์), 8.0 (0.2 โมล/ลิตร ทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์)

3.16.3 <u>การศึกษาผลของ pH ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์</u> (pH stability)

นำเอนไซม์มาอินคิวเบตกับสารละลายบัฟเฟอร์ pHต่างๆตั้งแต่ 4.0-10.0 pH 4.0-8.0 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวในข้อ 3.16.2 ส่วน pH 9.0-10.0 ใช้ 0.2 โมล/ลิตรสารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ โดยใช้อัตราส่วนเอนไซม์ : บัฟเฟอร์เป็น 1:1 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 และ 20 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.6

3.16.4 <u>การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาของเอนไซม์</u> (Optimum temperature)

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.6 ที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 30-90 องศาเซลเซียส

3.16.5 <u>การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์</u> (Thermal stability)

นำเอนไซม์มาอินคิวเบตที่อุณหภูมิต่างๆในช่วงระหว่าง 30-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5, 1, 2,และ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตาม

วิธีในข้อ 3.6

3.16.6 การศึกษาผลของสับสเตรตต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ต่างๆตามวิธีในข้อ 3.6 โดยใช้สับสเตรตที่จำเพาะต่อเอนไซม์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ และหาค่า K_m โดยอาศัยวิธีของ Lineweaver-Burk ซึ่งทำได้โดยการพลอตระหว่างส่วนกลับของอัตราเร็วของการเกิดปฏิกริยากับส่วนกลับของความเข้มข้นของสับสเตรต

3.16.7 การศึกษาค่า K_i ของกลูโคสต่อเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสตามวิธีในข้อ 3.6.4 เมื่อใช้ความเข้มข้นของสับสเตรตต่างๆที่ความเข้มข้นของกลูโคสคงที่ และหาค่า K_i โดยอาศัย Lineweaver-Burk Plot

3.17 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ

แบ่งเอนไซม์เซลลูเลสเป็น 2 ชุด ชุดหนึ่งเติม 0.02 เปอร์เซนต์โซเดียมเอไซด์ อีกชุดหนึ่งไม่เติม 0.02 เปอร์เซนต์โซเดียมเอไซด์ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2,7,14,30,60 และ 180 วัน แล้วจึงนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.18 การศึกษาเสถียรภาพขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำเอนไซม์องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7,60 และ 90 วัน แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ต่างๆตามวิธีในข้อ 3.6

3.19 การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะซึ่งมีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลส เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นสารคันคอคาร์บอน

3.19.1 การเตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด

ตัดฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด ให้เป็นชิ้นเล็กๆขนาด 0.5 เซนติเมตร นำมาล้างทำความสะอาด และแช่น้ำไว้โดยเปลี่ยนน้ำทุก 3 ชั่วโมงในช่วงกลางวัน จนกระทั่งวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำล้างได้ต่ำกว่า 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ทำให้ละเอียดด้วย Waring blender และร่อนผ่านตะแกรงที่มีช่องขนาด 2.0 มิลลิเมตร

3.19.2 การเลี้ยงเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะใน Czapek's dox media (ข้อ 3.1.2) 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร มีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.19.1 เป็นสารต้นคอ คาร์บอน ความเข้มข้นที่ใช้เท่ากับ 1 เปอร์เซนต์ pH เริ่มต้น 5.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสติดตามการเจริญโดยวัดปริมาณกลูโคซามีน (ข้อ 3.8 และ 3.9) แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส และการเปลี่ยนแปลงpH ของอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 2 วัน โดยเปรียบเทียบกับเมื่อใช้แอลฟา-เซลูโลสเป็นสารต้นคอคาร์บอน

3.20 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส

อินคิวเบตสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเตรียมไว้ตามข้อ 3.14.1 2.0 มิลลิลิตร กับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.19.1 และแอลฟา-เซลลูโลสซึ่งมีความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซนต์ใน 0.1 โมล/ลิตรอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 48.0 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดตามวิธีในข้อ 3.7 และปริมาณกลูโคสตามวิธีในข้อ 3.11 ที่เวลา 0,0.5,1,2,4,24, 30 และ 48 ชั่วโมง

3.21 การศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราที่แยกได้จากกองขยะ

3.21.1 เมื่อมีแอลฟา-เซลลูโลสเป็นสารต้นคอคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อราใน Czapek's dox media (ข้อ 3.1.2)ที่มีแอลฟา-เซลลูโลส 1 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาดจุ 250 มิลลิลิตร pH เริ่มต้น 5.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าขวดด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยใช้สปอร์เริ่มต้น 9×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร แล้วติดตามการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนส โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซลาเนสตามวิธีในข้อ 3.6.3 ทุกๆ 2 วัน

3.21.2 <u>เมื่อมีฟางข้าวเป็นสารต้นคาร์บอน</u>

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.21.1 แต่ใช้ฟางข้าวที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.19.1 เป็นสารต้นคาร์บอนแทนแอลฟา-เซลลูโลส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย