บทที่ 4

วิธีทดลอง

วิธีเตรียมเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ในสารอาหารชนิดยีสต์-มอลต์ (YM) อย่างเหลว ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสร้อยละ 0.5 ผงเซลลูโลสร้อยละ 1 ในขวดกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วย reciprocal shaker ในอัตรา 150 รอบ/นาที (ระหว่างการคัดเลือกเชื้อ) หรือในอัตรา 200 รอบ/นาที (สำหรับ TISTR 3335) ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อถึงเวลาตามกำหนด รินส่วนใสไปปั่นแยกที่ 13300 x g นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์หา CMCase activity

วิธีวิเคราะห์หาเซลลูเลสแอคทิวิตีโดยวิธี Dye release assay

1. วิธีการย้อมสีกระดาษกรอง (Dyed paper)

1.1 นำกระดาษกรอง whatman No. 1 (ขนาด 46 x 57 เซนติเมตร) วางบนถาดล้างรูป (ขนาด 54 x 48 x 8 เซนติเมตร) เติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดบนจานร้อน ไล่ฟองอากาศขณะต้มเดือดด้วยลูกกลิ้งทาสี

1.2 เติมสี Remazol Brilliant Blue R (ร้อยละ 0.6 ในน้ำเดือด) 250 มิลลิลิตรลงในถาด เอียงถาดไปมาให้สีกระจายทั่วกระดาษ

1.3 เติมสารละลายโซเดียม ซัลเฟต (ร้อยละ 30 ในน้ำเดือด) 20 มิลลิลิตรต่อกระดาษกรอง 1 แผ่น เอียงถาดไปมาให้สีกระจายโดยทั่ว

1.4 หยดสารละลายไตรโซเดียม ฟอสเฟต (ร้อยละ 10 ในน้ำเดือด) 15 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 10 นาที

1.5 เทน้ำออกและล้างสีที่มีมากเกินพอออกไปด้วยน้ำกลั่น เมื่อเห็นว่าน้ำที่ใช้ล้างใสดีแล้วให้ล้างซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยเมทธานอล แล้วทำให้แห้ง

1.6 ตัดกระดาษที่แห้งแล้วให้มีขนาด 1 x 6 เซนติเมตร ซึ่งจะมีน้ำหนักโดยประมาณ 50 มิลลิกรัม

2. การเตรียมเส้นกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

2.1 ใช้กระดาษกรองที่ย้อมแล้ว (ขนาด 1 x 6 เซนติเมตร 50 มิลลิกรัม) 1 ชิ้น ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 18 x 150 มิลลิเมตร นำไปปั่นให้กระดาษขดม้วนเป็นเกลียว หรืออาจใช้มือม้วน

2.2 เติม 0.05 โมลาร์ โซเดียม ซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 4.8 จำนวน 2 มิลลิลิตร

2.3 เตรียมสารละลายเซลลูคลาส (celluclast ของบริษัทโนโว) ขนาดร้อยละ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร เติมสารละลายเซลลูคลาสความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในบัฟเฟอร์ข้อ 2.2 ผสมแล้วปั่นนาน 1 ชั่วโมงที่ 50 องศาเซลเซียส

2.4 เติมกรดไฮโดรคลอริค 2 นอร์แมล จำนวน 0.2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา

2.5 รินสารละลายใสใส่หลอดวัดการดูดกลืนแสง ทิ้งให้เส้นใยตกตะกอนนาน 5 นาที

2.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบศูนย์ นำค่าที่อ่านได้ไปเขียนเส้นกราฟมาตรฐาน

3. วิเคราะห์หา CMCase activity จากตัวอย่าง

นำส่วนใสของตัวอย่างเอนไซม์ที่เตรียมได้ 1 มิลลิลิตร มาทดสอบเปรียบเทียบกับเซลลูคลาส

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Somogyi และ Nelson

1. การเตรียมเส้นกราฟมาตรฐาน

1.1 เตรียมสารละลายกลูโคสในน้ำให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1.2 เติมสารละลาย Somogyi 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปิดปากหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว นำไปต้มเดือดเป็นเวลา 20 นาที และแช่ลงในน้ำแข็งให้สารละลายเย็นลงทันที

1.3 เติมสารละลายเนลสัน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้ไปเขียนเส้นกราฟมาตรฐาน

2. วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารตั้งต้นโดยเซลลูเลส

2.1 นำส่วนใสของตัวอย่างเอนไซม์จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส 2 มิลลิลิตร หมักไว้นาน 30 นาที ครบกำหนดเวลานำ 1 มิลลิลิตร มาตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี 1.2, 1.3, 1.4 เปรียบเทียบกับเมื่อใช้น้ำกลั่นแทนเอนไซม์

2.2 หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากเส้นกราฟมาตรฐาน

วิธีวิเคราะห์หา CMCase activity

1. สารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 จำนวน 9 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายตัวอย่างเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร

2. นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

3. วัดค่าความหนืดโดยใช้เครื่องวัดความหนืดชนิดออสวาล์ดเบอร์ 3 วัดขณะมีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับโซเดียม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.8

วิธีทดลองหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลลูเลส

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดยีสต์-มอลต์ (YM broth) จำนวน 250 มิลลิลิตรในขวดกรวยขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคสร้อยละ 0.5 ผงเซลลูโลสร้อยละ 1 ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างในแต่ละขวดกรวยดังนี้ 3, 4, 5, 6, 7, 8

2. นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. ใส่เชื้อรา TISTR 3335 ลงในขวดกรวยที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ที่เตรียมไว้จำนวน 1×10^7 สปอร์โดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique)

4. นำไปเขย่าโดยใช้ reciprocal shaker ที่ 150 รอบ/นาที ครบ 8 วัน เก็บตัวอย่างเอนไซม์มาทดสอบ CMCase activity

วิธีทดลองหาอัตราการเขย่าที่เหมาะสม (อัตราการใช้ออกซิเจน) ต่อการผลิตเซลลูเลส

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดยีสต์-มอลต์ จำนวน 250 มิลลิลิตร ในขวดกรวยขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคสร้อยละ 0.5 ผงเซลลูโลสร้อยละ 1 ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7

2. นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. ใส่เชื้อรา TISTR 3335 จำนวน 1×10^7 สปอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากข้อ 1, 2 โดยวิธีปราศจากเชื้อ

4. นำไปเขย่าที่อัตรา 100, 150, 200, 250 รอบ/นาที ครบ 8 วันเก็บตัวอย่างเอนไซม์มาทดสอบ CMCase activity

วิธีทดลองหาแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมเพื่อใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดยีสต์-มอลต์ จำนวน 250 มิลลิลิตรในขวดกรวยขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมร้อยละ 2 ของเซลลูโลสชนิดต่าง ๆ ดังนี้ คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส ผงเซลลูโลส (KC floc) เซลโลไบโอส อะวิเซล (avicel) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7

2. นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. ใส่เชื้อรา TISTR 3335 ลงในขวดกรวยที่มีสารคาร์บอนต่างชนิดกัน จำนวน 1×10^7 สปอร์โดยวิธีปราศจากเชื้อ

4. นำไปเขย่าด้วยอัตรา 200 รอบ/นาที ครบ 8 วัน เก็บตัวอย่างเอนไซม์มาทดสอบ CMCase activity

วิธีทดลองหาแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดยีสต์-มอลต์ จำนวน 250 มิลลิลิตร ในขวดกรวยขนาด 1000 มิลลิลิตร โดยไม่เติมเปปโตน เติม ผงเซลลูโลส (KC floc) ร้อยละ 2 และเติมร้อยละ 0.5 ของสารไนโตรเจนดังต่อไปนี้ ไกลซีน ยูเรีย ยูเรียผสมกับแอมโมเนียมซัลเฟต (ในอัตราส่วน 1:1) แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรต ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นให้เท่ากับ 7

2. นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. ใส่เชื้อรา TISTR 3335 จำนวน 1 x 10^7 สปอร์ลงในขวดกรวยที่เตรียมไว้จากข้อ 1, 2 โดยวิธีปราศจากเชื้อ

4. นำไปเขย่าด้วยอัตรา 200 รอบ/นาที ครบ 8 วัน เก็บตัวอย่างเอนไซม์มาทดสอบ CMCase activity

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 250 มิลลิลิตร ตามส่วนประกอบที่ทดลองไว้แล้วว่าเหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสในขวดกรวยขนาด 1000 มิลลิลิตร 4 ขวด ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7

2. นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. ใส่เชื้อรา TISTR 3335 จำนวน 1 x 10^7 สปอร์ในแต่ละขวด โดยวิธีปราศจากเชื้อ

4. นำไปเขย่าด้วยอัตรา 200 รอบ/นาที ครบ 8 วัน เก็บสารละลายเอนไซม์ในแต่ละขวดรวมกัน วัด CMCase activity วัดปริมาตรที่ได้ แล้วนำไปไดแอไลท์ (dialyse) ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.8 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ครั้งละ 10 เท่าของปริมาตรที่วัดได้ 3 ครั้ง นานครั้งละ 45 นาที ในแต่ละครั้งต้องกวนให้บัฟเฟอร์กระจายไปทั่วโดยสม่ำเสมอทุก ๆ 10 นาที ทำในห้องที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. รวบรวมสารละลายเอนไซม์หลังไดแอไลท์ นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีดังต่อไปนี้

5.1 แอนไอออน-เอกเชนจ์ โครมาโทกราฟี
(anion-exchange chromatography)

ใช้ DEAE-Bio-Gel-A (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California) เป็นตัวดูดซับแลกเปลี่ยนไอออนลบกับเซลลูเลส ในคอลัมน์ขนาดยาว 60 เซนติเมตร รัศมี 1 เซนติเมตร

หลังเติมเซลลูเลสลงในคอลัมน์จนหมดแล้วล้างดูดซับด้วย 0.01 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 จำนวน 1 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ แล้วจึงล้างดูดซับต่อด้วย linear gradient ของโซเดียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 0 - 1 โมลาร์ ในอัตราการล้างดูดซับ 1 มิลลิลิตร/นาที (Fugino และคณะ, 1989) เก็บตัวอย่างหลังผ่านคอลัมน์ทุก 10 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บตัวอย่าง (fraction collector) นำแต่ละส่วนไปตรวจหาโปรตีนโดยวิธีลาวรีและ CMCase activity

เก็บตัวอย่างเฉพาะที่ตรวจพบมี CMCase activity รวมกัน แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

5.2 เจล-ฟิลเตรชั่น โครมาโทกราฟี
(Gel-filtration Chromatography)

ใช้ Sephacryl-S-200 HR เป็นเจลดูดซับใส่ในคอลัมน์ขนาดยาว 120 เซนติเมตร รัศมี 0.7 เซนติเมตร ค่อย ๆ เติมเอนไซม์ที่รวบรวมได้จาก 5.1 ลงในคอลัมน์จนหมดแล้วจึงล้างดูดซับด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ในโซเดียม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ด้วยอัตราการล้างดูดซับ 0.5 มิลลิลิตร/นาที (Fugino และคณะ, 1989) เก็บตัวอย่างหลังผ่านคอลัมน์ทุก ๆ 5 มิลลิลิตร นำไปตรวจหาโปรตีนโดยวิธีลาวรี และ CMCase activity . เลือกเก็บเฉพาะตัวอย่างที่ตรวจพบมี CMCase activity สูงสุด นำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

5.3 ฟาสต์-โปรตีน-ลิควิด โครมาโทกราฟี
(Fast-protein-liquid-chromatography)

ใช้คอลัมน์สำเร็จรูปชนิด Mono Q HR ขนาด 0.5 x 5 เซนติเมตร แยกเอนไซม์ที่ได้จาก 5.2 โดยล้างดูดซับด้วย Linear gradient ของโซเดียมคลอไรด์ 0 - 1 โมลาร์ ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ อัตราที่ใช้ในการล้างดูดซับ 1 มิลลิลิตร/นาที เก็บตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ทุก ๆ 1 มิลลิลิตร นำส่วนที่พบมีโปรตีนลาวรีมากที่สุด และบริเวณใกล้เคียงไปทดสอบหา CMCase activityเลือกเอาส่วนที่มี CMCase activity สูงสุดไปตรวจความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธีการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้าผ่านเจล

5.4 โพลีเอคริลเลไมด์ เจล อิเล็กโทรฟลอรีซิส
PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis)

5.4.1 เตรียม สแตคกิ้ง เจล (stacking gel) ให้มีความเข้มข้นของเจลอยู่ระหว่าง 3-5%

5.4.2 เตรียมเซพาเรทติ้ง เจล (separating gel) ให้มีความเข้มข้นของเจลอยู่ระหว่าง 9-15%

5.4.3 เทเจลในข้อ 5.4.2 ลงในแผ่นแยก (separating chamber) ให้ ขอบบนของเจลต่ำกว่าปลายหวี (comb) ประมาณ 2 เซนติ เมตร รอจนเจลแข็งตัว (ระหว่างรอให้ค่อย ๆ หยดน้ำจาก หลอดหยดลงบนผิวเจล เพื่อให้เจลที่

เกิดขึ้นมีผิวหน้าเรียบสม่ำ เสมอ) เทเจลในข้อ 5.4.1 ลงทับบนเจลที่แข็งตัวแล้ว แล้วจิงค่อย ๆ วางหวีลงเพื่อให้เกิดเป็นช่องว่างตามชื่อของหวี (well) สำหรับใส่สารตัวอย่างซึ่งจะมีขนาด 0.3 x 0.9 x 0.1 = 0.027 มิลลิลิตร

5.4.4 ละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ เติมบรอมฟีนอล บลู (bromphenol blue) 0.002% น้ำหนัก/ปริมาตร แล้วนำไปต้มเดือดเป็นเวลานาน 3-5 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5.4.5 เติมเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอน 5.4.4 ลงในเวล (well) ให้มีปริมาตรเป็น 1/2 ของเวล

5.4.6 วางแผ่นแยก ลงในทริส-ไกลซีน บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.3 (Tris glycine. buffer pH 8.3) ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องทำการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า ทำการแยกโดยใช้ไฟฟ้าขนาด 10 แอมแปร์ 15 โวลต์

5.4.7 หลังจากเดินเครื่องนาน 3 ชั่วโมง จะเห็นแถบสีของบรอม-ฟีนอล บลู เคลื่อนลงมาที่ขอบล่างของเจลให้หยุดเดินเครื่อง แยกแผ่นเจลออกมาย้อมด้วย คูมาซี บลู อาร์-250 (Coomasie blue R-250) เป็นเวลานาน 45 นาที

5.4.8 ล้างสีย้อมออกโดยใช้สารละลายของเมทธานอล 100 มิลลิลิตร ผสมกับกรดน้ำส้มล้วน 75 มิลลิลิตร และน้ำ 825 มิลลิลิตร จนกระทั่งพื้นแผ่นเจลใส เห็นเฉพาะแถบสีน้ำเงินของโปรตีนที่ติดสีคูมาซี-บลู-อาร์ 250 เท่านั้น

5.4.9 เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลสที่บริสุทธิ์กับโปรตีนที่ใช้เป็นมาตรฐาน (LMW calibration kit)

แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

เอนไซม์ที่ผลิตได้โดยเชื้อราชนิด TISTR 3335 ใน 0.01 โมลาร์ โซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8

↓

DEAE-Bio-Gel A ไอออน เอกเชนจ์ โครมาโทกราฟี (1 ซม. x 60 ซม.) ล้างดูดซับด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 - 1 โมลาร์ อัตราการล้างดูดซับ 1 มิลลิลิตร/นาที เก็บตัวอย่างทุก 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง

↓

รวบรวมเอนไซม์ในหลอดที่มี CMCase activity สูงสุด วัดปริมาตรที่ได้และตรวจหาค่าโปรตีนโดยวิธีลาวรี

↓

เจลฟิลเตรชั่น โดยใช้คอลัมน์ Sephacryl S-200 HR (0.7 ซม. x 120 ซม.) ล้างดูดซับด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ใน 0.01 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 อัตราการล้างดูดซับ 0.5 มิลลิลิตร/นาที เก็บตัวอย่างทุก 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง

↓

รวบรวมเอนไซม์ในส่วนที่มี CMCase activity สูงสุด วัดปริมาตรที่ได้และตรวจหาค่าโปรตีนโดยวิธีลาวรี

↓

FPLC โดยใช้คอลัมน์สำเร็จรูปชนิด Mono Q HR ขนาด 0.5 x 5 เซนติเมตร ล้างดูดซับด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0 - 1 โมลาร์ ใน 0.01 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 อัตราการล้างดูดซับ 1 มิลลิลิตร/นาที เก็บตัวอย่างทุก 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง นำแต่ละหลอดที่ตรวจพบมีโปรตีนสูงไปตรวจหา CMCase activity เก็บส่วนที่เหลือของหลอดที่มี CMCase activity สูงสุดไปหาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์

↓

ตรวจดูความบริสุทธิ์ของเอนไซม์จาก เอส-ดี-เอส-โพลีเอคริลเลไมด์ เจล อิเล็กโทรฟลอรีซิส เปรียบเทียบกับ low-molecular weight calibration kit

วิธีทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลสที่บริสุทธิ์

1. สารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 ใน 0.05 โมลาร์ โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 9 มิลลิลิตร ผสมกับ 1 มิลลิลิตรสารละลายเอนไซม์

2. บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ระหว่าง 20 - 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที

3. บ่มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วทิ้งให้เย็นถึง 37 องศาเซลเซียส วัดค่าความหนืด เปรียบเทียบกับเมื่อใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 แทนสารละลายเอนไซม์

วิธีทดลองหาความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

1. สารละลายเอนไซม์จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55, 70, 90 องศาเซลเซียส นาน 0 - 30 นาที

2. หลังจากครบเวลาที่ต้องการแล้ว เติมสารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 จำนวน 9 มิลลิลิตร

3. นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วบ่มในน้ำเดือดนาน 5 นาที

4. ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึง 37 องศาเซลเซียส วัดค่าความหนืด

วิธีทดลองหาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต้อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

1. ใช้สารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 ในน้ำจำนวน 9 มิลลิลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ 0.8 มิลลิลิตร ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ กันระหว่าง 4 - 9.5 โดยใช้บัฟเฟอร์ชนิดที่เหมาะสมตามค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ดังนี้ แอซีเตรท บัฟเฟอร์ (acetate buffer) โปแตสเซียม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 4 - 6, 6 - 8, 8 - 9.5 ตามลำดับ

2. เติมสารละลายเอนไซม์ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

3. บ่มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงตรวจวัดความหนืด

วิธีทดลองหาความคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ (pH stability assay)

1. นำสารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 ในน้ำ จำนวน 9 มิลลิลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 4 - 9.5 จำนวน 0.8 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 0.2 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันนาน 15 นาที

2. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และบ่มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้จนเย็นถึง 37 องศาเซลเซียส นำไปตรวจวัดความหนืด

วิธีทดสอบ ผลของสารเคมีต่อการทำงานของเซลลูเลส

1. นำสารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด

2. เติมสาร $MgCl_2$ $HgCl_2$ Iodoacetamide 2-mercaptoethanol DTT PCMB จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดผสมให้เข้ากันแล้วเติมเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้ว 0.5 มิลลิลิตร

3. เติมโปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 จำนวน 0.85 มิลลิลิตร เพื่อให้ในหลอดทดลองทุกหลอดมีปริมาตรทั้งสิ้น 6 มิลลิลิตร

4. บ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาในน้ำเดือดนาน 5 นาที นำไปวัดค่าความหนืด

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของลาวรี

(Lowry method for protein determination : Lowry และคณะ, 1951)

1. วิธีเตรียมกราฟมาตรฐาน

1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีนอัลบูมินจากซีรัมของวัว (ซึ่งมีไนโตรเจนร้อยละ 16) ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีจำนวนโปรตีน 0, 50, 100, 200, 300 ไมโครกรัม ใน 0.5 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีนอัลบูมินจากซีรัมของวัว

หลอดที่	จำนวนสารละลายมาตรฐานที่ใช้ (มิลลิลิตร)	จำนวนน้ำที่ใช้ (มิลลิลิตร)	จำนวนโปรตีน ใน 0.5 มิลลิลิตร (ไมโครกรัม)
1	0.0	0.05	0
2	0.05	0.45	50
3	0.10	0.40	100
4	0.20	0.30	200
5	0.30	0.20	300

1.3 เติมสารทดสอบโปรตีน (Protein reagent) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

1.4 เติม 0.5 มิลลิลิตรสารละลาย Folin-Ciacalteus Phenol reagent ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ครบกำหนดเวลานำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากโปรตีนอัลบูมินจากซีรัมของวัว

2. วิธีทดสอบ

นำเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร มาทดสอบหาโปรตีนตามวิธี 1.3, 1.4 แล้วนำค่าที่ได้ไปอ่านหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย