บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือ

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) แบบ Spectronic 20D และ Spectronic 2000 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท Radiometer Copenhagen, Denmark

- เครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ (Bench top centrifuge) บริษัท Kokusan Enshinki Co., Ltd., Japan

- เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่อุณหภูมิต่ำ (Refrigerated centrifuge) บริษัท Beckman Instrument Inc., U.S.A.

- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking water bath) บริษัท Heto Lab Equipment, Denmark และ Gyrotary water bath shaker บริษัท Brunswick Scientific Co., Inc, Edison, U.S.A.

- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) บริษัท Charles Hearson Co., Ltd., England

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Heraeus, Germany

- เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Hirayama Manufacturing Coorperation, Japan

- เครื่อง High Performance Liquid Chromatography บริษัท Shimadzu, Japan

- เครื่องเก็บแยกส่วน (Fraction collector) บริษัท LKB-Productor AB, Sweden

- เครื่องปั๊มแบบเพอริสตอลติก (Peristaltic pump) บริษัท LKB-Productor AB, Sweden

- Diaflo Ultrafilter แบบ Stirred Ultrafiltration Cell 8050

บริษัท Amicon W.R. Grace Coorperation, U.S.A.

- ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร Model MD-300 บริษัท L.E. Marubishi, Japan

- ถังปฏิกิริยาแบบกวนควบคุมอุณหภูมิได้ ขนาด 80 มิลลิลิตร

2.2 เคมีภัณฑ์

Standard α-,β-,ɣ-cyclodextrin (CD) และ Soluble starch บริษัท Fluka A.G. Buchs S.G., Switzerland

Soluble starch (potato) และ Diethylaminoethyl Cellulose บริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

Soluble starch และ Trichloroethylene (TCE) บริษัท BDH Laboratory Chemical Division, England

Acetonitrile (HPLC grade) บริษัท J.T. Baker Chemical, U.S.A.

สารเคมีทั่วไปชนิดอื่น ๆ เป็นเกรดวิเคราะห์ทั้งหมดจากบริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A., บริษัท BDH, England และ บริษัท Difco Laboratories, U.S.A. ส่วนแป้งข้าวเจ้า (ตราช้างสามเศียร) แป้งข้าวโพด (ตราไมซิน่า) แป้งมันสำปะหลัง (ตราปลามังกร) เป็นแป้งซึ่งใช้ในการประกอบอาหารซื้อจากร้านค้าทั่วไป

2.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Bacillus A11 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987) ส่วน *Bacillus circulans* ATCC 21783 เป็นบาซิลลัสสายพันธุ์มาตรฐานที่ซื้อจาก American type collection ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

019659

2.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	5 กรัม
Peptone	10 กรัม
NaCl	2 กรัม
Yeast extract	2 กรัม
Soluble starch (Fluka)	10 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเติม Bacto agar 15 กรัมต่อลิตร

2.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium II

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Corn steep liquor	50 กรัม
Soluble starch (BDH)	10 กรัม
K_2HPO_4	1 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 9.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์

2.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi (ดัดแปลงจาก Horikoshi, 1971)

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Starch	10 กรัม
Peptone	5 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
K_2HPO_4	1 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 กรัม
Na_2CO_3	7.5 กรัม

pH เริ่มต้น 10.1

2.5 <u>การเตรียมสารละลาย</u>

2.5.1 สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

2.5.1.1 สารละลายแป้งมาตรฐาน

ละลายแป้งมันสำปะหลัง (potato soluble starch) 0.2 หรือ 2.0 กรัมใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร น่าไปต้มจนเดือด

2.5.1.2 สารละลายไอโอดีน (Iodine reagent)

ละลายไอโอดีน 0.2 กรัม และโปแตสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา เมื่อต้องการใช้ให้เจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10

2.5.2 สารละลายสำหรับหาโปรตีน

ละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 100 มิลลิกรัม เอธานอล 95 เปอร์เซนต์ 50 มิลลิลิตร และกรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซนต์ (w/v) 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

2.5.3 สารละลายสำหรับหา DNA

2.5.3.1 สารละลายไดฟีนิลเอมีน (Diphenylamine reagent)

ละลายไดฟีนิลเอมีน 2 กรัม ในกรดอะซีติคเข้มข้น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

2.5.3.2 สารละลายอะซีตัลดีไฮด์ (aqueous acetaldehyde)

ปิเปตอะซีตัลดีไฮด์ 0.01 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร โดยเตรียมในตู้ควันและแช่น้ำแข็งตลอดเวลา

2.5.3.3 สารละลาย DNA มาตรฐาน

ละลาย calf thymus DNA 0.1 กรัม ใน 10 เปอร์เซนต์ Perchloric acid (PCA) 100 มิลลิลิตร

2.6 <u>การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

2.6.1 การเก็บรักษาระยะสั้น

เก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I ชนิดแข็งโดยหลังจากการเขี่ยเชื้อจะบ่มเชื้อไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 วัน

แล้วย้ายไปเก็บจุลินทรีย์ที่ 4°ซ และทำการถ่ายเชื้อทุกเดือน

2.6.2 การเก็บรักษาระยะยาว

เลี้ยงแบคทีเรียให้เจริญเต็มที่ใน slant (Medium I) แล้วเท liquid parafilm ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ลงบน slant จนท่วมขึ้นมาประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาหลอดและพัน parafilm ให้แน่น เก็บที่อุณหภูมิ -70°ซ นานประมาณ 1 ปี

2.7 การเลี้ยงเชื้อและศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์

2.7.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Start inoculum)

เขี่ยเชื้อ 1 loopfull จาก agar plate ใส่ลงใน อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Medium I ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ จนสามารถวัดความขุ่นของอาหารเหลวที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.3-0.5

2.7.2 การเพาะและติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ในขวดเขย่ารูปชมพู่

ใส่เชื้อตั้งต้นปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ ลงใน Medium II หรือ Horikoshi's medium ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ โดยดูดน้ำเลี้ยงเชื้อออกมา 5 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ (Top bench centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ แล้วแยกเซลล์และส่วนน้ำใสออกจากกัน นำตะกอนเซลล์ไปหา DNA ส่วนน้ำใสนำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

2.8 การปรับสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase ในปริมาณสูง

เปรียบเทียบสูตรอาหาร Medium II และ Horikoshi's medium ในการเลี้ยง *Bacillus* A11 เพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase หลังจากนั้นทดลองใช้วัตถุดิบทางการเกษตรในประเทศ คือแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งต้นคาร์บอนแทน soluble starch (BDH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อและปรับปริมาณ Na_2CO_3 ใน Horikoshi's medium ตั้งแต่ 0.5-1.0เปอร์เซนต์ โดยเตรียมเชื้อตั้งต้นตามวิธีข้อ 2.7.1และเพาะเลี้ยงแบคทีเรียตามวิธีข้อ 2.7.2

2.9 การเพาะและติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมเชื้อตั้งต้นตามวิธีข้อ 2.7.1ให้มีปริมาณเป็น 5 เปอร์เซนต์ของปริมาณอาหารในถังหมักขนาด 5 ลิตร แล้วทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม โดยการหาอัตราการกวน (agitation) และการให้อากาศ (aeration) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase ในถังหมักดังรูปที่ 2.1 โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ มาปั่นแยกเซลล์และส่วนน้ำใสตามข้อ 2.7.2

2.10 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

2.10.1 Dextrinizing activity (Iodine method)

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Fuwa (1954)

เติมสารละลายเอนไซม์ 10 ไมโครลิตร (กรณี free CGTase) หรือตัวค้ำที่ตรึงเอนไซม์แล้ว 5 มิลลิกรัม (น้ำหนักเปียก) (กรณี immobilized CGTase) ลงในสารละลายแป้งมันสำปะหลัง (potato soluble starch) 0.2 เปอร์เซนต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์ 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติม iodine reagent ลงไป 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

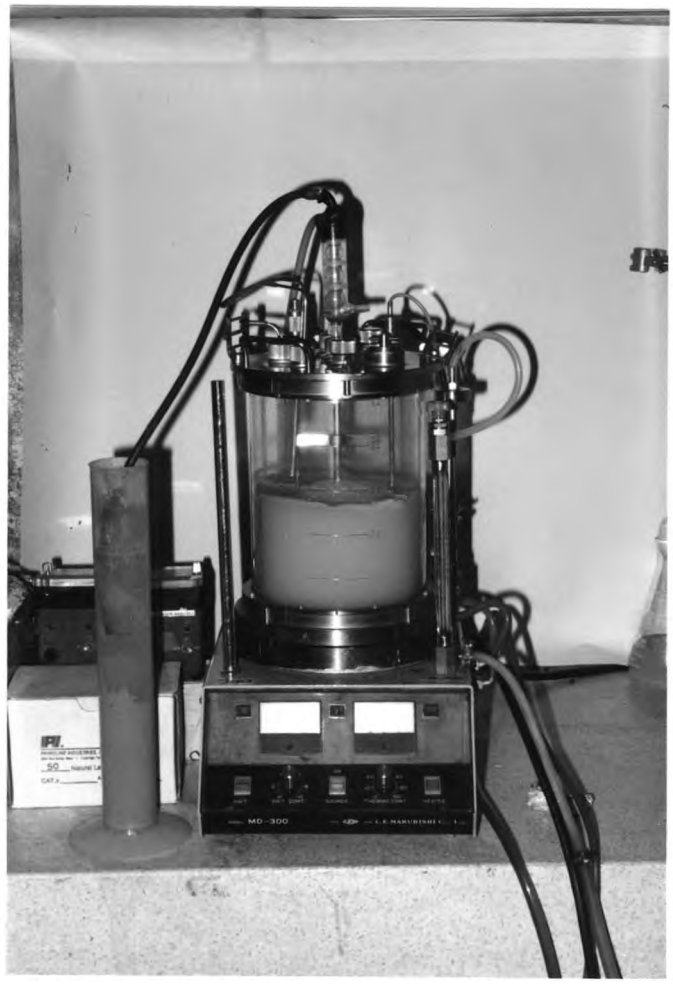
หลอดควบคุม (control) ให้ใส่เอนไซม์หลังการเติมกรดไฮโดรคลอริก

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือปริมาณเอนไซม์ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของสีน้ำเงินของสารประกอบแป้ง-ไอโอดีนลดลง 10 เปอร์เซนต์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

2.10.2 Cyclodextrin-trichloroethylene assay (CD-TCE assay)

ดัดแปลงจากวิธีของ Nomoto และคณะ (1986) เป็นการวัดปริมาณสารไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ CGTase โดยให้เกิดตะกอนกับสารไตรคลอโรเอธิลีน

เจือจางสารละลายเอนไซม์ในอัตราส่วนต่าง ๆ (1:2,1:4,1:8,...) โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร



รูปที่ 2.1 การผลิตเอนไซม์ CGTase ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

แล้วเติมสารละลายแป้ง 2.0 เปอร์เซนต์ ในข้อ 2.5.1.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายไตรคลอโรเอธิลีน (Trichloroethylene) 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดค้างคืน บันทึกผลการเกิดตะกอน cyclodextrin-trichloroethylene complex เป็นค่า dilution limit ($1:2^n$)

กำหนดให้ dilution limit ($1:2^n$) คือ 1:2, 1:4,1:8,...$1:2^n$ เป็นค่าที่สารละลายเอนไซม์เจือจางมากที่สุดที่ยังสังเกตเห็นตะกอนขาวที่เกิดขึ้นระหว่างชั้นแป้งและสารไตรคลอโรเอธิลีนได้

2.10.3 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ในกรณีของไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้จากการตกตะกอนด้วยสารไตรคลอโรเอธิลีน นำตะกอนไปละลายในน้ำกลั่นปริมาตรเล็กน้อย ต้มในน้ำเดือดจนตะกอนละลายหมด วัดปริมาตรของสารละลาย แล้วนำสารละลายไปกรองด้วยกระดาษกรอง millipore (0.45 μm) แล้วนำไปวิเคราะห์แยกชนิดและปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ Supelco-NH_2 column ขนาด 4.6 mm ID. x 25 cm ชะด้วยสารละลายผสม acetonitrile : water 75:25 (โดยปริมาตร) ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ Refractive index detector และฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานผสมของ α-,β-,ɣ-ไซโคลเดกซ์ทริน ความเข้มข้นชนิดละ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ในกรณีไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตในถังปฏิกิริยาจากเอนไซม์ที่ถูกตรึง ไม่ใช้วิธีมาตกตะกอนด้วยสารไตรคลอโรเอธิลีนแต่นำสารละลายตัวอย่างมากรองส่วนน้ำใสด้วยกระดาษกรอง millipore (0.45 μm) แล้วนำไปวิเคราะห์แยกชนิดและปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินด้วยเทคนิค HPLC ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

วิเคราะห์ชนิดของไซโคลเดกซ์ทรินในสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) กับสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐานและหาปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินได้ โดยอ่านค่าปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินแต่ละชนิดในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐานแต่ละชนิด

2.11 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ทำตามวิธีของ Bradford (1976)

ใช้สำหรับวัดปริมาณโปรตีน 10-100 ไมโครกรัม

นำสารละลายเอนไซม์ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโปรตีน (Protein reagent) 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic 20 D ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin fraction V

2.12 การวัดปริมาณ DNA

ทำตามวิธีของ Richard (1974)

ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ (Normal saline) 2 ครั้ง แล้วละลายตะกอนด้วยกรดเปอร์คลอริก 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 20 นาที ทำให้เย็นในน้ำแข็ง แล้วจึงนำไปปั่นแยกส่วนน้ำใสด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายไดฟีนิลเอมีนปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายอะซีตัลดีไฮด์ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีแล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นแล้ววัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic 20 D ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณ DNA ในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลาย calf thymus DNA มาตรฐาน

2.13 การทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์บางส่วน (Partial purification)

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีการของ Kato และ Horikoshi (1983)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่น Beckman J-21C ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสคือสารละลายเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ขั้นตอนแรกใช้วิธีการดูดซับด้วยแป้ง โดยเติมแป้งข้าวโพดปริมาณ 5 กรัมเปอร์เซนต์ของปริมาณสารละลายเอนไซม์ (แป้งข้าวโพดที่ใช้ผ่านการอบฆ่าเชื้อในตู้อบอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นก่อนใช้) คนเบา ๆ ด้วย

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองแยกตะกอนแป้ง แล้วนำมาล้างด้วย 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ 2 ครั้ง หลังจากนั้นชะเอนไซม์ออกจากตะกอนแป้งด้วยการกวนในบัฟเฟอร์เดิมซึ่งมี 0.2 โมลาร์ มอลโตส โดยกวนที่อุณหภูมิ 4°ซ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที กรองแยกส่วนน้ำใสแล้วนำไปกรองด้วย Ultrafilter YM 10 ที่อุณหภูมิ 4°ซ นำสารละลายส่วนที่ไม่ผ่านกระดาษกรองไป dialyze ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4°ซ โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ซึ่งขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้สรุปไว้ในรูปที่ 2.2

2.14 <u>การตรึงเอนไซม์ (Enzyme immobilization)</u>

2.14.1 การเตรียม DEAE-cellulose

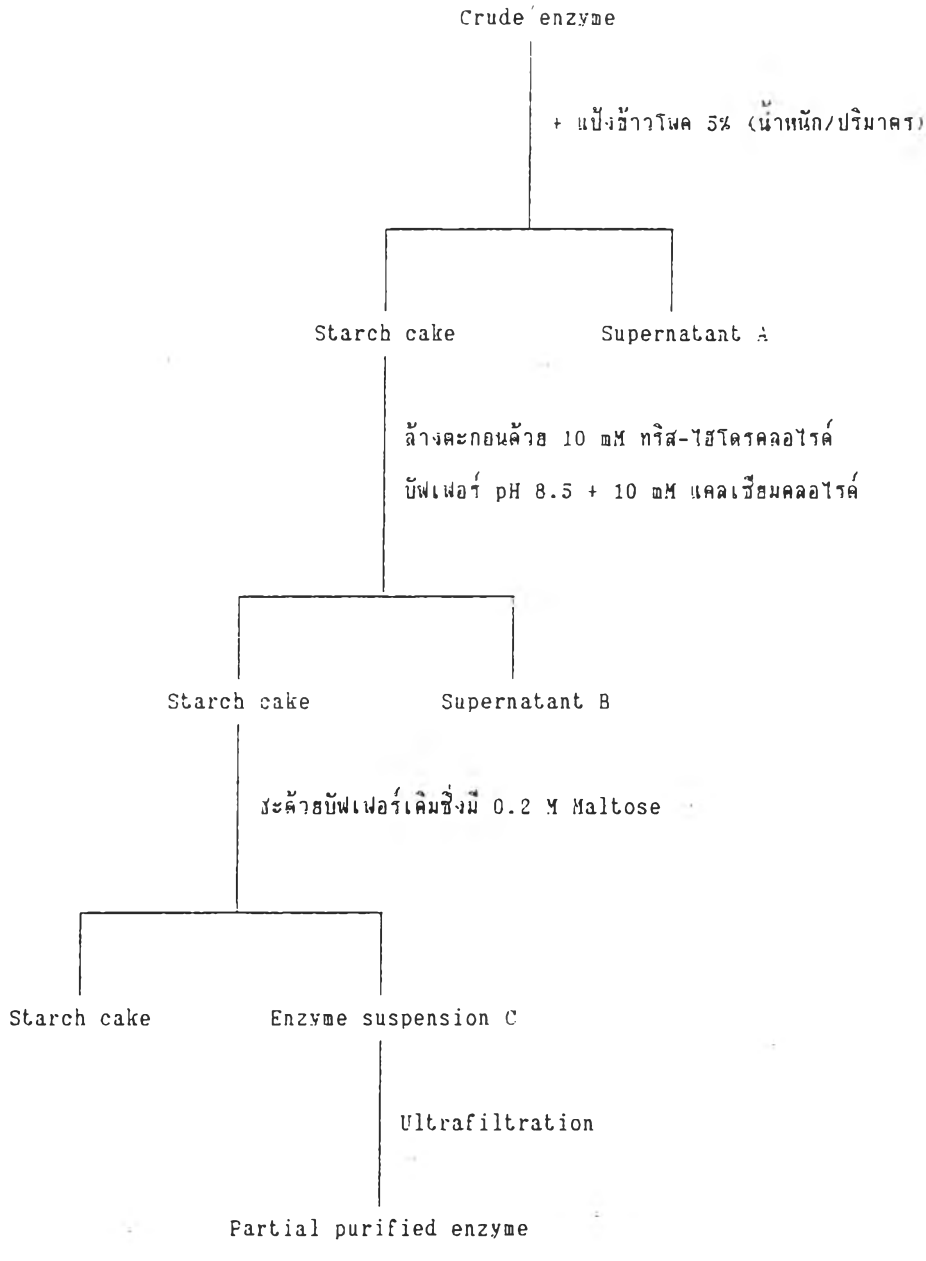
ล้าง DEAE-cellulose ด้วย 0.5 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนเบา ๆ ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วล้างด้วย 0.5 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนเบา ๆ ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ล้างด้วย 100 mM, 50 mM และ 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ อย่างละ 2 ครั้ง

2.14.2 การตรึงเอนไซม์

ผสมสารละลายเอนไซม์ 22 มิลลิลิตร (350 U/ml) กับ DEAE-cellulose ที่เตรียมได้จากข้อ 2.14.1 จำนวน 50 กรัม เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30°ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกเรซินออกมาเก็บใน 100 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4°ซ

2.15 <u>การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาแบบกวน (stirred tank) แบบไม่ต่อเนื่อง</u>

ถังปฏิกิริยาที่ใช้ทำด้วยภาชนะแก้วรูปทรงกระบอก 2 ชั้น มีเส้นผ่าศูนย์กลางของแก้วชั้นใน 3.7 เซนติเมตร สูง 8 เซนติเมตร ปริมาตรประมาณ 80 มิลลิลิตร ภาชนะแก้วชั้นนอกมีท่อสำหรับต่อน้ำควบคุมอุณหภูมิ (รูปที่ 2.3) ควบคุมอุณหภูมิโดยปั๊มน้ำจากเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ทำการกวนสารในถังปฏิกิริยาโดยแท่งแม่เหล็ก บนเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กด้วย



รูปที่ 2.2 แผนภาพขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.3 แสดงถังปฏิกิริยาแบบกวนขนาด 80 มิลลิลิตร

ความเร็วที่ทำให้ตัวค้ำมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ

ใส่เอนไซม์ที่ถูกตรึงบน DEAE-cellulose หนัก 12 กรัม ผสมกับ soluble starch ที่มีความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ ปริมาณ 36 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกิริยาตามรูปที่ 2.4 ที่อุณหภูมิ 40°ซ วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นในถังปฏิกิริยาในช่วงเวลาต่าง ๆ โดยนำตัวอย่างมาประมาณ 1 มิลลิลิตร กรองตามวิธีทำข้อ โดยวิธี 2.10.3 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

2.16 <u>การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาแบบกวน (stirred tank) แบบต่อเนื่อง</u>

2.16.1 การหาความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่อง

ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบน DEAE-cellulose หนัก 12 กรัม ผสมกับ soluble starch ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1.25 ถึง 5.0 เปอร์เซนต์ ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ ปริมาณ 36 มิลลิลิตร อัตราการป้อนสับสเตรทเข้าสู่ถังปฏิกิริยา 3 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นในถังปฏิกิริยาในช่วงเวลาต่าง ๆ โดยวิธี HPLC เช่นเดียวกับข้อ 2.15

2.16.2 การหาอัตราการป้อนสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่อง

ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบน DEAE-cellulose หนัก 12 กรัม ผสมกับ soluble starch ที่มีความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 5 mM แคลเซียมคลอไรด์ ปริมาณ 36 มิลลิลิตร อัตราการป้อนสับสเตรทเข้าสู่ถังปฏิกิริยาตั้งแต่ 2 ถึง 4.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นในถังปฏิกิริยาในช่วงเวลาต่าง ๆ โดยวิธี HPLC เช่นเดียวกับข้อ 2.15

รูปที่ 2.4 การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาแบบกวน