บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือ

- Blendor , Waring
- Conductivity meter , CDM 3 , Radiometer Copenhagen , Denmark
- Dynac Centrifuge , Clay Adams , Beeton , Dickenson and Company , N.J. , U.S.A.
- Fraction collector , LKB , Bromma , Sweden
- Gel Electrophoresis Apparatus GE-4 , Pharmacia Fine Chemicals , Sweden.
- Hotplate Magnetic Stirrer , Cenco Instrumenten MU.N.V., Breeda , The Natherlands.
- Lamina Flow Biological Safety Cabinet , NuAire, Inc., Minnesota , U.S.A.
- Lyophilizer, The Virtis Company Gardiner, N.Y., U.S.A.
- Macro-Set Transfer pipetting system, A Brunswick Company U.S.A.
- Microtube pump , ELYA, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan
- pH Meter 51, Radiometer Copenhagen, Denmark
- Power supply, type 3290 B, LKB , Sweden
- Quick Scan Jr. TLC , Helena Laboratories , U.S.A.
- Shakerbath , Cenco Instrumenten B.V., Breeda, The Netherlands

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Spectronic 21 , Bausch & Lomb Inc., U.S.A.
- Sorvol RC-SB Refrigerated Superspeed Centrifuge , E.I. duPont de Nemours & Co. (Inc.), U.S.A.
- Super mixer , Cat.No. 1290 , Lab-Line Instruments , Inc., ILL., U.S.A.
- UV-Vis spectrophotometer, Model 635 , Varien Techtron, PTY. Ltd., Australia
- ตู้เลี้ยงเชื้อ , Heraeus
- ตู้อบ , Model 1087 A , Boekel
- หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)

2.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้

- Acetic acid, glacial (May & Baker Ltd., Dagenham, England)
- Acrylamide (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- N, N'-Methylene-bis-acrylamide (BDH Chemicals Ltd., Poole England)
- Aldolase (Pharmacia Fine Chemicals , Sweden)
- Ammonium persulphate (May & Baker Ltd., Dagenham, England)
- Ammonium sulphate (E. Merck,Germany)
- Agar , Powder type IV (Sigma Chemical Company, U.S.A.)
- Avicel pH-101 (Fluka A.G., Buch S.G., Switzerland)
- Blue dextran (Sigma Chemical Company, U.S.A.)
- Bovine serum albumin (Sigma Chemical Company, U.S.A.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Bromophenol blue (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- Calcium carbonate (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- Carboxymethylcellulose, sodium salt (Wako pure Chemical Industries, Ltd., Japan)
- Catalase (Pharmacia Fine Chemicals ,Sweden)
- Celite 545, filter acid (Fluka A.G., Buch SG., Switzerland)
- Cellulase from Trichoderma viride (BDH Chemical Ltd., Poole, England)
- α - Cellulose (Sigma chemicals company, U.S.A.)
- Chymotrypsinogen A from bovine pancrease, Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)
- Citric acid (BDH Chemicsls Ltd., Poole, England)
- Sodium citrate (May & Baker Ltd., Dagenham, England)
- Coomassie Brilliant blue (Sigma Chemicals Company, U.S.A.)
- 3,5-Dinitrosalicylic acid (Fluka A.G., Buch S.G. , Switzerland)
- Ethanol (Ayudthaya, Thailand)
- Ferrous sulphate (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- Glass wool
- D-Glucose anhydrous (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- Glycine (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- Hydrochloric acid (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- Lysozyme (Sigma Chemical Company, U.S.A.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Magnesium sulphate (May & Baker Ltd., Dagenham,England)
- p-Nitrophenol (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- p-Nitrophenyl-β -D-glucopyranoside (Sigma Chemical Company, U.S.A.)
- Ovalbumin (Sigma Chemical Company, U.S.A.)
- Phenol (May & Baker Ltd., Dagenham, England)
- Orthophosphoric acid (May & Baker Ltd., Dagenham, England)
- Photo flow
- Potassium chloride (BDH Chemicals Ltd., Poole,England)
- Potassium dihydrogen phosphate (E.Merck, Germany)
- Riboflavin (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)
- Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)
- Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)
- DEAE - Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemicals,Sweden)
- Sepharose 6 B (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)
- Sodium chloride (May & Baker Ltd., Dagenham, England)
- Sodium hydroxide (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- Sodium metabisulphite (May & Baker Ltd., Dagenham, England)
- Sodium acetate (E. Merck , Germany)
- Sodium nitrate (May & Baker Ltd., Dagenham, England)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Sodium potassium tartrate (E. Merck , Germany)
- Sodium sulphate (Fluka A.G., Buch S.G., Switzerland)
- Sucrose (E. Merck , Germany)
- Sulphuric acid (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- N , N ,N' , N' - tetramethylethylenediamine (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- Tris (hydroxymethyl) methylamine (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)
- Tween-80 (Fluka AG, Buch S.G., Switzerland)
- Urea (May & Baker Ltd., Dagenham, England)
- กระดาษกรอง Whatman No. 1
- ฟางข้าวเจ้า, รำข้าวเจ้าชนิดหยาบ, เปลือกเมล็ดถั่วเหลือง, ขี้เลื่อย, ไมยราบยักษ์ ส่วนก้านและใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การ assay activity ของเอ็นไซม์และการหาปริมาณโปรตีน

2.3.1.1 วิธีการ assay activity เอ็นไซม์เซลลูเลส

สับสเตรทที่ใช้คือ Carboxymethyl cellulose (CMC) , กระดาษกรอง วัดปริมาณ reducing sugar ที่เกิดขึ้นในรูปของกลูโคสโดยวิธี DNS-method[33]

2.3.1.1.1 การทำ standard curve สำหรับหาปริมาณ reducing sugar ในรูปกลูโคส โดย DNS-method

- สารละลายที่ใช้ : สารละลายกลูโคสใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มก./มล.

: สารละลาย DNS-regent ซึ่งมีวิธีเตรียมดังนี้คือ ละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid 10.6 กรัม และ NaOH 19.8 กรัมในน้ำ 1416 มล. จากนั้นเติม Na.K. tartrate (Rochelle Salts) 306.0 กรัม, phenol 7.6 มล. และ Na metabisulfite 8.3 กรัม ลงไป คนให้ละลายจนหมด ทดสอบความเข้มข้นของสารละลายที่เตรียมได้โดยไตเตรต สารละลายนี้ 3 มล. กับ 0.1 N HCl ใช้ phenolphthalein เป็น indicator ผลที่ถูกต้องควรใช้ปริมาตรของ HCl 5-6 มล.

- วิธีการทดลอง : เตรียมความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐานเป็น 0.1-0.5 มก./มล.

: เติมสารละลายกลูโคส 1 มล. ลงในหลอดทดลองแล้วเติม DNS-reagent 3 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำไปอุ่นในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

: นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์

- พลอตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรและปริมาณของกลูโคส (มก.) ผลแสดงดังในรูปที่ 3.26

2.3.1.1.2 Carboxymethyl cellulose assay ตามวิธีของ Mandels[49] วิธีการคือ ดูดสารละลายเอ็นไซม์ 0.5 มล. ใส่ในหลอดทดลอง ซึ่งมี 1% CMC (0.5 มล.) อยู่ เขย่าให้เข้ากัน นำไป incubate ที่ 50° ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม DNS reagent 3 มล. เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปอุ่นในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เทียบกับหลอด control (สารละลายเอ็นไซม์ 0.5 มล. + DNS reagent 3 มล. + 1% CMC 0.5 มล. อุ่นในน้ำเดือด 10 นาที) จากนั้นหาปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นได้จาก standard curve ของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ซึ่งพลอตระหว่างค่า OD_{550} และ จำนวน มิลลิกรัมของกลูโคสมาตรฐาน

1 unit เอ็นไซม์คิดในเทอมของ 1 μ mole ของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2.3.1.1.3 Filter paper assay[49] วิธีการคือ ตัดกระดาษกรอง Whatman No. 1 เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1 x 6 ซม. (หนัก 50 มก.) ใส่ในหลอดทดลองที่ประกอบด้วยสารละลายเอ็นไซม์ 0.5 มล. + 0.05 M citrate buffer pH 4.8 1.0 มล. กดให้กระดาษกรองจุ่มอยู่ในสารละลาย นำไป incubate ที่ 50° ซ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วทำการวัด reducing sugar ที่เกิดขึ้นเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1.1.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.1.2 วิธีการ assay activity เอ็นไซม์ β-glucosidase[14]

สับสเตรทที่ใช้คือ p-nitrophenyl-β-D-glucoside ซึ่งจากการกระทำของเอ็นไซม์นี้จะทำให้เกิด p-nitrophenol ขึ้น ดังนั้นการวัด activity ของ β-glucosidase ทำได้โดยการหาปริมาณ p-nitrophenol ที่ถูกปล่อยออกมาโดยวิธีทาง colorimetry คือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร

2.3.1.2.1 การทำ standard curve สำหรับหาปริมาณ p-nitrophenol ที่เกิดขึ้น

- สารละลายที่ใช้ : สารละลาย p-nitrophenol มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.5 มก./มล.
- วิธีการทดลอง : เตรียมความเข้มข้นของ p-nitrophenol มาตรฐานเป็น 0.005-0.25 มก./มล. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร เทียบกับน้ำ แต่ละความเข้มข้น ทำซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย
- พลอตกราฟระหว่าง OD_{400} และความเข้มข้นของ p-nitrophenol(มก./มล.) ผลแสดงดังรูปที่ 3.27

2.3.1.2.2 การ assay activity เอ็นไซม์ β-glucosidase วิธีการทดลองคือ ดูดสารละลาย 1 mM p-nitrophenyl-β-D-glucoside ใน 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.0 จำนวน 2 มล. ใส่ในหลอดทดลอง ซึ่งมีสารละลายเอ็นไซม์อยู่ 0.1 มล. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 40° ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น ดูดสารละลายผสมนี้มา 0.5 มล. เติม 0.1 M Na_2CO_3 ลงไป 10 มล. ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณ p-nitrophenol ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับ standard curve ของ p-nitrophenol มาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.1.3 การหาปริมาณโปรตีน

สารละลายเอ็นไซม์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Modified Lowry ซึ่งใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน ส่วนสารละลายที่ได้จาก column chromatography หาปริมาณโปรตีนได้โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Modified Lowry[50]

ก. สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย A : ประกอบด้วย 20% Na_2CO_3 และ 0.2% Na, K tartrate ใน 1 M NaOH

สารละลาย B : 1% $CuSO_4$ ในน้ำกลั่น

สารละลาย C : ประกอบด้วย สารละลาย A 5 มล. , สารละลาย B 0.5 มล. และน้ำกลั่น 20 มล.

สารละลาย D : ประกอบด้วย Folin-Ciocalteau reagent 1 มล. และน้ำกลั่น 10 มล.

สารละลาย A-D นี้ ทำการเตรียมทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนใช้

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน : Bovine serum albumin (BSA)
ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 ไมโครกรัม/มล.
เตรียมให้มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัม/มล.

ข. วิธีการทดลอง

1. นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ และสารละลายเอ็นไซม์มาอย่างละ 1 มล. เติมสารละลาย C ลงไปในหลอด ๆ ละ 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
2. เติมสารละลาย D ลงไปหลอดละ 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

4. พลอตกราฟระหว่าง OD_{700} และปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (ไมโครกรัม) ได้ผลดังรูปที่ 3.27

2.3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Trichoderma viride สายพันธุ์ TISTR 3161

เชื้อรา Trichoderma viride สายพันธุ์ TISTR 3161 ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในรูป freeze dried สีดำ นำมาละลายด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient broth) จากนั้นนำไปเลี้ยงบน PDA (potato dextrose agar) medium ที่อุณหภูมิ 27-30° ซ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำไปเก็บในตู้เย็นเป็น stock culture

ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส ดังนี้

2.3.2.1 ชนิดของอาหารและเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา

2.3.2.1.1 ทำการเปลี่ยนสภาพของอาหารให้เหมาะสมที่จะนำมาใช้เลี้ยงเชื้อรา

รำข้าวเจ้าชนิดหยาบ : นำมาร่อนด้วยตะแกรงร่อนขนาด 12 mesh เพื่อเอาส่วนที่เป็นเปลือกและเมล็ดข้าวออก

ฟางข้าวเจ้า : ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ความยาว 1-2 มม. อบให้แห้ง

กระดาษกรอง : นำไปแช่น้ำ ฉีกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วอบให้แห้ง

ไมยราบยักษ์ : ตัดเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 40° ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำมาบดเป็นผงละเอียด ส่วนก้านและใบแยกกัน

2.3.2.1.2 ชั่งอาหารชนิดต่าง ๆ 10 กรัม ใส่ลงใน conical flask 150 มล. เติมน้ำกลั่น 10 มล.ลงไป คลุกเคล้าให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, อุณหภูมิ 120° ซ เป็นเวลา 15 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่แปดเปื้อน แล้วถ่ายเชื้อราลงไปในปริมาณเท่า ๆ กันทุก flask จากนั้นนำไปเพาะ (incubate) ที่ 27° ซ ในตู้เลี้ยงเชื้อ เป็นเวลาต่าง ๆ กัน คือ 1-8 วัน ในแต่ละวันทำ 3 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อครบกำหนดเวลาต่าง ๆ นั้น นำมาสกัดเอ็นไซม์ด้วยสารละลาย citrate buffer pH 4.8 โดยการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมากรองด้วยใยแก้ว เอาส่วนสารละลายที่ได้มาวัด activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส ได้ผลดังรูปที่ 3.1

เมื่อได้ชนิดของอาหารและเวลาที่ใช้เลี้ยง ที่เหมาะสมแล้ว นำมาหาปริมาณความชื้นที่เหมาะสมที่สุดในอาหารชนิดนั้นและเวลาที่กำหนด

2.3.2.2 ปริมาณน้ำ (ความชื้น) โดยการชั่งอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.2.1.2 จำนวน 10 กรัม ใส่ใน conical flask (150 มล.) เติมน้ำลงไปในปริมาณแตกต่างกันคือ 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 มล. (ในแต่ละกรณีทำ 3 ซ้ำ) ผสมให้เข้ากัน นำไป autoclave ถ่ายเชื้อราลงไปในปริมาณเท่า ๆ กันทุกขวด แล้วนำไปเพาะที่ 27° ซ ในเวลาที่เหมาะสม จากข้อ 2.3.2.1.2

เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการสกัดเอ็นไซม์เช่นเดียวกับข้อ 2.3.2.1.2 ได้ผลดังรูปที่ 3.2

2.3.2.3 สารที่ใช้สกัดเอ็นไซม์เซลลูเลส โดยการชั่งอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.2.1.2 10 กรัม ใส่ใน conical flask (150 มล.) เติมน้ำลงไปในปริมาณ 10 มล. นำไป autoclave ทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายเชื้อราลงไปในปริมาณเท่า ๆ กันทุกขวด ผสมให้เข้ากัน นำไปเพาะที่ 27° ซ ในเวลาที่เหมาะสม จากข้อ 2.3.2.1.2 เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดเอ็นไซม์ด้วย

- สารละลาย 0.05 M citrate buffer pH 4.8
- สารละลาย 0.5 M NaCl ใน 0.05 M citrate buffer pH4.8
- สารละลาย 1% Tween 80 ใน 0.05 M citrate buffer pH4.8

แช่ culture media ด้วยสารละลายเหล่านี้ประมาณ 30 มล. เป็นเวลา 1 ชม. แต่ละกรณีทำซ้ำ 3 ครั้ง นำส่วนสารละลายไปวัด activity เอ็นไซม์เซลลูเลสได้ผลดังตารางที่ 3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2.4 เวลาที่ใช้ในการสกัด

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3.2.3 นำมาสกัดด้วยสารละลาย 0.5 M NaCl ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 โดยการแช่ culture media เป็นเวลาต่าง ๆ กัน คือ 30 นาที, 60 นาที, 120 นาที, 180 นาที ทำ 3 ซ้ำ นำส่วนสารละลายไปวัด activity เอ็นไซม์เซลลูเลส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.4

2.3.3 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสปริมาณมาก

2.3.3.1 Solid seed culture

ชั่ง รำข้าวและฟางข้าว (ในอัตราส่วน 9 : 1) 100 กรัมใส่ใน conical flask 150 มล. จำนวน 10 ใบ เติมน้ำลงไป 10 มล. ทุกขวด ผสมให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็น ถ่ายเชื้อรา ซึ่งอยู่ในรูป spore suspension จาก PDA slant(10 มล. PDA slant + น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 10 มล.) ในปริมาณ 1 มล. ต่อ 1 ขวด จากนั้นนำไป incubate ที่ 27° ซ เป็นเวลา 6-7 วัน

2.3.3.2 Solid enzyme culture

ชั่งรำข้าวและฟางข้าว (อัตราส่วน 9 : 1) 1.5 กก. เติมน้ำลงไป 1500 มล. ผสมกับ $CaCO_3$ 600 กรัม คลุกเคล้าให้เข้ากันเป็นอย่างดี แล้วแบ่งใส่ถาดสี่เหลี่ยม ขนาด 10 x 10 นิ้ว จำนวน 10 ใบ เกลี่ยให้อาหารกระจายเป็นแผ่นบาง ๆ ทั่วทั้งถาด จากนั้นปิดหน้าด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ นำไป autoclave ทิ้งให้เย็นแล้วถ่ายเชื้อราซึ่งเตรียมในรูป solid seed culture จากข้อ 2.3.3.1 ลงในถาด (ทำการถ่ายเชื้อในตู้ถ่ายเชื้อ) โดยที่ใช้ solid seed culture 1 ขวดต่ออาหาร 1 ถาด จากนั้นนำไป incubate ที่ 27° ซ เป็นเวลา 2 วัน

เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ทำการสกัดเอ็นไซม์จาก solid culture ด้วยสารละลาย 0.5 M NaCl ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 โดยแช่ไว้ เป็นเวลา 3 ชม. จากนั้นกรองด้วยผ้าไนลอน เก็บส่วนสารละลายไว้ ทำการสกัด 2 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาตรของสารละลายเอ็นไซม์ที่ได้ทั้งหมด ประมาณ 6 ลิตร

ทำการเตรียมเอ็นไซม์ 2 ครั้ง ปริมาณอาหารตั้งต้นที่ใช้เท่ากัน

2.3.4 การทำให้เอ็นไซม์เซลลูเลส I บริสุทธิ์

2.3.4.1 การตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว

2.3.4.1.1 ทำการทดลองหาความเข้มข้นของสารละลายอิ่มตัว $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมในการตกตะกอนเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลสได้หมด โดยการเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Trichoderma viride ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด (ปริมาณอาหารตั้งต้น 10 กรัม, 24 ขวด) นำสารละลายเอ็นไซม์ที่สกัดได้ (30 มล. ต่อ culture media 1 ขวด) มาตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณแตกต่างกันไปในแต่ละขวด เพื่อให้มีความเข้มข้นอิ่มตัวในสารละลายต่าง ๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ใช้ เพื่อให้มีความเข้มข้นอิ่มตัวแตกต่างกันที่ 20 °ซ[53]

	ความเข้มข้นอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$, %								
	20	30	40	50	60	65	70	75	80
ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ กรัม/30 มล.	4.56	6.84	9.12	11.4	13.68	14.82	15.96	17.10	18.24

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.4.1.2 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2.3.3.2 มาตกตะกอนเอ็นไซม์ครั้งแรกด้วย 0-30 % $(NH_4)_2 SO_4$ อิ่มตัว เกิดตะกอนเบสีน้ำตาลเอาตะกอนโปรตีนส่วนนี้ออกโดยการกรองบน celite โดยใช้ buchner funnel นำส่วนที่เป็นสารละลายมาตกตะกอนอีกครั้งด้วย 30-80 % $(NH_4)_2 SO_4$ อิ่มตัว ทิ้งไว้ค้างคืนในตู้เย็น จากนั้นนำมากรองบน celite เก็บตะกอนซึ่งมีสีน้ำตาลเข้มมาละลายใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ส่วนที่ไม่ละลายกำจัดออกได้โดยการ centrifuge ที่ 4° ซ , เก็บเฉพาะส่วนสารละลายใส จำนวน 800 มล.

2.3.4.1.3 นำสารละลายเอ็นไซม์จากข้อ 2.3.4.1.2 มา desalt โดยผ่านลงไปใน Sephadex G-25 column (2.5 x 60 cm.) ใช้ 0.05 M citrate buffer pH 4.8 เป็นตัวชะ เก็บสารละลายส่วนที่มีเอ็นไซม์เซลลูโลส activity สูงเข้าด้วยกัน แบ่งสารละลายเอ็นไซม์บางส่วนมา assay activity และวัด A_{280}

2.3.4.2 <u>การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์โดยผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column</u>[51]

2.3.4.2.1 การเตรียม DEAE-Sephadex column (4.5 x 45 cm.)

ชั่ง DEAE-Sephadex A-50 40 กรัม นำมาแช่ในน้ำกลั่นให้เกิดการพองตัวเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วรินผงแขวนลอยที่อยู่ตอนบนทิ้ง จากนั้นนำไปผ่านขบวนการล้าง โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ

ก. แช่ใน 4 M NaCl แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้งบน Buchner funnel

ข. นำ DEAE-Sephadex A-50 มากวนใน 0.05 N HCl ด้วย magnetic stirrer แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำมากรองและล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง บน buchner funnel จนสารละลายที่กรองออกมามี pH ~ 5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. นำ DEAE-Sephadex A-50 มากวนใน 0.1 M NaOH ด้วย magnetic stirrer ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำมากรองและล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้งบน buchner funnel จนกระทั่งสารละลายที่กรองออกมามี pH ~ 8

ง. นำ DEAE-Sephadex มาล้างด้วย 0.5 M citrate buffer pH 4.8 จนกระทั่งสารละลายที่กรองออกมามี pH เป็น 4.8

จ. นำ DEAE-Sephadex มาแช่ใน 0.05 M citrate buffer pH 800 มล. 2 ครั้ง หรือมากกว่า จนกระทั่งแน่ใจว่า มี pH = 4.8 และความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ เป็น 0.05 M

ฉ. นำ slurry ของ DEAE-Sephadex มาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 4.5 x 4 5 cm. ปล่อยให้ 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ไหลผ่านตลอดเวลาด้วยอัตราเร็ว = 130 มล./ชม. ทิ้งไว้ค้างคืนเพื่อให้เจลจัดเรียงตัวกันอย่างสม่ำเสมอตลอดคอลัมน์ และมีระดับคงที่ bed volume ที่ได้ = 700 มล.

2.3.4.2.2 การนำสารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลสมาผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column (4.5 x 45 cm.)

หยดสารละลายเอ็นไซม์จากข้อ 2.3.4.1.3 (800 มล.) ลงบนผิวของ DEAE-Sephadex A-50 จนหมด จากนั้นปล่อยให้บัฟเฟอร์ไหลผ่านลงไปด้วยอัตราเร็ว 130 มล./ชม. เพื่อพาเอาโปรตีนหรือเอ็นไซม์ที่ไม่จับกับ DEAE-Sephadex ออกมา เก็บสารละลายโปรตีนที่ออกมาด้วย fraction collector หลอดละ 7 มล.

หลังจากผ่านบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์ประมาณ 1 bed volume (700 มล.) แล้ว ก็จะเอาโปรตีนหรือเอ็นไซม์ที่จับกับ DEAE-Sephadex ออกมาโดยใช้ linear gradient ของ 0-0.7 M NaCl ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 เก็บสารละลายที่ได้หลอดละ 7 มล. อัตราเร็วของการไหล = 130 มล./ชม.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นำสารละลายโปรตีนที่เก็บไปวัดปริมาณโปรตีนโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวัด activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสต่อสับสเตรท CMC และกระดาษกรอง ตามวิธีข้อ 2.3.1.1 สำหรับสารละลายชุดหลังนำไปวัดความจุไฟฟ้า (conductance) ด้วย conductivity meter เทียบกับ standard curve ของสารละลาย NaCl มาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของ NaCl ในแต่ละหลอด ได้ผลแสดงดังรูปที่ 3.6

เก็บสารละลายส่วนที่มี activity ของเซลลูเลสเข้าด้วยกัน (หลอดที่ 70-110) นำสารละลายเอ็นไซม์ หลอดที่ 70-110 (450 มล., สีเหลืองอ่อน) ไป freeze dried ก่อนนำไปผ่าน Sephadex G-100 ต่อไป เพื่อทำให้เอ็นไซม์นี้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

2.3.4.3 <u>การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex G-100 column</u> (3.0 × 65 ซม.)[52]

2.3.4.3.1 การเตรียม Sephadex G-100 column (3.0 x 65 ซม.)

ชั่ง Sephadex G-100 30 กรัม แช่ในสารละลาย 0.05 M citrate buffer pH 5.0 จำนวน 600 มล. เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในตู้เย็น รินส่วนแขวนลอยที่อยู่ตอนบนทิ้ง นำเจลซึ่งอยู่ในรูป slurry ไปบรรจุคอลัมน์ ขนาด 3.0 x 65 ซม. ทำการ equilibrate เป็นเวลา 1 คืน โดยปล่อยให้บัฟเฟอร์ไหลผ่านตลอดเวลา อัตราความเร็ว = 75 มล./ซม. ได้ bed volume=430 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.4.3.2 การนำเอ็นไซม์มาผ่าน Sephadex G-100 column

นำเอ็นไซม์ที่ได้จากข้อ 2.3.4.2.2 มาละลายใน 0.05M citrate buffer pH 5.0 จำนวน 16 มล. แล้วนำไปหยดลงบนผิวหน้าของ Sephadex G-100 ซึ่งเตรียมไว้ในข้อ 2.3.4.3.1 ใช้ 0.05M citrate buffer pH 5.0 เป็นตัวชะพาเอ็นไซม์ผ่านออกจากคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 75 มล./ชม. เก็บสารละลายที่ออกมาหลอดละ 5 มล.

นำสารละลายที่เก็บได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และหา activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส ได้ผลดังรูป 3.7

เก็บสารละลายส่วนที่มี activity เอ็นไซม์เซลลูเลสเข้าด้วยกัน (หลอดที่ 50-74)

สารละลายเอ็นไซม์ส่วนที่เหลืออีก 20 มล. นำมาผ่าน Sephadex G-100 column ด้วยวิธีเช่นเดียวกันกับที่กล่าวมาข้างบน

นำสารละลายส่วนที่มี activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสของแต่ละครั้งมารวมกัน ปริมาตรรวม = 213 มล. นำไปผ่าน DEAE-Sephadex-50 column อีกครั้ง เพื่อทำให้เอ็นไซม์ที่ได้นี้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

2.3.4.4 <u>การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์โดยผ่าน DEAE-Sephadex-50 อีกครั้ง</u>

นำสารละลายเอ็นไซม์จากข้อ 2.3.4.3.2 (213 มล.) มาหยดลงบน DEAE-Sephadex column (4.5 x 31ซม.) ทำการชะพาเอ็นไซม์โดยใช้ linear gradient ของ 0-0.5 M NaCl ใน 0.05 M citrate buffer pH 5.8 เก็บสารละลายหลอดละ 7 มล. อัตราเร็วของการไหล = 35 มล./ชม.

นำสารละลายที่เก็บได้นี้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร, วัดความจุไฟฟ้าและวัด activity ของเอ็นไซม์ต่อสับสเตรท CMC และกระดาษกรอง ได้ผลดังรูปที่ 3.8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เก็บสารละลายส่วนที่มี activity ของเซลลูเลส (หลอดที่ 60-80) รวมกัน ปริมาตร = 100 มล. นำไป dialyse เพื่อเอาเกลือ NaCl ออก จากนั้นนำไป freeze dried สำหรับนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

2.3.4.5 <u>การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex G-200 column</u>

2.3.4.5.1 การเตรียม Sephadex G-200 column (1.6 x 45 cm.)

ชั่ง Sephadex 200 12 กรัม แช่ใน 0.05 M citrate buffer pH 5.0 จำนวน 200 มล. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในตู้เย็น รินสิ่งแขวนลอยทิ้ง นำ slurry ของ Sephadex G-200 มาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1.6 x 45ซม. bed volumn = 110 ซม. ปล่อยให้บัฟเฟอร์ไหลผ่านตลอดเวลา ทิ้งไว้ 1 คืน อัตราเร็วของการไหล = 5.2 มล./ชม.

2.3.4.5.2 การนำเอ็นไซม์เซลลูเลสมาผ่าน Sephadex G-200 column

ละลายเอ็นไซม์เซลลูเลสจากข้อ 2.3.4.4 ใน 0.05 M citrate buffer pH 5.0 ปริมาตร 2 มล. นำไปหยดลงบนผิวของเจลจากข้อ 2.3.4.5.1 ทำการชะพาเอ็นไซม์เซลลูเลสด้วย 0.05 M citrate buffer pH 5.0 อัตราเร็วของการไหล 5.2 มล./ชม. เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล.

นำสารละลายแต่ละหลอดที่เก็บไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร วัด activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส และ β -glucosidase ได้ผลแสดงดังรูปที่ 3.9

รวมสารละลายส่วนที่มี activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสสูงเข้าด้วยกัน (หลอดที่ 9-20) นำไป freeze dried

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.5 การเตรียมและการทำให้เอ็นไซม์เซลลูเลส II บริสุทธิ์

2.3.5.1 การตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว

2.3.5.1.1 นำสารละลายที่สกัดได้จากข้อ 2.3.3.2 มาตกตะกอนโปรตีนครั้งแรกด้วย 0-30 % อิ่มตัว $(NH_4)_2SO_4$ เกิดตะกอนเบา เอาตะกอนส่วนนี้ออกโดยการ centrifuge ที่ 4° ซ ความเร็ว 12,000 rpm นำส่วนสารละลายมาตกตะกอนอีกครั้งด้วย 30-80 % อิ่มตัว $(NH_4)_2SO_4$ ทิ้งไว้ค้างคืน แล้วนำมา centrifuge โดยใช้ความเร็ว 12,000 rpm ที่ 4° ซ เก็บตะกอนที่ได้มาละลายใน 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 ส่วนที่ไม่ละลาย เอาออกโดยการ centrifuge เก็บเฉพาะสารละลายใส นำมาทำการ desalt

2.3.5.1.2 นำสารละลายเอ็นไซม์จาก 2.3.5.1.1 มา desalt โดยผ่านลงใน Sephadex G-25 column (3.0 x 60 ซม.) บัฟเฟอร์ตัวพาคือ 25 mM Tris-HCL buffer pH 7.5 เก็บสารละลายส่วนที่มี activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสสูง ๆ เข้าด้วยกัน (200 มล.) แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.3.5.2 การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์โดยผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column (4.5 x 35 ซม.)

นำสารละลายเอ็นไซม์จากข้อ 2.3.5.1.2 มาผ่านลงใน Sephadex A-50 column (4.5 x 35 ซม.) แล้วผ่าน 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 ลงไปในคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 45 มล./ชม. เก็บสารละลายโปรตีนที่ออกมาหลอดละ 7 มล. หลังจากผ่านบัฟเฟอร์ลงไปในคอลัมน์ได้ประมาณ 1 bed volume (500 มล.) แล้วก็ผ่าน linear gradient ของ 0-0.8 M NaCl ใน 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 ลงไป อัตราเร็วของสารละลายโปรตีนหรือเอ็นไซม์ที่ออกจากคอลัมน์ = 45 มล./ชม. เก็บสารละลายโปรตีนหลอดละ 7 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำสารละลายโปรตีนที่เก็บได้ทั้งหมดไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวัด activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสต่อ CMC และกระดาษกรอง และ activity ของเอ็นไซม์ β -glucosidase สำหรับสารละลายชุดหลังนำไปวัดความจุไฟฟ้า เพื่อหาความเข้มข้นของ NaCl ในแต่ละหลอด ได้ผลแสดงดังรูปที่ 3.10

เก็บสารละลายส่วนที่มี activity ของเซลลูเลสต่อ CMC รวมกัน หลอดที่ 240-260 นำมา freeze dried แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.3.5.3 <u>การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex G-100 column</u> (3.0 x 60 cm.)

นำเอ็นไซม์ที่ได้จาก DEAE-Sephadex A-50 column (หลอดที่ 240-260) ซึ่งละลายใน 0.05 M citrate buffer pH 5.0 จำนวน 20 มล. มาผ่านลงใน Sephadex G-100 column (3.0 x 60 ซม., bed volume= 420 มล.) และชะเอ็นไซม์ด้วย 0.05 M citrate buffer pH 5.0 เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 4.5 มล. อัตราเร็วของการไหล 25 มล./ชม.

นำสารละลายที่เก็บได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และหา activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส และ β -glucosidase ได้ผลดังรูปที่ 3.11

เก็บสารละลายส่วนที่มี activity ของเซลลูเลสต่อ CMC เป็นส่วน ๆ นำไป freeze dried เลือกส่วนที่มี activity ของเซลลูเลสต่อ CMC สูงที่สุด (หลอดที่ 85-95) นำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

2.3.5.4 <u>การเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex G-200 column</u> (1.6 x 45 cm.)

ละลายเอ็นไซม์เซลลูเลสจากข้อ 2.3.5.3 ด้วย 0.05 M citrate buffer pH 5.0 จำนวน 3 มล. ถ้ามีตะกอนนำไป centrifuge เอาเฉพาะส่วนสารละลายใส (สีเหลืองอ่อน) มาผ่านลงใน Sephadex G-200 column (1.6 x 45 ซม.) ทำการชะหาเอ็นไซม์ด้วย 0.05 M citrate buffer pH 5.0 อัตราเร็ว

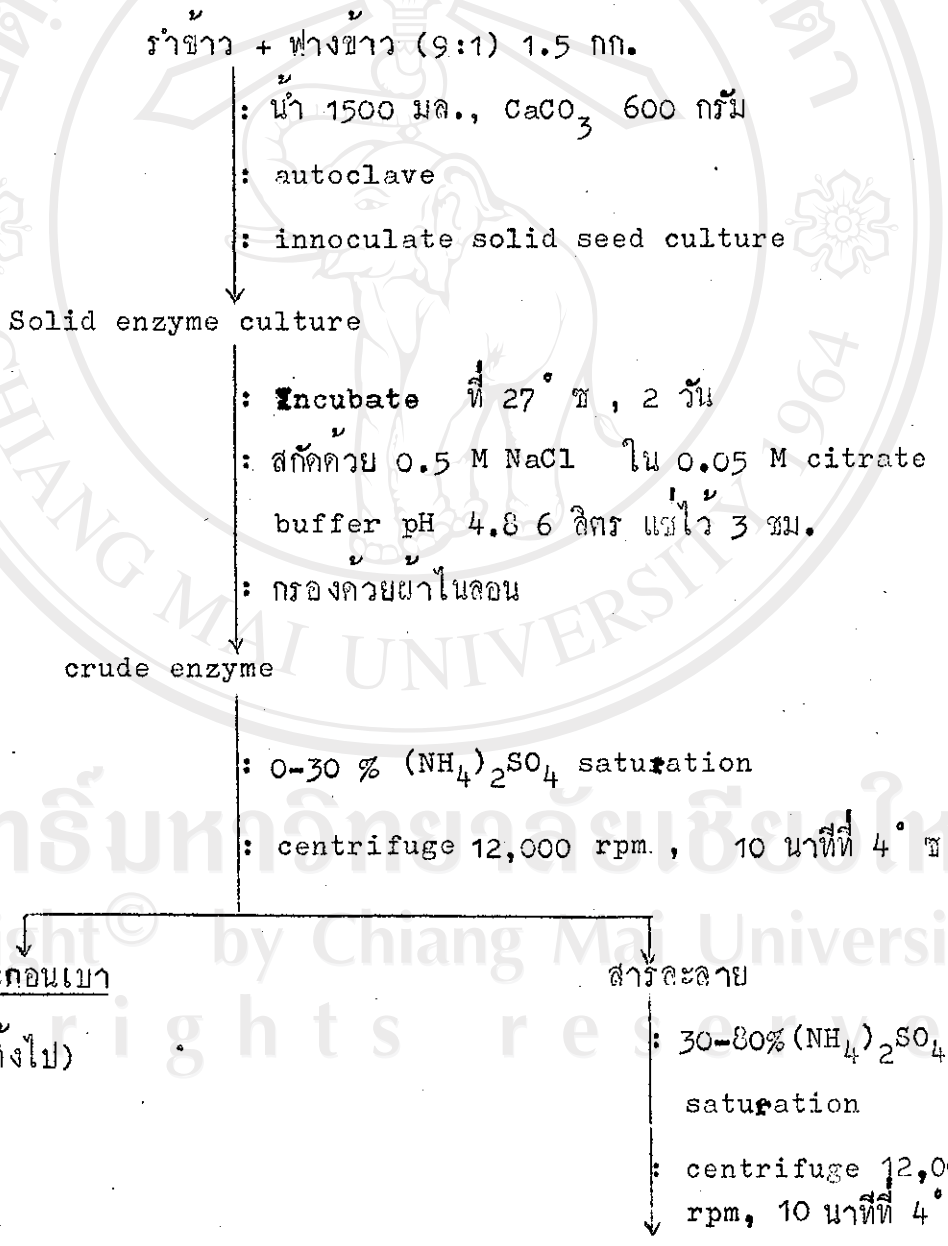
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของสารละลายที่ออกมา = 5.1 มล./ชม. เก็บเป็นหลอด ๆ ละ 3 มล.

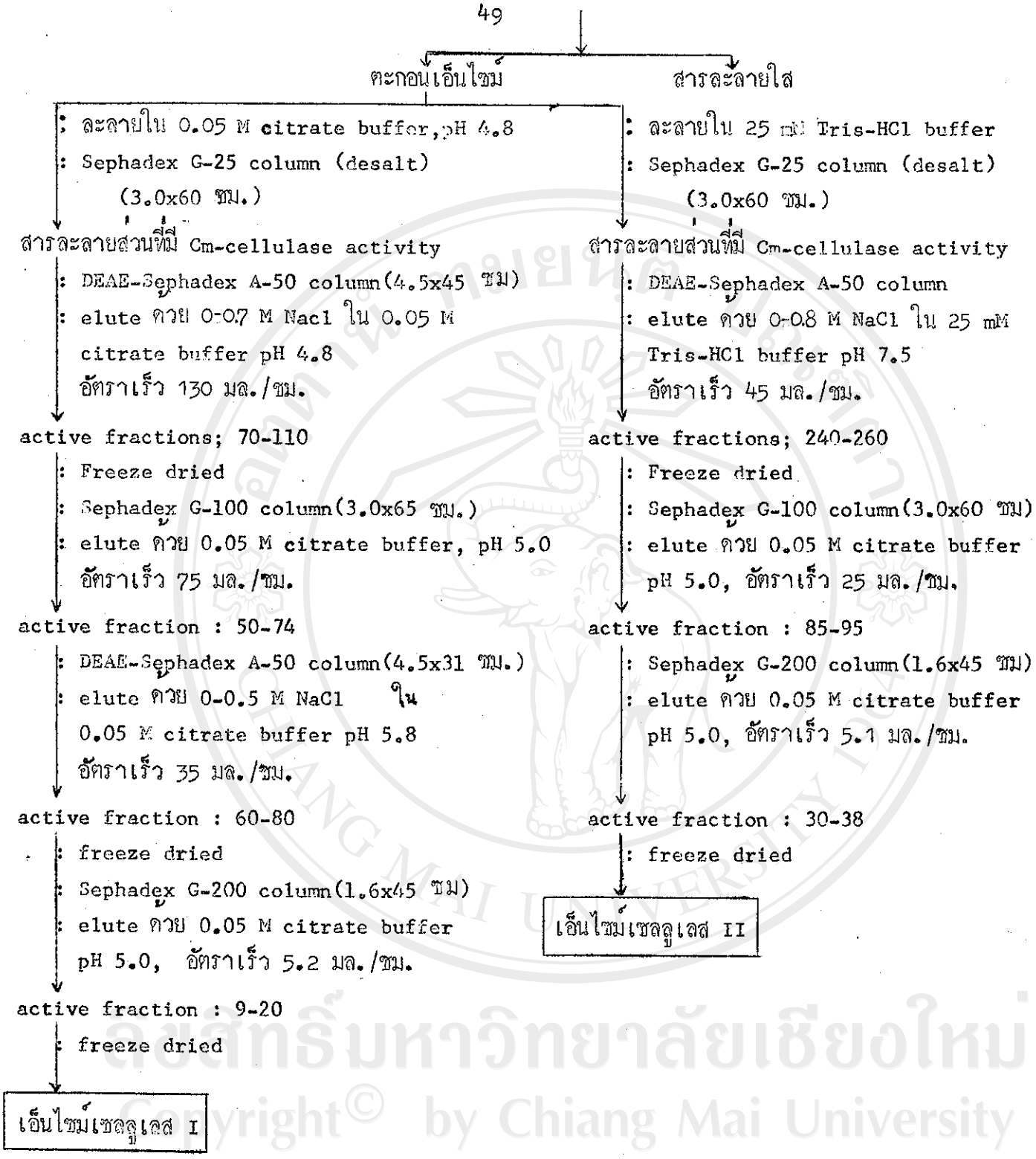
นำสารละลายเอ็นไซม์ที่เก็บไปวัดปริมาณโปรตีน และวัด activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส, β-glucosidase ได้ผลดังรูปที่ 3.12

รวมสารละลายที่มี activity เอ็นไซม์เซลลูเลสต่อ CMC เข้าด้วยกัน หลอดที่ 30-38 นำไป freeze dried เก็บไว้ในตู้เย็น

2.3.6 <u>สรุปการเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II</u> แสดงดังแผนภาพที่ 2.1



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



แผนภาพที่ 2.1 แสดงขั้นตอนทั้งหมดในการเตรียมเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.3.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์เซลลูเลสทั้ง 2 form

2.3.7.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์เซลลูเลส (I , II) โดย polyacrylamide-disc-gel electrophoresis[53,54]

2.3.7.1.1 สารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ใน polyacrylamide disc gel electrophoresis ใน alkaline medium มีดังนี้

- Buffer A : 1 M HCl 480 มล., Tris 36.6 กรัม, TEMED 0.46 มล. ผสมกัน เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล. ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.9
- Buffer B : 1 M H_3PO_4 25.6 มล., Tris 5.7 กรัม, TEMED 0.46 มล. ผสมกัน เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล. ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.7
- Reagent C : Acrylamide 30 กรัม, Bis 0.8 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล.
- Reagent D : Acrylamide 10 กรัม, Bis 2.5 กรัม เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มล.
- สารละลาย ammonium persulphate : ammonium persulphate 40 กรัม ละลายในน้ำ 100 มล. (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้)
- สารละลาย riboflavin : Riboflavin 4 กรัม ละลายในน้ำ 100 มล.
- Tris-glycine buffer : Tris 12 กรัม, glycine 57.6 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 2 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.6

สารละลายเหล่านี้ทั้งหมดเก็บไว้ในตู้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- สารละลายซูโครสความเข้มข้น 40 % : ซูโครส 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มล.
- 0.2 % Bromophenol blue ใช้เป็น tracking dye
- สารละลายสีย้อม ; 2.5 % coomassie brilliant blue : 2.5 มก. Coomassie blue ในเอธานอล 95 % 31.5 มล., glacial acetic acid 7 มล. เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มล.
- Destaining solution : 95% เอธานอล 31.5 มล., glacial acetic acid 7 มล. เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มล.

2.3.7.1.2 วิธีการเตรียมเจล

เตรียมหลอดแก้วขนาด 0.6 x 9 ซม. จำนวน 6 อัน ปลายด้านหนึ่งปิดด้วยจุกยางตัน วางบนพื้นราบให้หลอดแก้วอยู่ในแนวดิ่ง บรรจุเจลลงในแต่ละหลอดดังนี้

- Running gel : Buffer A 1 ส่วน, Reagent C 2 ส่วน น้ำกลั่น 1 ส่วน สารละลาย ammonium persulphate 4 ส่วน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นใช้ pasteur pipette ดูดสารละลายนี้ใส่ในหลอดแก้วที่เตรียมไว้ให้สูงประมาณ 7 ซม. แล้วค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นลงบนผิวเจลเล็กน้อย ทิ้งไว้ 30 นาที จะได้เจลที่มี acrylamide อยู่ 7.5 %
- Stacking gel : Buffer B 1 ส่วน, reagent D 2 ส่วน, riboflavin 1 ส่วน น้ำกลั่น 4 ส่วน ผสมให้เข้ากัน ดูดน้ำออกจากผิว running gel ล้างผิวหน้าของเจลด้วย stacking gel 2 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย stacking gel ลงบน running gel สูงประมาณ 1 ซม. ค่อย ๆ เติมสารละลาย riboflavin ลงไปบนผิวหน้าของ stacking gel ให้สูง ~ 2-3 มม. นำไปส่องแสง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

fluorescence เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เจลเกิด polymerization จะได้เจลที่มี acrylamide อยู่ 2.5% ก่อนใช้ดูดสารละลาย riboflavin บนผิวออก

2.3.7.1.3 วิธีการ run polyacrylamide-disc-gel electrophoresis

นำหลอดบรรจุเจลที่เตรียมได้ทั้งหมด ใส่ในเครื่องมือ Gel Electrophoresis Apparaters GE-4 (Pharmacia) ซึ่งประกอบด้วย chamber 2 ชั้น (บนและล่าง) บรรจุ electrode buffer (Tris-glycine buffer ความเข้มข้น 0.4 M, pH 8.6) จัดให้ปลายทั้งสองของหลอดเจลอยู่ใต้ระดับสารละลายบัฟเฟอร์ chamber ล่างเป็น anode, chamber บน เป็น cathode

นำสารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส I ที่ได้จากข้อ 2.3.4.5.2 (ความเข้มข้น 80 มก./มล.) 0.1 มล. ผสมกับสารละลายซูโครส 40% 0.05 มล. และ 0.2 % bromophenol blue 0.02 มล. แล้วนำสารละลายผสมนี้มาหยดลงบน stacking gel จากนั้นค่อย ๆ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (0.4 M Tris-glycine buffer pH 8.6) ลงบนสารละลายที่อยู่บน stacking gel ผ่านกระแสไฟฟ้าตรง จากขั้วลบไปบวกในปริมาณ 3.5 mA ต่อหลอด ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง โดยแถบของ bromophenol blue เคลื่อนที่ลงมาถึงปลายหลอด

นำเจลออกจากหลอด นำมาย้อมสีด้วย 2.5 % coomassie blue แช่เจลไว้ 2 ชั่วโมง แล้วนำไปล้างสีส่วนอื่นออกมาด้วย destaining solution แช่ไว้เป็นเวลา 1 คืน หรือมากกว่า จนกระทั่งเห็นแถบสีชัดเจน

สำหรับเอ็นไซม์เซลลูเลส II ก็ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างบน ผลการทดลอง แสดงดังรูปที่ 3.13 (a) และ (b)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.7.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II โดย SDS-polyacrylamide-disc-gel electrophoresis[55]

2.3.7.2.1 สารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้

- Upper buffer : Boric acid 24.736 กรัม, Tris 49.651 กรัม และ SDS 10.0 กรัม เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 8.64 ด้วย NaOH ก่อนใช้ต้องนำมาทำให้เจือจางในอัตราส่วน 1 : 10
- Stacking gel buffer : 0.541 M Tris-H_2SO_4 เตรียมได้โดยชั่ง Tris 6.552 กรัม เติมน้ำให้เป็น 100 มล. แล้วปรับ pH ให้เป็น 6.10 ด้วย H_2SO_4
- Separating gel buffer :2.122 M Tris-HCl เตรียมได้โดยชั่ง Tris 256.97 กรัม เติมน้ำให้เป็น 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 9.18 ด้วย HCl
- Under buffer : นำ Separating gel buffer มาทำให้เจือจางในอัตราส่วน 1 : 5
- 33 % Acrylamide (ซึ่งผ่านการ recrystallize แล้ว) ชั่ง acrylamide 33 กรัม เติมน้ำเป็น 100 มล.
- 1 % bis-acrylamide : ละลาย bis-acrylamide 1 กรัมในน้ำ 100 มล.
- สารละลาย potassium persulfate : ใช้ potassium persulfate เข้มข้น 1 มก./มล.เจล เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง
- TEMED

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- "ICI" -cocktail : stock solution สำหรับเตรียม sample ประกอบด้วย Upper buffer 20 มล.,ซูโครส 10 กรัม, EDTA 370 มก., β-mercaptoethanol 10 มล., น้ำ 40 มล. bromophenol blue 0.05 % และ SDS 3.8 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 8.64 แล้วจึงเติมน้ำจนครบ 100 มล.
- Fast staining solution (~ 2 ชั่วโมง) : coomassie blue 0.25 %, pure methanol 50% และ acetic acid 7%
- Destaining solution : 7% acetic acid
- สารละลายผสมของ 50% methanol และ 7% acetic acid

2.3.7.2.2 วิธีเตรียมเจล

เตรียมหลอดแก้วขนาด 0.6 x 10.5 ซม. ปลายด้านหนึ่งปิดด้วยจุกยางตัน วางบนพื้นราบให้หลอดแก้วอยู่ในแนวดิ่ง บรรจุเจลลงในแต่ละหลอดดังนี้

- Separating gels (40 มล.) : 33 % acrylamide 13.5 มล., 1% bis-acrylamide 4.5 มล., Separation buffer 8.9 มล. น้ำ 12.3 มล., TEMED 40 ไมโครลิตร และ potassium persulfate (50 กรัม/ลิตร) 0.8 มล. (เติมทีหลัง) วิธีเตรียมต้องผสมสารเหล่านี้ทั้งหมด ยกเว้น TEMED ลงใน flask แล้วดูดอากาศออกโดยใช้ suction pump เสร็จแล้วจึงเติม TEMED ลงไปผสมให้เข้ากัน แล้วรีบปิเปตใส่ในหลอดที่เตรียมไว้ เพื่อให้เกิดการ polymerized ความสูงของเจล ~ 8 ซม. ค่อยๆ เติมน้ำลงบนผิวหน้าของเจลทันที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Stacking gel (20 มล.) : ผสม 33% acrylamide 2.5 มล., 1% bis-acrylamide 5.0 มล., Stacking gel buffer 2.5 มล., น้ำ 9.6 มล. และ potassium persulfate (50 กรัม/ลิตร) 0.4 มล.ใน flask ดูดอากาศออก แล้วจึงเติม TEMED ลงไป จากนั้นรีบปิเปตใส่ในหลอดซึ่งดูดเอาน้ำบนผิวหน้าของ separating gel ออกแล้ว ความสูงของเจล ~ 1 ซม. คอย ๆ เติมน้ำลงบนผิวหน้าของเจลทันที ก่อนใช้ดูดน้ำออกจากผิวบนของเจล

2.3.7.2.3 การทำ SDS-polyacrylamide-disc-gel electrophoresis

นำหลอดบรรจุเจลที่เตรียมจากข้อ 2.3.7.2.2 ใส่ในเครื่องมือ Gel Electrophoresis Apparahes GE-4 (Pharmacia) เติม Under buffer ลงใน chamber ล่าง ส่วน chamber บนบรรจุ Upper buffer ให้ท่วมปลายหลอดเจล

ชั่งเอ็นไซม์เซลลูเลส I 40 มก. (มีปริมาณโปรตีน 16 ไมโครกรัม) นำมาละลายใน ICI-cocktail 0.25 มล. นำไป incubate ที่ 37° ซ เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาหยดลงบนผิวหน้าของ stacking gel ในปริมาณ 50 ไมโครลิตร จากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าตรงจากขั้วลบไปบวกในปริมาณ 1.5 mA ต่อหลอด ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมงโดยแถบของ bromophenol blue เคลื่อนที่ลงมาถึงปลายหลอด

นำเจลออกจากหลอด กำจัด SDS ออกโดยแช่เจลในสารละลาย 50% Methanol + 7% acetic acid เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำมาย้อมสีด้วย Fast staining solution เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างสีออกด้วย destaining solution (7% acetic acid) แช่ไว้ 1 คืนหรือมากกว่า จนกระทั่งเห็นแถบสีชัดเจน

สำหรับเอ็นไซม์เซลลูเลส II ก็ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างบน แต่ใช้ปริมาณ 20 มก. (มีปริมาณโปรตีน 1.72 มก.) ละลายใน ICI-cocktail 0.25 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลอง แสดงดังรูปที่ 3.13 (c) และ (d)

2.3.8 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอ็นไซม์เซลลูเลสที่เตรียมได้

2.3.8.1 การหามวลโมเลกุลของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

2.3.8.1.1 การหามวลโมเลกุลของเซลลูเลส I และ II โดยวิธี Gel filtration[52]

ก. Protein marker ที่ใช้คือ Catalase (20 มก./มล.) aldolase (20 มก./มล.), bovine serum albumin (BSA) (20 มก./มล.) และ ovalbumin (18 มก./มล.) สำหรับเอ็นไซม์เซลลูเลส I และII มีความเข้มข้น 85 มก./มล. และ 80 มก./มล. ตามลำดับ

ข. เตรียม Sepharose 6 B column (2.4 × 40 ซม.) โดยการนำ Sepharose 6 B ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายมาล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง เพื่อกำจัด sodium azide ซึ่งเป็น bacteriostatic agent ออก จากนั้นล้างด้วย 0.05 M citrate buffer pH 5.0 หลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งเจลมี pH = 5.0 นำ slurry ของ Sepharose 6 B มาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.4 x 40 ซม. ผ่าน 0.05 M citrate buffer pH 5.0 ลงไปตลอดเวลา ทิ้งไว้ 1 คืน

ค. หยด Blue dextran 2000 (น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2,000,000) ซึ่งมีความเข้มข้น 6 มก./มล. ลงไป ทำการชะด้วย 0.05 M citrate buffer pH 5.0 เก็บสารละลายออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล. อัตราเร็วของการไหล 24 มล./ชม.

ง. นำสารละลายที่เก็บได้จากข้อ ค. ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร หาจุดสูงสุดของ peak ที่ได้จากการพลอต A_{280} กับ Fraction number ปริมาตร ณ จุดนั้น ก็คือ void volume

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จ. หยดสารละลายโปรตีนผสมของ catalase และ ovalbumin 1 มล. ลงบนผิวหน้าของ Sepharose 6 B ผ่าน 0.05 M citrate buffer pH 5.0 ลงไปในคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ออกมาหลอดละ 3.2 มล., อัตราเร็วของการไหล 24 มล./ชม. นำสารละลายที่เก็บได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร, หา elution volume (V_e)

ฉ. เปลี่ยนสารละลายผสมที่ผ่านคอลัมน์เป็น aldolase และ BSA โดยที่ใช้สภาวะต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ จ.

ช. ผ่านสารละลายเอ็นไซม์ I และ II (อย่างละ 1 มล.) ลงใน Sepharose 6 B Column ทีละครั้ง ใช้สภาวะต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้างบน นำสารละลายเอ็นไซม์ที่เก็บได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร หา elution volume ของเซลลูเลสทั้งสอง ผลแสดงดังรูปที่ 3.14

ซ. หามวลโมเลกุลของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II จาก standard curve รูปที่ 3.15

2.3.8.1.2 การหามวลโมเลกุลของ subunits ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II [56]

ก. Protein markers ที่ใช้คือ BSA (1 มก./มล.), ovalbumin (1 มก./มล.), chymotrypsinogen (1 มก./มล.) และlysozyme (1 มก./มล.) สำหรับสารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II เข้มข้น 0.1 มก./มล. และ 0.2 มก./มล.

ข. ทำการเตรียมเจลตามวิธีในข้อ 2.3.7.2.2 แล้วนำมาใส่ในเครื่องมือ Gel electrophoresis Apparatus GE-4 จากนั้นหยดสารละลาย protein markers ผสมจำนวน0.02มล. ลงบนผิวหน้าของเจล สำหรับสารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II ใช้อย่างละ0.04มล. ผ่านกระแสไฟฟ้าตรงจากขั้วลบไปบวกในปริมาณ 1.5 mA ต่อหลอด ใช้เวลา 3 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. นำเจลออกจากหลอด นำมาย้อมสีและล้างสีเช่นเดียวกับข้อ 2.3.7.2.3

ง. วัด relative mobility ของโปรตีนต่าง ๆ โดยที่

relative mobility = R_e/R_f

เมื่อ R_e = ระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ไปบนเจลโดยเริ่มจากขอบบนสุดของ separating gel

R_f = ระยะทางที่ tracking dye เคลื่อนที่ไปได้

จ. หามวลโมเลกุลของ subunits ของเอ็นไซม์เซลลูเลสทั้งสองจาก standard curve (รูปที่ 3.16) ซึ่งพลอตระหว่าง R_e/R_f และ log MW ของโปรตีนมาตรฐานต่าง ๆ

2.3.8.2 <u>การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในโมเลกุลเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II โดย Phenol-sulfuric method[57]</u>

2.3.8.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

- 80% phenol : เตรียมได้โดยเติมน้ำกลั่น 10 มล. ลงใน phenol ที่หลอมเหลว 40 มล.
- กรด H_2SO_4 เข้มข้น
- สารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 5-25 ไมโครกรัม/มล. เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1 มก./มล. (100 ไมโครกรัม/มล.)

2.3.8.2.2 วิธีการทดลอง

- ละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.5 มก./มล.
- นำสารละลายเอ็นไซม์ (2 มล.) และสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (5-25 ไมโครกรัม/มล.) ความเข้มข้นละ 2 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มาเติม 80% phenol 0.1 มล., กรด H_2SO_4 เข้มข้น 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที

- นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เป็น blank, สรุปวิธีทำได้ดังตารางที่ 2.2
- ทำการทดลอง 2 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย
- พลอต standard curve ระหว่าง OD_{490} กับปริมาณกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัม) ได้ผลดังรูปที่ 3.17

ตารางที่ 2.2 วิธีการทดลองหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

สารเคมี (มล.)	หลอดทดลองที่						
	1	2	3	4	5	6	7
สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (100 µg/ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	-
สารละลายเอ็นไซม์	-	-	-	-	-	-	2.0
น้ำกลั่น	2.0	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5	-
80% phenol	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
กรด H_2SO_4 เข้มข้น	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
OD_{490}							

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.8.3 การศึกษาผลของ incubation time ต่อ activity เอ็นไซม์เซลลูเลส I และII

2.3.8.3.1 สารละลายที่ใช้ : สารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส form I, ความเข้มข้น 1.6 ไมโครกรัม/มล.

: สารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส form II, ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัม/มล.

2.3.8.3.2 นำสารละลายเอ็นไซม์ 0.1 มล. + 1.0% CMC 0.5 มล. + 0.05 M citrate buffer pH 4.8 0.4 มล. ไป incubate ที่ 50° ซ เป็นเวลา 15, 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที แล้วทำการวัด activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส (form I และ II) ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยสำหรับหลอด control ประกอบด้วย 0.05 M citrate buffer pH 4.8 0.5 มล. + 1.0% CMC 0.5 มล. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างบน ผลแสดงดังรูปที่ 3.18

2.3.8.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นเอ็นไซม์ต่อ activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II[49]

2.3.8.4.1 สารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส I, ความเข้มข้น 1.6 ไมโครกรัม/มล. สารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส V, ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัม/มล.

2.3.8.4.2 นำหลอดทดลองซึ่งบรรจุสับสเตรท 1% CMC และสารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส (form I,II) ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มล. จาก stock solution ไป incubateที่ 50° ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัด activity ของเอ็นไซม์ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ทำการทดลองซ้ำ คำนวณหาปริมาณโปรตีนของเอ็นไซม์เซลลูเลสทั้ง 2 form

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยวิธี Modified Lowry ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.19

2.3.8.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส form I และ II

2.3.8.5.1 ผลของ incubation temperature ต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส

- เตรียมสารละลายเอ็นไซม์ในน้ำกลั่น : เอ็นไซม์เซลลูเลส I 1.6 ไมโครกรัม/มล., เอ็นไซม์เซลลูเลส II 34 ไมโครกรัม/มล.
- นำสารละลายผสมในแต่ละหลอด ซึ่งประกอบด้วย สารละลายเอ็นไซม์ 0.2 มล., 0.05 M citrate buffer pH 4.8 0.3 มล. และ 1% CMC 0.5 มล. ไป incubate ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 ° ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัด activity ของเอ็นไซม์ด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้ว สำหรับหลอด control ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 มล. + 1% CMC 0.5 มล. นำไปทดลองเช่นเดียวกับข้างบน ได้ผลดังรูปที่ 3.20

2.3.8.5.2 ผลของ heat treatment ต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส

- เตรียมสารละลายเอ็นไซม์ในน้ำกลั่น : เอ็นไซม์เซลลูเลส I 1.6 ไมโครกรัม/มล. เอ็นไซม์เซลลูเลส II 34 ไมโครกรัม/มล.
- นำสารละลายเอ็นไซม์ 0.2 มล. + 0.05 M citrate buffer pH 4.8 0.3 มล. ไปอุ่นที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 40, 45, 50, 55, 60 และ 65 ° ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาเติม 1% CMC 0.5 มล. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 ° ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วัด activity ที่เหลือของเอ็นไซม์ ณ อุณหภูมิต่าง ๆ ได้ผลดังรูปที่ 3.21

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.8.6 การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

2.3.8.6.1 การหา Optimum pH ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

- สารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ : 0.05 M glycine-HCl buffer pH 2.5 และ 3.5, 0.05 M acetate buffer pH 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5, 0.05 M phosphate buffer pH 6.0 และ 7.0 , สารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส I (0.8 ไมโครกรัม/มล.) และ I (17.2 ไมโครกรัม/มล.) สารละลาย 1% CMC (1 กรัม CMC ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.)

- วิธีการทดลอง นำสารละลายผสม ซึ่งประกอบด้วยสารละลายเอ็นไซม์ 0.2 มล., บัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ 0.3 มล. และ 1% CMC 0.5 มล. ไป incubate ที่ 45° ซ สำหรับเอ็นไซม์เซลลูเลส I และที่ 50° ซ สำหรับเอ็นไซม์เซลลูเลส II เป็นเวลา 30 นาที แล้ว activity ของเอ็นไซม์เซลลูเลสเช่นเดียวที่กล่าวมาแล้ว ทำการทดลอง 2 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย สำหรับหลอด control ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ 0.5 มล. + 1%CMC 0.5มล. นำไปทดลองเช่นเดียวกับข้างบน ได้ผลดังรูปที่ 3.2.2

2.3.8.6.2 การหา pH stability ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

- สารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ : 0.05 M glycine-HCl buffer pH 2.5 และ 3.5, 0.05 M acetate buffer pH 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5, 0.05 M phosphate buffer pH 6.0 และ 7.0, 0.05 M Tris-HCl buffer pH 8.0 สารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส I (0.8 ไมโครกรัม/มล.) และ II (17.2 ไมโครกรัม/มล.) และสารละลาย 1% CMC

- วิธีการทดลอง ผสมสารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส (I,II) 0.2 มล. กับสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ 0.3 มล. เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในตู้เย็น (18° ซ) เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วเติม 1% CMC 0.5 มล., 0.05 M citrate buffer pH 4.8, 0.5 มล. ลงไป นำไป incubate ที่ 45° ซ สำหรับเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ 50° ซ สำหรับเอ็นไซม์เซลลูเลส II เป็นเวลา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

30 นาที แล้วนำมาวัด activity ที่เหลือของเอ็นไซม์ด้วยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 2.3.8.6.1 ทำการทดลอง 2 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย

สำหรับหลอด control ประกอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ 0.5 มล. 0.05 M citrate buffer pH 4.8 0.5 มล., และ 1% CMC 0.5 มล. นำไปทดลองเช่นเดียวกับข้างบน ได้ผลดังรูปที่ 3.23

2.3.9.7 <u>การหาค่า K_m และ V_{max} ของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II</u>

2.3.9.7.1 สารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ มีดังนี้

- สับสเตรท : CMC ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 %
- 0.05 M citrate buffer pH 4.8
- สารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส I (1.6 ไมโครกรัม/มล.) และเซลลูเลส II (34 ไมโครกรัม/มล.)

2.3.9.7.2 วิธีการทดลอง

ผสมสารละลายเอ็นไซม์ 0.2 มล. กับสับสเตรท CMC ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 25%) 0.5 มล. ปรับปริมาตรด้วย 0.05 M citrate buffer pH 4.8 จนครบ 1 มล. นำไป incubate ที่ 45° ซ สำหรับเซลลูเลส form I และที่ 50° ซ สำหรับเซลลูเลส form II เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัด activity ของเอ็นไซม์ด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้ว สำหรับหลอด control ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 มล. + CMC ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ทำการทดลองเช่นเดียวกัน

ทำ Line-weaver-Burk plot แล้วหาค่า K_m และ V_{max} ได้ผลดังรูปที่ 3.25

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.9.8 <u>การศึกษาผลของโลหะอิออน และ chelating compound ต่อการทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II</u>

2.3.9.8.1 สารละลายต่าง ๆ ที่ใช้มีดังนี้

- สารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส I (1.6 ไมโครกรัม/มล.) และ II (34 ไมโครกรัม/มล.)
- 0.05 M citrate buffer pH 4.8
- 0.1 M ของสารละลาย $MnCl_2$, $CuSO_4$, $FeCl_3$, $AgNO_3$, $HgCl_2$, $MgSO_4$, $CaCl_2$, $NiCl_2$ and $CoCl_2$
- 0.1 M ของสารละลาย β-mercaptoethanol, EDTA

2.3.9.8.2 วิธีการทดลอง

- นำสารละลายผสมของสารละลายเอ็นไซม์ 0.5 มล. (สารละลายเอ็นไซม์ 0.2 มล. + บัฟเฟอร์ 0.3 มล.) และ สารละลายโลหะอิออนในแต่ละความเข้มข้น 10^{-2}M, 10^{-3}M และ 10^{-4}M 0.5 มล. ไป preincubate ที่ 45° ซ สำหรับเอ็นไซม์ form I และ 50° ซ สำหรับเอ็นไซม์ form II เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปหา activity ที่เหลือของเอ็นไซม์ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว
- กรณีสารละลาย β-mercaptoethanol และ EDTA ก็ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างบน โดยใช้ความเข้มข้นของสารเป็น 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} และ 10^{-4} M
- ทำการทดลองซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3.7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.9.9 การศึกษาการทำงานร่วมกันของเอ็นไซม์เซลลูเลส I และ II

2.3.9.9.1 สารเคมีที่ใช้ : สารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลส I 1.6 ไมโครกรัม/มล. เซลลูเลส II 34 ไมโครกรัม/มล.

: 0.05 M citrate buffer pH 4.8

: 1 % CMC

: กระดาษกรอง Whatman No.1 ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1 x 1 ซม.

2.3.9.9.2 วิธีการทดลอง

ก. การทำงานของเซลลูเลส I และ II ต่อ CMC

- incubate สารละลายเอ็นไซม์แต่ละ form 0.5 มล. (สารละลายเอ็นไซม์ 0.2 มล. + บัฟเฟอร์ 0.3 มล.) กับ 1 % CMC 0.5 มล. ที่ 50 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัด activity ของเซลลูเลสแต่ละ form ทดลองซ้ำหาค่าเฉลี่ย

- ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างบน แต่ใช้สารละลายเอ็นไซม์แต่ละ form เป็น 2 เท่า คือ 1 มล.

- ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างบน แต่ใช้สารละลายเอ็นไซม์ผสมระหว่าง I และ II อย่างละ 0.5 มล.

ข. การทำงานของเซลลูเลส I และ II ต่อกระดาษกรอง

- นำสารละลายเอ็นไซม์เซลลูเลสแต่ละ form (0.5 มล.) และเอ็นไซม์เซลลูเลสผสม (I + II, 1 มล.) มาใส่ในหลอดทดลอง ซึ่งบรรจุกระดาษกรอง (~ 20 มก.) ปรับปริมาตรในแต่ละหลอดด้วย 0.05 M citrate buffer pH 4.8 เป็น 4 มล. แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง (30 °ซ.) เป็นเวลา 7 วัน

- นำสารละลายเอ็นไซม์แต่ละหลอดไปวัดปริมาณเส้นใยอิสระที่เกิดขึ้น (free-fiber-forming) โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร และวัดน้ำตาลที่เกิดขึ้น โดย DNS-method เทียบกับหลอด control ซึ่งประกอบด้วยบัฟเฟอร์ 4 มล. และกระดาษกรอง (~ 20 มก.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved