บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 <u>ครุภัณฑ์</u>

Beckman Refrigerated Centrifuge, model J-21 C บริษัท Beckman Instruments Inc., U.S.A.

Conductivity Meter, model CDM 83 บริษัท Radiometer, Copenhagen, Denmark.

Fraction Collector, model LKB 2070 Ultro Rac II บริษัท LKB, Sweden.

pH Meter, model Zeromatic IV บริษัท Beckman Instruments Inc., U.S.A.

Muffle furnace, model Furnatrol II บริษัท Thermolyne, U.S.A.

Vaccuum Oven Dryer, model VT 5042 EK บริษัท Hareaus, Germany.

Spectrophotometer, model Spectronic 2000 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

Spectrophotometer, model Spectronic 20 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

Top Bench Centrifuge, model Minor 35 บริษัท MSE Ltd., England.

Ultrafiltration Cell, model 8400 บริษัท Amicon Corporation, U.S.A.

Water Bath, model A 4668 บริษัท Charles Hearson and Co.Ltd., England.

Blender บริษัท National, Japan.

เครื่องบีบแบบไฮดรอลิค ออกแบบและสร้างโดย ศ.ดร. สมศักดิ์ ดำรงเลิศ

ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องบีบแบบสกรู สร้างโดยภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 เคมีภัณฑ์

Casein (hammarsten), L-Cysteine hydrochloride, polyacrylic acid, Gelatin, Duolite C-225 จากบริษัท BDH Chemical Ltd., England. Glutaraldehyde จากบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A. Carboxymethyl cellulose, จากบริษัท Whatman, England. Sephadex G100 จากบริษัท Pharmacia, Sweden. low-fat milk powder "Slim", จากบริษัท Iverson Dairy Group, U.S.A. และอะซีโตนจากบริษัท สุราอยุธยา ประเทศไทย

สารเคมีนอกเหนือจากนี้เป็นสารที่ใช้วิเคราะห์ระดับ Reagent grade ได้จากบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A., บริษัท BDH Chemical Ltd., England และบริษัท Fluka, Switzerland เป็นส่วนใหญ่

2.3 การเตรียมสารละลาย

2.3.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้หาปริมาณโปรตีน

2.3.1.1 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper)

ก. สารละลาย ก. ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร

ข. สารละลาย ข. ละลายคิวปริกซัลเฟต 1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ค. สารละลาย ค. ละลายโพแตสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก. 100 มิลลิลิตร สารละลาย ข. 1 มิลลิลิตร และสารละลาย ค. 1 มิลลิลิตรก่อนใช้

2.3.1.2 สารละลายฟีนอล (Phenol reagent)

ผสมโซเดียมทังสเตต 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดต 12.5 กรัม น้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร 85 เปอร์เซนต์ กรดฟอสฟอริค 25 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 50 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ (reflux) ด้วยความร้อนต่ำ ๆ นาน 10 ชั่วโมง แล้วเติมลิเธียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และน้ำโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอประมาณ 15 นาทีทิ้งไว้ให้เย็นเก็บในขวดสีชา สารละลายนี้สามารถเก็บไว้ได้นาน 3-6 เดือน เวลาใช้ทำให้เจือจาง 1 เท่าด้วยน้ำกลั่น

2.3.1.3 สารละลายไบยูเรต (Biuret reagent)

ผสมคิวปริกซัลเฟต 1.5 กรัม โซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรต 6 กรัมใน 10 เปอร์เซนต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา

2.3.2 การเตรียมสารละลายใช้ในการวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน

2.3.2.1 สารละลายเคซีน 0.6 เปอร์เซนต์

ละลายเคซีน 0.6 กรัม ใน 0.05 โมลาร์โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 80 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.1 นอร์มัล เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้ควรเตรียมใช้ใหม่ทุกครั้ง

2.3.2.2 สารละลายที่ใช้เจือจางเอนไซม์

ละลายกรดอะมิโนซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ 0.473 กรัม และกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิค 0.223 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 4.5 ด้วย 0.1 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้ควรเตรียมใช้ใหม่ทุกครั้ง

2.3.2.3 สารละลายใช้ตกตะกอนโปรตีน

ละลายกรดไตรคลอโรอะซีทิค 17.974 กรัม ในสารละลายที่มีโซเดียมอะซีเตต 18.054 กรัม และกรดอะซีทิค 18.9 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร

2.3.2.4 สารละลายเจลาติน 5.0 เปอร์เซนต์

ละลายเจลาติน 5 กรัมในน้ำร้อน 75 มิลลิลิตร ทำให้

เย็นจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส นำมาปรับพีเอชเป็น 4.5 เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร

2.3.2.5 สารละลายนม 20 เปอร์เซนต์

บดนมผงพร่องมันเนย 20 กรัม ในโกร่งที่มี 0.2 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.3 ประมาณ 10 มิลลิลิตร ให้เข้ากันดี แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ จนได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร

2.4 วิธีวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน

การวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนทำได้หลายวิธีแตกต่างกันตามชนิดของสับสเตรทที่ใช้คือ

2.4.1 เคซีน (casein) เป็นสับสเตรท (ดัดแปลงจากคู่มือ การวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนจากบริษัท Polyamine (Taiwan) Corporation)

นำสารละลายเอนไซม์ตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบแอคติวิตีมาเจือจางด้วยสารละลายของกรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ และกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิคให้มีความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม (ปริมาณโปรตีนไม่เกิน 0.06 มิลลิกรัม) อุ่นสารละลายเอนไซม์นี้ 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีแล้วจึงเติมสารละลายเคซีน 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีทิค 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวส์แยกส่วนน้ำใสมาวัดการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

สำหรับหลอดควบคุม ให้เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีทิคในสารละลายเอนไซม์ก่อน แล้วจึงเติมสารละลายเคซีน ต่อจากนั้นดำเนินการทดลองด้วยวิธีเดียวกันกับหลอดตัวอย่าง นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ในหลอดควบคุมไปหักจากค่าการดูดกลืนแสงของหลอดตัวอย่าง แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน

กำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย (Casein Digestion Unit, CDU) คือไมโครกรัมของไทโรซีนที่ถูกย่อยสลายจากเคซีนที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 ใน

เวลา 1 นาที

2.4.2 <u>เจลาติน (gelatin) เป็นสับสเตรท</u> (ดัดแปลงจากวิธีของ Kunitz, 1947)

ทำการวิเคราะห์แอคติวิตีของสารละลายเอนไซม์ในตัวอย่าง โดยใช้สารละลายเอนไซม์ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีนไม่เกิน 1.7 มิลลิกรัม) มาอินคิวเบตกับสารละลายเจลาติน 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาหยด 3 เปอร์เซนต์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 หยด แล้วปรับพีเอชของสารละลายเอนไซม์เป็น 6.0 ด้วยสารละลาย 0.1 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ หลังจากนั้นเติมฟอร์มัลดีไฮด์ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนได้พีเอชของสารละลายเป็น 9.0

สำหรับหลอดควบคุมดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับหลอดตัวอย่าง เพียงแต่หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 หยด ในสารละลายเอนไซม์ก่อน แล้วจึงเติมสารละลายเจลาติน นำค่าปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรทในหลอดควบคุมไปหักจากปริมาณที่ใช้ไตเตรทในหลอดตัวอย่าง ค่าที่ได้นำไปคำนวณเป็นหน่วยของเอนไซม์ได้โดย

$$GDU/g = \frac{(T-B)\ (1000)\ (0.1)\ (14)}{\text{mg. enzyme}}$$

T = ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรทในหลอดตัวอย่าง

B = ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรทในหลอดควบคุม

เมื่อกำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย (Gelatin Digestion Unit, GDU) คือมิลลิกรัมของไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายเจลาตินที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 เป็นเวลา 20 นาที

2.4.3 <u>นมผงพร่องมันเนย (low fat milk) เป็นสับสเตรท</u> (ดัดแปลงจากวิธีของ Greenberg, 1955)

วิธีวัดแอคติวิตีอีกวิธีหนึ่งทำได้โดย เติมสารละลายนม 5 มิลลิลิตรลงใน 1 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วงระหว่าง 0.3-0.9 มิลลิกรัม เขย่าให้เข้ากัน จับเวลาการแข็งตัวของสารละลายนม ที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส

กำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย (Milk Clotting Unit, MCU) คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้สารละลายนม 5 มิลลิลิตร แข็งตัวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 5.3 ในเวลา 1 นาที

2.5 วิธีวัดปริมาณโปรตีน

วิธีที่ใช้วัดปริมาณโปรตีนทำได้ 3 วิธีขึ้นกับขั้นตอนของการวิจัย และปริมาณโปรตีนที่มีในสารละลายตัวอย่าง

2.5.1 วิธี Lowry (Lowry, 1951) ใช้เมื่อสารละลายที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน มีปริมาณโปรตีนต่ำคือ อยู่ในช่วง 0-100 ไมโครกรัม และไม่มีสารอื่นรบกวนปฏิกิริยา เช่น สารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาทีแล้วเติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนท์ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นกับสีที่ได้จากการใช้สารละลาย โปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัมเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับฟีนอลรีเอเจนท์ด้วยวิธีเดียวกัน

2.5.2 วิธี Biuret (Zamenhof, 1957) ใช้เมื่อสารละลายที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนสูงกว่าในกรณีข้อ 2.5.1 คืออยู่ในช่วง 0.5-7.0 มิลลิกรัม และไม่มีสารอื่นรบกวนการเกิดปฏิกิริยา เช่น สารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้หลังจากการตกตะกอนด้วยอะซีโตน

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายไบยูเรต 4 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายสีซึ่งเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นกับสีที่ได้จากการใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0.5-7.0 มิลลิกรัม เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไบยูเรตด้วยวิธีการเดียวกัน

2.5.3 วิธีนี้ดัดแปลงจากวิธี Biuret เนื่องจากสารละลายเอนไซม์ที่ได้จาก

การสกัดจากต้นสับปะรดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) สูง จึงมีผลรบกวนการเกิดสีของสารละลาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตกตะกอนโปรตีนก่อนด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีทิค แล้วจึงนำตะกอนที่แยกได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีทิค 10 เปอร์เซนต์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที ต่อจากนั้นนำมาเซนตร์ฟิวส์แยกส่วนตะกอนไว้ แล้วเติมสารละลายไบยูเรต 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสีที่เกิดขึ้นกับตะกอนโปรตีนของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0.5-7.0 มิลลิกรัม เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไบยูเรตด้วยวิธีเดียวกัน

2.6 <u>การแยกสารละลายโปรตีนด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสแบบโพลีอะไครละไมด์เจล</u>

บรรจุสารละลายเอนไซม์ลงในแท่งเจลขนาด 0.5x10 เซนติเมตร นำไปแยกด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Davis (1964), Weber & Osborn (1969) สารละลายเอนไซม์ที่ใช้จะมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 25-200 ไมโครกรัม หรือประมาณ 25-200 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 3 มิลลิแอมแปร์ต่อแท่งเจล เวลาที่ใช้ในการแยกนานประมาณ 2 ชั่วโมงในสารละลายทริส-ไกลซีน บัฟเฟอร์ พีเอช 8.3 และย้อมสีโปรตีนด้วยคูมาสซี บริลเลียนท์บลู (Coomassie brilliant blue)

2.7 <u>การเตรียมสารละลายโบรมิเลนจากต้นสับปะรด</u>

2.7.1 <u>การเตรียมสารละลายโบรมิเลนโดยใช้เครื่องตีป่น (Blender)</u>

นำต้นสับปะรดที่ปอกเปลือกแล้ว และหั่นตามขวางของลำต้นให้ได้ความหนาประมาณ 0.1-0.2 เซนติเมตร มาปั่นในน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วน ของต้นสับปะรดต่อน้ำกลั่นเป็น 2 ต่อ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยแบ่งปั่นหลายรอบ ในแต่ละรอบใช้ต้นสับปะรดหนัก 300 กรัมปั่นในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องตีป่นชนิดตั้งโต๊ะของบริษัทเนชั่นแนล

นาน 2 นาที บีบน้ำเก็บไว้ แล้วทำเช่นนี้อีกจนครบปริมาตรของน้ำกลั่นที่ใช้สกัดแยกน้ำน้ำคั้นที่บีบแยกได้ในแต่ละรอบมารวมกัน หลังจากนั้นจึงใช้น้ำคั้นที่รวมได้นี้มาปั่นซ้ำกับต้นสับปะรดที่เหลือด้วยสัดส่วนของน้ำคั้น 500 มิลลิลิตรต่อต้นสับปะรด 300 กรัม จนครบปริมาณต้นสับปะรดทั้งหมด รวมน้ำคั้นที่บีบแยกได้ทั้งหมดนำมากรอง จะได้สารละลายโบรมิเลนที่เตรียมโดยใช้เครื่องตีปั่น

2.7.2 การเตรียมสารละลายโบรมิเลนโดยใช้เครื่องบีบไฮดรอลิค (Hydraulic press)

การเตรียมสารละลายโบรมิเลนวิธีนี้ทำได้โดยบรรจุต้นสับปะรดที่ปอกเปลือกแล้ว และหั่นตามขวางให้มีความหนาประมาณ 0.1-0.2 เซนติเมตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างของเครื่องบีบไฮดรอลิคจำนวน 300 กรัม จากนั้นบีบน้ำต้นสับปะรดออกมาให้ได้มากที่สุด จนกระทั่งไม่มีน้ำออกมาอีก กรองน้ำคั้นที่บีบได้นี้เพื่อแยกกากออกโดยใช้ผ้าขาวบาง สารละลายที่ได้เป็นสารละลายโบรมิเลนที่เตรียมโดยใช้เครื่องบีบไฮดรอลิค

2.7.3 การเตรียมสารละลายโบรมิเลนโดยใช้เครื่องบีบแบบสกรู (Screw press)

ทำการเตรียมสารละลายโบรมิเลนด้วยเครื่องบีบแบบสกรู โดยแช่ต้นสับปะรดที่ปอกเปลือกแล้ว และหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 1x1 นิ้วใน 0.1 เปอร์เซนต์โซเดียมเบนโซเอตนานประมาณ 1 นาที ต่อจากนั้นนำไปบีบด้วยเครื่องบีบแบบสกรูกากของต้นสับปะรดที่บีบเอาน้ำออกแล้ว นำมาเติมโซเดียมเบนโซเอต 0.1 เปอร์เซนต์ด้วยสัดส่วนของกาก 3 กิโลกรัมต่อโซเดียมเบนโซเอต 1 ลิตร กวนให้เข้ากันแล้วบีบเอาน้ำออกโดยใช้เครื่องบีบด้วยมือแบบสกรู น้ำคั้นที่ได้นำไปรวมกับน้ำคั้นที่ได้จากการบีบด้วยเครื่องบีบแบบสกรูในครั้งแรก จากนั้นกรองน้ำคั้นที่ได้ด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกกากขนาดใหญ่ออก จะได้สารละลายโบรมิเลนที่เตรียมด้วยเครื่องบีบแบบสกรู

2.8 การผลิตโบรมิเลนจากต้นสับปะรดโดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซีโตน (นิมิตพิสุทธิ์ แรงคะชวนะ, 2530)

เตรียมสารละลายโบรมิเลนจากต้นสับปะรดโดยใช้เครื่องบีบแบบไฮดรอลิคหรือเครื่องบีบแบบสกรูตามวิธีข้อ 2.7.2 และ 2.7.3 กรองแยกกากขนาดเล็กออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ของบริษัท Whatman ในถังกรองที่มีระบบสูญญากาศ ส่วนน้ำใสที่

ได้นำไปเติมโซเดียมเมทาไบซัลไฟท์ กรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิค โซเดียมเบนโซเอต และ cat floc ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย ๐.1 เปอร์เซนต์ ปรับพีเอชของสารละลายเป็น 4.3 ด้วยสารละลายกรดอะซีทิค 2 นอร์มัล แล้วนำไปตกตะกอนด้วยอะซีโตน 2 ครั้ง ในถังตกตะกอนที่มีระบบควบคุมอุณหภูมิ ๐ ถึง 4 องศาเซลเซียส โดยในครั้งแรกใช้อัตราส่วนของสารละลายเอนไซม์ต่ออะซีโตนเป็น 1 ต่อ ๐.7 โดยปริมาตร กรองแยกสารละลายใสมาตกตะกอนด้วยอะซีโตนอีกครั้ง โดยเพิ่มอัตราส่วนของสารละลายเอนไซม์ต่ออะซีโตนเป็น 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์มากขึ้นนานประมาณ 15-2๐ นาที ต่อจากนั้นกรองแยกเอาส่วนตะกอนโบรมิเลนไปอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 5๐ องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ตรวจสอบแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้ ตามวิธีข้อ 2.4.1 และ 2.5.3 ตามลำดับ

นำผงโบรมิเลนที่ได้ละลายน้ำแล้วเซนตริฟิวส์แยกเอาส่วนที่ไม่ละลายออก ส่วนสารละลายน้ำใสที่ได้นำไปแยกให้บริสุทธิ์สูงขึ้นด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

2.8.1 ไดอะไลซิส (dialysis) นำสารละลายโบรมิเลนมาไดอะไลซ์ในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซนตริฟิวส์แยกส่วนสารละลายใส นำไปตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตน (อัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร) ผงโบรมิเลนที่ได้นำไปอบแห้งด้วยตู้อบ อุณหภูมิ 5๐ องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบแอคติวิตีของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้กับผงโบรมิเลนเริ่มต้น

2.8.2 อุลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) นำสารละลายโบรมิเลนไปผ่านลงในเครื่องอุลตราฟิลเตรชัน ที่ใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์แบบ YM1๐ ของบริษัท Amicon Corporation ซึ่งยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็กกว่า 1๐,๐๐๐ ดาลตันผ่านออกไปได้ โดยใช้ความดันจากก๊าซไนโตรเจนในระดับ 3.5 กก./ซม.^{2} ที่อุณหภูมิ 1๐ องศาเซลเซียส จนปริมาตรของสารละลายโบรมิเลนลดลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่ง วัดแอคติวิตีของโบรมิเลนทั้งในส่วนสารละลายเข้มข้นที่เหลืออยู่ในภาชนะ และส่วนที่ผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ แล้วนำสารละลายส่วนเข้มข้นนี้ไปตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตน (อัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร) เปรียบเทียบแอคติวิตีของผงโบรมิเลนที่ได้หลังการอบแห้งที่อุณหภูมิ 5๐ องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง กับแอคติวิตีของผงโบรมิเลนเริ่มต้น

2.8.3 Ion exchange ชนิดดูโอไลซ์ ซี 225 นำสารละลายโบรมิเลนไปผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุดูโอไลซ์ ซี 225 (ขนาด 1.5x20 ซม.) ชะโบรมิเลนออกจากคอลัมน์ด้วย 0.02 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 เก็บสารละลายโบรมิเลนที่แยกได้เป็นแฟรคชัน (3 มิลลิลิตร) แล้วนำไปวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในแต่ละแฟรคชัน หลังจากนั้นรวมแฟรคชันที่มีเอนไซม์แอคติวิตีสูงเข้าด้วยกัน ปรับพีเอชเป็น 4.3 แล้วตกตะกอนด้วยอะซีโตน (อัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร) เซนตร์ฟิวส์แยกผงโบรมิเลนไปอบแห้งด้วยตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบแอคติวิตีของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้กับแอคติวิตีของผงโบรมิเลนเริ่มต้น

2.8.4 Gel filtration นำสารละลายโบรมิเลนไปกรองในคอลัมน์ที่มีเซฟาเดกซ์ จี 100 (ขนาด 2.5x34 ซม.) ซึ่งทำให้สมดุลย์อยู่ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.6 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ เก็บสารละลายเอนไซม์ที่ออกจากคอลัมน์เป็นแฟรคชัน ขนาดแฟรคชันละ 5 มิลลิลิตร วัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในแต่ละแฟรคชั่นที่แยกได้แล้ว รวมแฟรคชันส่วนที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนสูงนำมาปรับพีเอชเป็น 4.3 ตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตนในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร ผงโบรมิเลนที่ได้นำไปอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบแอคติวิตีของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้กับแอคติวิตีของผงโบรมิเลนเริ่มต้น

2.9 การสกัดแยกเอนไซม์โบรมิเลนของต้นสับปะรดให้บริสุทธิ์โดยใช้กรดโพลีอะไคร์ลิค (ดัดแปลงจากวิธีของ Caygill และคณะ, 1983)

เตรียมสารละลายโบรมิเลนจากต้นสับปะรด ตามวิธีข้อ 2.7 แล้วนำไปเติมสารละลายของกรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ และกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิค พีเอช 4.5 ให้มีความเข้มข้นในสารละลายเป็น 6.0 มิลลิโมลาร์ และ 5.0 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนโบรมิเลนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนของปริมาณโปรตีนต่อกรดที่เหมาะสม (อัตราเร็วในการเติมกรด 10 มิลลิลิตรต่อนาที) ต่อจากนั้นเซนตริฟิวส์แยกตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.4 นอร์มัล โซเดียมไบคาร์บอเนต แล้วจึงตกตะกอนโซเดียมไบคาร์บอเนตที่มากเกินพอด้วย 10 เปอร์เซนต์ แคลเซียมคลอไรด์ จนพีเอชของสารละลายเป็น 7.0 หลังจากนั้น

เซนตริฟิวส์แยกส่วนน้ำใสไปปรับพีเอชเป็น 4.3 แล้วนำไปตกตะกอนด้วยการเติมอะซีโตนในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร เซนตร์ฟิวส์แยกส่วนตะกอนโบรมิเลนไปอบแห้งในตู้อบสูญญากาศอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้ ตามวิธีข้อ 2.4.1 และ 2.5.3 ตามลำดับ

นำผงโบรมิเลนที่เตรียมได้มาละลายน้ำ เซนตริฟิวส์แยกเอาส่วนที่ไม่ละลายออก ส่วนสารละลายน้ำใสที่ได้นำไปเพิ่มความบริสุทธิ์ได้โดยผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (CM-cellulose) (ขนาด 2.5x10 ซม.) ชะโบรมิเลนออกจากคอลัมน์โดยใช้เทคนิคเกรเดียนท์แบบเส้นตรงที่มีความเข้มข้นของโพแตสเซียมคลอไรด์ 0 ถึง 0.5 โมลาร์ ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 เก็บแฟรคชันของเอนไซม์จากคอลัมน์ (ขนาดแฟรคชั่นละ 10 มิลลิลิตร) นำไปวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในแต่ละแฟรคชันของเอนไซม์ที่แยกได้ รวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนสูงนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยบรรจุลงในถุงไดอะไลซิส แล้วทำการดูดน้ำออกด้วยน้ำตาลผงผ่านสารละลายโบรมิเลนเข้มข้นนี้ลงในคอลัมน์ที่มีเซฟาเดกซ์ จี 100 (ขนาด 2.5x35 ซม.) ชะคอลัมน์ด้วย 0.01 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 เก็บสารละลายเป็นแฟรคชัน (ขนาด 10 มิลลิลิตร) วัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในแต่ละแฟรคชันที่แยกได้ รวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนสูงเข้าด้วยกัน ในบางครั้งสารละลายโบรมิเลนนี้อาจทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยน้ำตาลผงเช่นเดียวกับวิธีดังกล่าวข้างบน หลังจากนั้นนำไปปรับพีเอชของสารละลายเป็น 4.3 ทำการตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตนในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร ผงโบรมิเลนที่ได้นำไปอบแห้งในตู้อบสูญญากาศอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ในผงโบรมิเลนที่เตรียมได้กับผงโบรมิเลนเริ่มต้น

2.10 <u>การตรึงโบรมิเลนด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส</u> (CM-cellulose)

2.10.1 <u>วิธีเตรียมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส</u>

แช่คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส 10 กรัมใน 0.5 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 150 มิลลิลิตร นาน 30 นาที รินน้ำทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนพีเอชต่ำกว่า 8.0 ต่อจากนั้นนำมาแช่ใน 0.5 นอร์มัล กรดไฮโดรคลอริค 150 มิลลิลิตร

เป็นเวลา 30 นาที รินส่วนน้ำใสทิ้งแล้วเติม 150 มิลลิลิตรของสารละลายเดิมตั้งทิ้งต่อไปอีกนาน 30 นาที รินน้ำใสทิ้งอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้งจนพีเอชเพิ่มขึ้นมาประมาณ 7.0 นำไปแช่ในสารละลาย 0.5 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในขั้นต่อไป

2.10.2 วิธีเตรียมโบรมิเลนตริง

นำผงโบรมิเลน (เตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.9) มาละลายน้ำ เซนตริฟิวส์แยกเอาส่วนสารละลายน้ำใสไปผสมกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (เตรียมตามวิธีข้อ 2.10.1) ในบีกเกอร์ ให้ได้อัตราส่วนของสารละลายโบรมิเลนต่อคาร์บ๊อกซีเมทธิลเซลลูโลสเป็น 1 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อน้ำหนักเปียก) นำไปกวนเบา ๆ ที่ 4 องศาเซลเซียสด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่ความเร็วซึ่งเหมาะสมนาน 30 นาที เซนตริฟิวส์แยกส่วนที่เป็นโบรมิเลนตริงออกมาล้างด้วย 0.05 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 0-10 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร จำนวน 2 ครั้ง โบรมิเลนตริงที่ได้เก็บแช่ไว้ใน 0.05 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.10.3 วิธีเตรียมโบรมิเลนตริงชนิดที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์

การเตรียมทำได้โดยเติม 0.01 โมลาร์ กลูตารัลดีไฮด์ 10 มิลลิลิตร ลงใน 1 กรัมของโบรมิเลนตริงด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (เตรียมตามวิธีข้อ 2.10.2) แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างตะกอนโบรมิเลนตริงด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 30 มิลลิลิตร วัดแอคติวิตีของโบรมิเลนตริงชนิดที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่เตรียมได้ ตามวิธีข้อ 2.4.1