บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษา

Nutrient Agar Slant

Beef Extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Bacto Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมของอาหารในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร บรรจุในหลอดทดลองแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดทดลองมาวางเอียงประมาณ 15 องศา ก่อนที่อาหารจะแข็งตัว รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อยังไม่นำมาใช้

3.1.2 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (inoculum medium) (Basal medium)

(เกษม พงษ์มณี ,2536)

ในสารอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1	กรัม

$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	20	กรัม
กลูโคส	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมอาหารให้เข้ากันในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ส่วนของกลูโคสแยกอบนึ่งฆ่าเชื้อต่างหากที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมเข้าไปโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 %

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

อาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจะเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยที่ต้องการศึกษา นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCl_2.2HO$	0.01	กรัม

กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1

แป้งมันสำปะหลัง

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาปริมาณของกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.3 โดยใส่ปริมาณของแป้งมันสำปะหลังคงที่ แต่เปลี่ยนแปลงปริมาณของกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันที่มีสัดส่วน 1:1 ในช่วงดังปริมาณข้างล่างนี้

แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน

0.1 - 0.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาหาปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.3 โดยมีปริมาณของกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันคงที่ แต่เปลี่ยนแปลงปริมาณของแป้งมันสำปะหลังในช่วงปริมาณดังข้างล่างนี้

กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน

0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

แป้งมันสำปะหลัง 0 - 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

3.1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบขั้นปฐมภูมิ

- Skim milk stock solution

นมผงขาดมันเนย (skim milk) จำนวน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- Skim milk agar plate

Bacto agar 1.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที เติม skim milk stock solution 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้พออุ่น นำไปเทลงจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.1.7 การเตรียมวัตถุดิบผสมซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน (เกษม พงษ์มณี ,2536)

วัตถุดิบที่ใช้ได้แก่ กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวัน โดยเตรียมดังนี้

ย่อยสลายวัตถุดิบด้วยกรด โดยชั่งวัตถุดิบที่ประกอบด้วยกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 จำนวน 12 กรัม ใส่ในภาชนะที่ทนกรด เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 นอร์มอล จำนวน 40 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 80 มิลลิลิตร นำมากรองเอาเฉพาะส่วนน้ำใส นำมาปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 นอร์มอล ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 1 คืน นำเฉพาะส่วนน้ำใสมาใช้ นำไปหาปริมาณไนโตรเจน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียสระหว่างรอการนำมาใช้

3.2 <u>การเตรียมสารละลาย</u>

3.2.1 สารละลายสำหรับหาแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี

- สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 21.2 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต 16.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บเป็น stock solution ผสมสารละลายของโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 202.5 มิลลิลิตรกับโซเดียมไบคาร์บอเนตปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงในสารละลายบัฟเฟอร์จนครบ 1 ลิตร นำไปปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 10.5

- สารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6

ชั่งอิมมิดาโซล 6.808 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร และนำไปปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.6

- สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ pH 10.5

ชั่งเคซีนแฮมเมอร์สเตน 0.5 กรัม ละลายในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 จำนวน 100 มิลลิลิตร คนจนเคซีนละลายหมด นำไปปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 10.5 เก็บรักษาในตู้เย็น ก่อนนำไปใช้

- สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดไตรคลอโรอะซีติก 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชา เก็บในตู้เย็นก่อนนำไปใช้

3.2.2 สารละลายสำหรับหาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl (Leonard , 1987)

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

- สารละลายบอริก 4 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดบอริก 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

- สารละลายอินดิเคเตอร์

ชั่งเมธิลเรด 0.2 กรัม และ เมธิลลีนบลู 0.1 กรัม นำไปละลายในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

3.2.3 การเตรียมสารละลายสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธีของ Nelson และ Somogyl (Nelson ; 1944)

- Nelson Reagent

ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 53.2 กรัม ละลายน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร จากนั้นใส่กรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำสารละลาย $Na_2HAsO_4.7H_2O$ จำนวน 6 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมลงไปกวนให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้

- Alkaline Copper Reagent

ชั่งโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) จำนวน 71 กรัม และ โปแตสเซียมโซเดียมทาร์เตรท จำนวน 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 700 มิลลิลิตร ใส่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ความเข้มข้น 10 % จำนวน 80 มิลลิลิตร นำไปตั้งบน hot plate ให้อุ่น แล้วใส่โซเดียมซัลเฟตจำนวน 180 กรัม ลงไป คนให้ละลายปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24-28 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้ เก็บในขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.2.4 การเตรียมสารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford;1976)

- สารละลายโปรตีนรีเอเจนต์

ชั่ง Coomassie brilliant blue G-250 จำนวน 100 มิลลิกรัม ละลายในเอธิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

- สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ละลาย Bovine serum albumin (BSA) จำนวน 10 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3 <u>การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง</u>

3.3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียระยะสั้น

เขี่ยเชื้อจาก stock แล้ว streak ลงบน Nutrient Agar (NA) Slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มที่ (ประมาณ 24 ชั่วโมง) พันจุกด้วยพาราฟิล์มเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 2 - 3 เดือน

3.3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียระยะยาว

เลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุ Nutrient Broth ประมาณ 24 ชั่วโมง จนเชื้อเจริญอยู่ในช่วง log phase แล้วนำมาผสมกับกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ เทปิดทับผิวหน้า 1 - 2 เซนติเมตร พันจุกด้วยพาราฟิล์มเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 1 ปี

3.4 <u>การศึกษาการเจริญของเชื้อ</u>

3.4.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter inoculum) (เกษม พงษ์มณี ,2536)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก NA-Slant นำมา streak บน Skim milk agar plate นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก Skim milk agar plate 1-2 โคโลนี ใส่ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ประมาณ 12-16 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.6

3.4.2 การเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 เพื่อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ลงถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรเริ่มต้น 3,500 มิลลิลิตร ใช้หัวเชื้อซึ่งมีปริมาณ 35 มิลลิลิตร (คิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารที่ใช้ในขบวนการผลิต) ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเตรียมได้ตามข้อ 3.1.3 ควบคุมภาวะในการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วย 2 N NaOH โดยควบคุมให้อยู่ในช่วง 7.0 ควบคุมความเป็นฟองด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3

3.4.3 การวัดการเจริญของเชื้อโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักจำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำใสเก็บไว้วิเคราะห์แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีและปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ นำเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และนำเซลล์ที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาใส่ในเดสิคเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็นนำมาชั่งน้ำหนักให้มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญ

3.5 <u>การวัดแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี (ดัดแปลงจากวิธีทดลองของ Richardson และ Tewhaiti;1978)</u>

นำส่วนน้ำใสจากข้อ 3.4.3 มาหาแอคติวิตีโดยบ่มตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1.0 มิลลิลิตร ในสารละลายคาร์บอเนต - ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 จำนวน 0.9 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 45

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์เทียบกับ กราฟมาตรฐานไทโรซีนที่มีความเข้มข้น 0-140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ 1)

<u>การคำนวณค่าแอคติวิตี</u>

$$\text{แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี} = \frac{\text{OD280} \times \text{Total volume (ml)} \times \text{Dilution}}{\text{Slope} \times \text{Sample vol.(ml)} \times \text{Incubation time (minute.)}}$$

กำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์เท่ากับปริมาณของไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ที่ได้จากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์ที่ภาวะของการหาแอคติวิตี ภายในเวลา 1 นาที

ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทุกตัวอย่างจะต้องทำหลอดควบคุมด้วยสำหรับเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างแท้จริง โดยทำการบ่มสารละลายเคซีนกับกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาทีก่อน จากนั้นจึงค่อยเติมสารละลายบัฟเฟอร์และตัวอย่างลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำไปเหวี่ยงตกตะกอนแยกส่วนน้ำใสนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280

นาโนเมตร ค่าปริมาณการดูดกลืนแสงของปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์อย่างแท้จริงหาได้จากผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน

3.6 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl (Leonard:1987)

นำตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยา 7 กรัม (โพแทสเซียมซัลเฟต 95 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม) และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปกลั่นโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร นำเอาขวดรูปกรวยใส่กรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 150 มิลลิลิตร ซึ่งเติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด มารองรับสารละลายที่กลั่นได้ จนกระทั่งมีปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร หรือสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว แล้วจึงนำไปไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ไตเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงใส คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนจากสูตรข้างล่างนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times C \times 1.4}{V}$$

A= ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B= ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

C= ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

V= ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

1.4= ปริมาณของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N จำนวน 1 มิลลิลิตร ที่สมมูลกับปริมาณของไนโตรเจน 1.4 มิลลิกรัม

3.7 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธีของ Nelson และ Samogyi (Nelson:1944)

นำตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Alkaline Copper Reagent ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีโดยใส่ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลาย Nelson's Reagent ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลืออยู่ในสารละลายเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีปริมาณกลูโคส 0-120 ไมโครกรัม (ภาคผนวกที่ 2)

3.8 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford:1976)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโปรตีนรีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีน 0 - 100 ไมโครกรัม (ภาคผนวกที่ 3)

3.9 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนและทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ผงโดยเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ

โดยนำน้ำหมักที่แยกเอาเซลล์ออกโดยนำไปปั่นด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกเก็บเฉพาะส่วนน้ำใสมาแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด 70 เปอร์เซ็นต์ (472 กรัมต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) โดยค่อยๆเติมทีละน้อยพร้อมกับคนเบาๆตลอดเวลาจนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมด

นำไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน จากนั้นนำมาเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายด้วยสารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6 ส่วนที่ไม่ตกตะกอนนำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 นำตะกอนที่ได้ทั้งหมดมาทำการ dialyzed ในสารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6 เพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกไป จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้นำมาทำให้เข้มข้นโดยทำเป็นเอนไซม์ผงด้วยวิธี Lyophilized นำผงเอนไซม์ที่ได้มาแบ่งไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 80 , - 20 , 4 , 25 - 30 และ 65 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาหาแอคติวิตีเป็นระยะๆ เปรียบเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้นที่หาได้ก่อนที่จะนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยหาค่าแอคติวิตีที่เหลือเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์

3.10 <u>การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ผงในช่วง pH ต่างๆ เมื่อมี EDTA และ ไม่มี EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)</u>

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.5 โดยนำเอนไซม์ผงมาละลายในบัฟเฟอร์ที่ต้องการศึกษา (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวกที่ 4) จำนวน 0.1 มิลลิลิตร มาบ่มกับสารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็น ที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ที่ต้องการศึกษา จำนวน 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์เดียวกัน จำนวน 0.9 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบหา

ปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์เทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีนที่มีความเข้มข้น 0 - 140 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ที่ pH ต่างๆ (ภาคผนวกที่ 1)

ส่วนการศึกษาการยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสโดย EDTA ที่ pH ต่างๆ วิธีการทดลองแสดงในภาคผนวกที่ 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย