บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 <u>เครื่องมือ</u>

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

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

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

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

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

- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) บริษัท Charles Hearson Co., Ltd.,England และบริษัท Heto Lab Equipment, Denmark

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Heraeus, Germany

- เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Hirayama Manufacturing Coorperation, Japan

- เครื่อง High Performance Liquid Chromatography บริษัท Shimadzu, Japan

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

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

- Diaflo Ultrafilter แบบ Stirred Ultrafiltration Cell 8050 บริษัท Amicon W.R Grace Corporation,U.S.A.

- คอลัมน์แก้ว 2 ชั้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ยาว 35 เซนติเมตร

- ถังปฏิกิริยาควบคุมอุณหภูมิได้ ขนาด 80 มิลลิลิตร

2.2 <u>เคมีภัณฑ์</u>

- สารเคมีจากบริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

  Aminopropyltriethoxysilane

  Glutaraldehyde

  Standard cyclodextrins

  Soluble starch (potato)

  Silica gel

  Controlled pore glass

- สารเคมีจากบริษัท BDH Laboratory Chemical Division, England

  Trichloroethylene

  Aluminium oxide

- สารเคมีจากบริษัท Aldrich Chemical Company, Inc. U.S.A.

  Activated carbon

- สารเคมีจากบริษัท Fluka A.G. Buchs S.G., Switzerland

  Soluble starch

- สารเคมีจากบริษัท J.T. Baker Chemical, U.S.A.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acetonitrile (HPLC grade)

- สารเคมีจากบริษัท Unicord ประเทศไทย

Chitosan

สารเคมีทั่วไปชนิดอื่นที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นสารเกรดวิเคราะห์ทั้งหมดจากบริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A., บริษัท Difco Laboratories, U.S.A., บริษัท BDH Laboratory Chemical division, England และบริษัท Fluka A.G. Buchs S.G., Switzerland สำหรับ แป้งข้าวเจ้า (ตราช้างสามเศียร) และแป้งข้าวโพด (ตรา Maizina) เป็นแป้งสำหรับใช้ในการประกอบอาหารซื้อจากร้านค้าทั่วไป

2.3 <u>แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง</u>

Bacillus A11 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987)

2.4 <u>การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย</u>

2.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I (Pongsawasdi และ Yagisawa,1987)

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

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 ถ้าต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเติม Bacto agar 15 กรัมต่อลิตร

2.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi (ดัดแปลงจาก Horikoshi, 1971; อุไรวรรณ รัชธร, 2536)

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

2.5 <u>การเตรียมสารละลาย</u>

2.5.1 สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

2.5.1.1 สารละลายแป้งมาตรฐาน

ละลายแป้ง (soluble starch, potato) 0.2 หรือ 2.0 หรือ 0.03 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มจนสารละลายเดือด ทิ้งให้เย็นก่อนใช้

2.5.1.2 สารละลายไอโอดีน

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

2.5.2 สารละลายสำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน

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

2.6 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

การเก็บรักษา *Bacillus* A11 ที่ใช้ในการทดลอง ให้เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I ชนิดแข็ง โดยเลี้ยงเชื้อให้เจริญเต็มที่ที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเท liquid parafilm ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ลงบน slant จนเต็มขึ้นมาประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาหลอดให้แน่นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70° ซ

2.7 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเอนไซม์ CGTase

2.7.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Start inoculum)

เขี่ยเชื้อจาก agar slant ปริมาณ 1 loop ลงบน agar plate ที่มีอาหาร เลี้ยงเชื้อ Medium I อยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ 4 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อจาก agar plate 1 loop ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I บรรจุอยู่ 20 มิลลิลิตร เขย่าที่ 37° ซ รอจนสามารถวัดความขุ่นของเซลล์ที่ 420 นาโนเมตร ได้ค่าประมาณ 0.3-0.5 หน่วย

2.7.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase

ใส่ Start inoculum ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi's medium (ที่ปรับปรุงแล้ว) 40 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ที่ 4° ซ ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แยกส่วนน้ำใสคือ สารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.8 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

2.8.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase อิสระ

2.8.1.1 Dextrinizing activity (Iodine method)

ดัดแปลงจากวิธีของ Fuwa (1954)

เติมสารละลายเอนไซม์ 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลายแป้ง (soluble starch,potato) 0.2 เปอร์เซนต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 40^{o} ซ นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์ 4 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน แล้วเติม iodine reagent 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

หลอดควบคุม (control) ให้ใส่เอนไซม์ภายหลังการเติมกรดไฮโดรคลอริก

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

2.8.1.2 Cyclodextrin - trichloroethylene assay

ดัดแปลงจากวิธีของ Nomoto และคณะ (1986)

นำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางในอัตราส่วนต่างๆ(1:2,1:4, 1:8,...) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายแป้ง (soluble starch,potato)ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน บ่มที่อุณหภูมิ 40^{o} ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเติมสารละลายไตรคลอโรเอธิลีน 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง ค้างคืนประมาณ 12 ชั่วโมง 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

2.8.1.3 Phenolpthalein assay

ดัดแปลงจากวิธีของ Steighardt (1993)

เติมสารละลายเอนไซม์ 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลายแป้ง (soluble starch,potato)2.5 เปอร์เซนต์ใน 0.067 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 45^{o} ซ นาน 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม สารละลาย phenolpthalein 7.5 X 10^{-5} โมลาร์ ในสารละลาย 6 X 10^{-3} โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต pH 10.3 ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดไซโคลเดกซ์ทริน 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที

2.8.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ตรึง

2.8.2.1 Dextrinizing activity (Iodine method)

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Fuwa (1954)

ชั่งตัวค้ำที่ตรึงเอนไซม์แล้ว 5 มิลลิกรัม (น้ำหนักเปียก) ลงในสารละลายแป้ง (soluble starch,potato) 0.03 เปอร์เซนต์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40^{o} ซ นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์ 4 มิลลิลิตร แยกตัวค้ำออก นำเฉพาะสารละลายส่วนใสไปเติม iodine reagent และปรับปริมาตรสุดท้ายเหมือนกรณีเอนไซม์อิสระ (ข้อ 2.8.1.1) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

การทำหลอดควบคุมและการกำหนดหน่วยเอนไซม์เหมือนกรณีเอนไซม์อิสระ

2.8.2.2 Phenolpthalein assay

ดัดแปลงจากวิธีของ Steighardt (1993)

ทำเหมือนกรณีเอนไซม์อิสระ (รายละเอียดในข้อ 2.8.1.3) แต่ใช้ตัวค้ำที่ตรึงเอนไซม์แล้ว 5 มิลลิกรัมแทนสารละลายเอนไซม์ 10 ไมโครลิตร

2.8.3 การวิเคราะห์ชนิดและวัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทริน ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ดัดแปลงจากวิธีของ Pongsawasdi และ Yagisawa (1987)

นำสารละลายตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรอง millipore (0.45μm) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ คอลัมน์ Supelco-NH_2 ขนาด 4.6 mm. ID x 25 cm. และใช้สารละลายผสม acetonitrile : water อัตราส่วน 75 : 25 (โดยปริมาตร) ชะด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ detector ชนิด Refractive index โดยฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของไซโคลเดกซ์ทริน ความเข้มข้นชนิดละ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิเคราะห์ชนิดของไซโคลเดกซ์ทรินในสารละลายตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) กับสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐานและหาปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินได้ จากกราฟมาตรฐานของสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินแต่ละชนิด

2.9 <u>การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford</u>

ทำตามวิธีของ Bradford (1976)

2.9.1 Protein assay (Standard method)

ใช้สำหรับวัดปริมาณโปรตีน 10-100 ไมโครกรัม

นำสารละลายเอนไซม์ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับโปรตีนรีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic 20 D ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ภายในเวลา 5-60 นาที ภายหลัง

การเติมโปรตีนรีเอเจนต์ อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานbovine serum albumin fraction v (ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร)

2.9.2 Micro protein assay

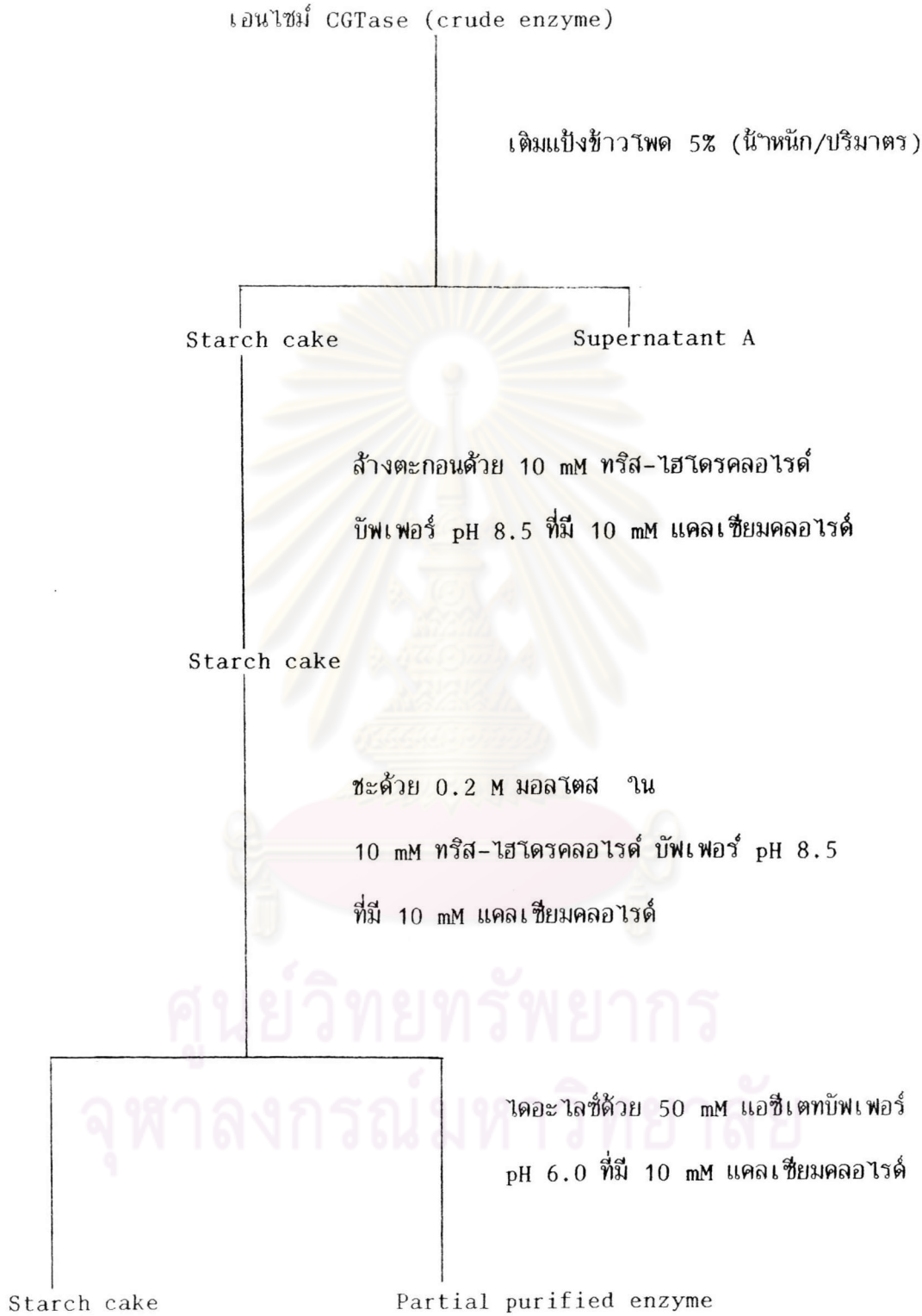
ใช้สำหรับวัดปริมาณโปรตีน 1-10 ไมโครกรัม

นำสารละลายเอนไซม์ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับโปรตีนรีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic 2000 ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ภายในเวลา 5-60 นาที ภายหลังการเติมโปรตีนรีเอเจนต์ อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin fraction v (ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร)

2.10 <u>การทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial purification)</u>

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีการของ Kato และ Horikoshi (1984) และอุไรวรรณ รัชธร (2536)

นำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยเติมแป้งข้าวโพด (ที่ผ่านการอบที่ 120° ซ นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นก่อนใช้) 5 กรัม เปอร์เซนต์ ของปริมาตรสารละลายเอนไซม์ คนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอนแป้งด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำตะกอนแป้งมาล้างด้วย 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ 2 ครั้ง แล้วชะเอนไซม์ออกจากแป้งด้วยการกวนใน สารละลาย 0.2 โมลาร์ มอลโตส ใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ปั่นแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.1 แผนภาพการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน

นาที นาน 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปไดอะไลซ์ใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4° ซ

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

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Kusano และ คณะ (1989)

2.11.1 การตรึงเอนไซม์กับตัวค้ำ ด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพ

นำตัวค้ำชนิดต่างๆได้แก่ ไคโตแซน คาร์บอน เม็ดแก้วพรุน อะลูมินา และซิลิกา โดยแปรปริมาณชนิดละ 100-300 มิลลิกรัม แต่ละชนิดใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว (แอคติวิตี 230 ยูนิต/มิลลิลิตร) 150 ยูนิต แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 2 มิลลิลิตรด้วย 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นแยกตัวค้ำออก แล้วนำมาล้างด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ 2 ครั้ง และในสารละลายเดียวกันแต่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์อีก 3 ครั้ง

2.11.2 การตรึงเอนไซม์กับตัวค้ำ ด้วยวิธีโคเวเลนต์

2.11.2.1 การเตรียมตัวค้ำ

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Leonowioz และ คณะ(1988)

นำตัวค้ำชนิดต่าง ๆได้แก่ ไคโตแซน คาร์บอน เม็ดแก้วพรุน อะลูมินา และซิลิกา ชนิดละ 300 มิลลิกรัม แต่ละชนิดนำมาเติมสารละลาย 2 เปอร์เซนต์ อะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน 20 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นแยกตัวค้ำออกแล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นนำตัวค้ำไป กวนเบาๆในสารละลาย 0.25 เปอร์เซนต์ กลูทารัลดีไฮด์ ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแยกตัวค้ำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

2.11.2.2 การตรึงเอนไซม์

นำตัวค้ำที่ได้จากการเตรียมในข้อ 2.11.2.1 แต่ละชนิดใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว (มีแอคติวิตี 230 ยูนิต/มิลลิลิตร) 150 ยูนิต แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 2 มิลลิลิตรด้วย 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มี 10mM แคลเซียมคลอไรด์ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30^{o} ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นแยกตัวค้ำออกแล้วนำมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ 2 ครั้ง และในสารละลายเดียวกันที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์อีก 3 ครั้ง

2.11.2.3 การหาอัตราส่วนของ APTS และ GLT ที่เหมาะสมในการกระตุ้นอะลูมินา

นำอะลูมินา (ซึ่งเป็นตัวค้ำที่เหมาะสมสำหรับการตรึงด้วยวิธีโคเวเลนต์ จากการทดลองข้อ 2.11.2.2) 300 มิลลิกรัม มาเติมสารละลายอะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน ที่แปรความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25-4 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร กวนเบาๆที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นแยกอะลูมินาออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปกวนเบาๆ ในสารละลาย 0.25 เปอร์เซนต์ กลูทารัลดีไฮด์ ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแยกอะลูมินามาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นนำอะลูมินาที่ได้มาตรึงเอนไซม์ CGTase ตามวิธีทดลองข้อ 2.11.2.2

2.12 <u>การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในคอลัมน์แบบต่อเนื่อง</u>

2.12.1 การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่อง

คอลัมน์ที่ใช้สำหรับผลิตไซโคลเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ตรึงนั้น เป็นคอลัมน์ 2 ชั้น ชั้นในเป็นแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.6 เซนติเมตร ความยาว 35 เซนติเมตร (รูปที่ 2.2) ชั้นนอกเป็นพลาสติกมีท่อสำหรับต่อให้น้ำไหลผ่าน โดยสามารถควบคุมอุณหภูมิ

รูปที่ 2.2 แสดงคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.6 เซนติเมตร ยาว 35 เซนติเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ของน้ำที่ใช้ได้จากเครื่องควบคุมอุณหภูมิ นำอะลูมินาซึ่งมีเอนไซม์ CGTase ตรึงอยู่ด้วยพันธะโคเวเลนต์ (ซึ่งเป็นตัวค้ำที่ตรึงเอนไซม์ได้ดีที่สุด จากการทดลองในข้อ 2.11) หนัก 50 กรัม มาบรรจุลงในคอลัมน์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 40° ซ ใช้ 1.0 % soluble starch ใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ เป็นสับสเตรท โดยมีอัตราการป้อนเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (รูปที่ 2.3) เก็บแฟรคชันที่ออกจากคอลัมน์นำไปหาปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นที่ช่วงเวลาต่าง ๆ โดยวิธี HPLC ตามวิธีทดลองข้อ 2.8.3

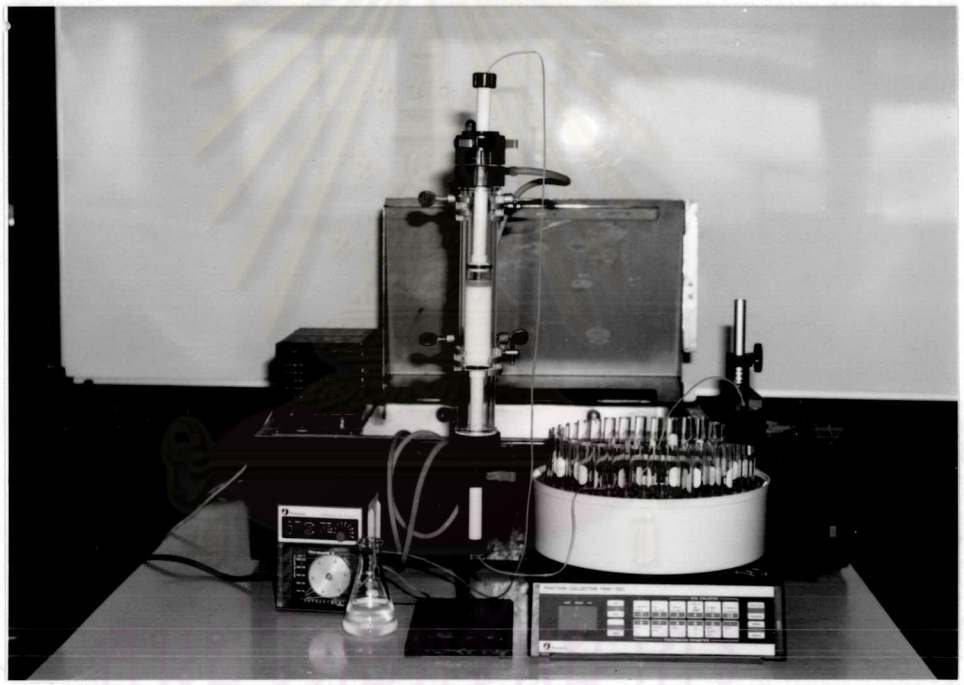
2.12.2 การหาความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่อง

นำอะลูมินาซึ่งมีเอนไซม์ CGTase ตรึงอยู่ด้วยพันธะโคเวเลนต์ หนัก 50 กรัม มาบรรจุลงในคอลัมน์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 40° ซ ใช้สารละลาย soluble starch ใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-3.0 เปอร์เซนต์เป็นสับสเตรท โดยใช้อัตราการป้อนเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บแฟรคชันที่ออกจากคอลัมน์ นำไปวัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นที่ช่วงเวลาต่างๆ โดยวิธี HPLC ตามวิธีทดลองข้อ 2.8.3

2.12.3 การหาอัตราการป้อนสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่อง

นำอะลูมินาซึ่งมีเอนไซม์ CGTase ตรึงอยู่ด้วยพันธะโคเวเลนต์ หนัก 50 กรัม มาบรรจุลงในคอลัมน์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 40° ซ ใช้ soluble starch ใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์ เป็นสับสเตรท โดยใช้อัตราการป้อนสับสเตรท ตั้งแต่ 3-7 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บแฟรคชันที่ออกจากคอลัมน์ นำไปหาปริมาณไซโคลเดกซ์ทริน ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่างๆ โดยวิธี HPLC ตามวิธีทดลองข้อ 2.8.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 แสดงการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในคอลัมน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.13 การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาแบบกวน (stirrer tank)แบบไม่ต่อเนื่อง

2.13.1 การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบไม่ต่อเนื่อง

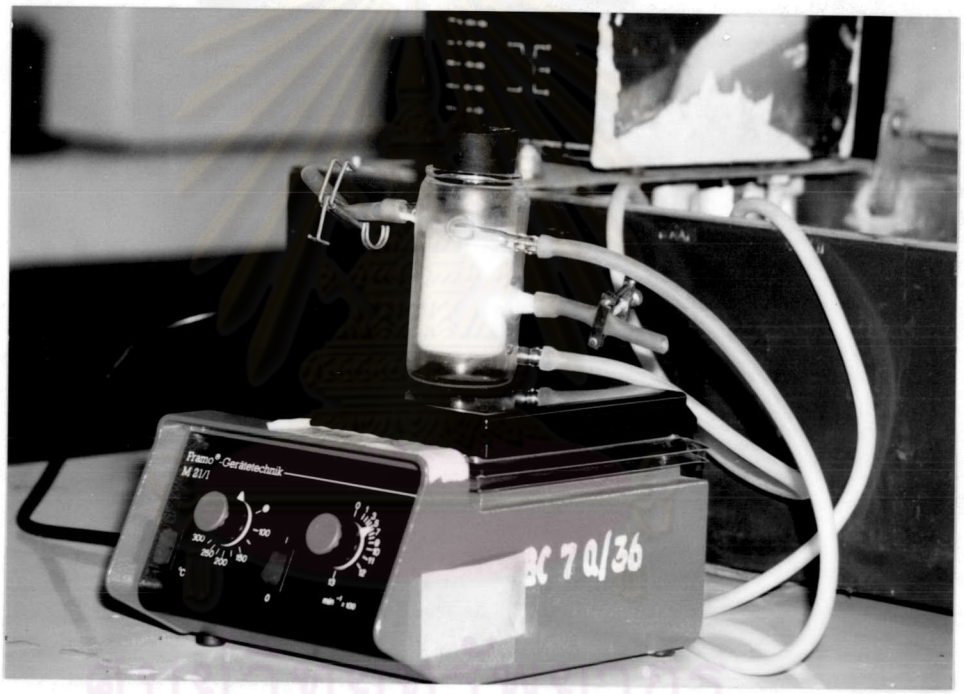
ทำการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบไม่ต่อเนื่องในถังปฏิกิริยาซึ่งทำด้วยแก้วรูปทรงกระบอก 2 ชั้น ชั้นในมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.7 เซนติเมตร สูง 8 เซนติเมตร ปริมาตร 80 มิลลิเมตร ภาชนะแก้วด้านนอกมีท่อสำหรับต่อน้ำควบคุมอุณหภูมิ(รูปที่ 2.4) ทำการกวนสารในถังปฏิกิริยาด้วยแท่งแม่เหล็กบนเครื่องกวนแม่เหล็ก (รูปที่ 2.5)โดยนำอะลูมินาซึ่งมีเอนไซม์ CGTase ตรึงอยู่ด้วยพันธะโคเวเลนต์หนัก 30 กรัม ผสมกับ 1.5 % soluble starch ใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ บรรจุลงในถังปฏิกิริยา และกวนให้ตัวค้ำมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ ควบคุมอุณหภูมิที่ 40^{o} ซ วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทริน ที่เกิดขึ้นในถังปฏิกิริยาที่ช่วงเวลาต่างๆ โดยวิธี HPLC ตามวิธีทดลองข้อ 2.8.3

2.13.2 การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาซ้ำหลายๆครั้ง

บ่มอะลูมินาซึ่งมีเอนไซม์ CGTase ตรึงอยู่ด้วยพันธะโคเวเลนต์ หนัก 30 กรัม กับ 1.5 % soluble starch ใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 40^{o} ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยให้ตัวค้ำมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ เมื่อครบเวลา 12 ชั่วโมงแล้ว วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นด้วยวิธี HPLC ตามวิธีทดลองข้อ 2.8.3 และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึง ตามวิธีทดลองข้อ 2.8.2.1 จากนั้นนำเอนไซม์ตรึงมาล้างด้วย 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ 3 ครั้ง แล้วนำไปผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดยใช้สภาวะเดิมอีก 9 ครั้ง และวัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทริน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงภายหลังการใช้งานแต่ละครั้ง

รูปที่ 2.4 แสดงถังปฏิกิริยากวนขนาด 80 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.5 แสดงการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาแบบกวน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย