บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P Satorius,USA
2. เครื่องชั่ง รุ่น AG 204 Mettler Toledo,Switzerland
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 บริษัท Eutech Cybermetics,Singapore
4. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seico,Ltd.,Japan
5. ตู้เขี่ยเชื้อ Laminar flow ISSCO รุ่น BV-124 ,USA
6. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunwick Scientific Co.,Inc.,Edison,N.J.,USA
7. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น UNILUX-12 บริษัท Kyowa, Tokyo, Japan
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (Refrigirate centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (Refrigirate centrifuge) รุ่น J-30I บริษัท Beckman, Germany
10. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, USA
11. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Uitrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS 4000 บริษัท Decan Unitrasonic, Englang
12. เครื่องผสมสาร (mixer) รุ่น Vortex-genies 2 G560E บริษัท Scientific Industries Inc.,USA
13. เครื่องวัดการดูดกลืนแส ง(spectropthometer) รุ่น Spectronic 401 บริษัท Milton Roy Co.,USA
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Temppet บริษัท T – 20 Tokyo Rikakikai Co.,Ltd,Japan
15. เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (Freeze dryer) รุ่น FD-1 บริษัท EYELA TOKYO RIKAKKAI CO., LTD.

เคมีภัณฑ์

1. เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม บริษัท Sigma Chemical Co., USA
2. เดกซ์แทรน ที – 2000 บริษัท Pharmacia, Sweden
3. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
4. ทวีน-80 BDH Chemical Ltd., ENgland
5. โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) Sigma Chemical Co.,USA
6. โซเดียมอะซีเตต บริษัท Sigma, USA
7. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo Erba Regenti,Italy
8. เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) บริษัท Unilab, USA
9. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
11. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) บริษัท Merck, Germany
12. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
13. โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) บริษัท Fluka, Germany
14. ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
15. กลูโคส (Glucose) บริษัท Sigma, USA
16. แลคโทส (Lactose) บริษัท Sigma, USA
17. ซูโครส (Sucrose) บริษัท Sigma, USA
18. มอลโทส (Maltose) บริษัท Sigma, USA
19. กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Merck, Germany
20. ซอร์บิทอล (Sorbitol) บริษัท Sigma, USA
21. แมนนิทอล (Mannitol) บริษัท Sigma, USA
22. ไอโนซิทอล (Inositol) บริษัท Sigma, USA
23. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
24. โปแตทเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Carlo Erba Regenti,Italy
25. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) บริษัท Merck, Germany
26. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl_2) บริษัท Merck, Germany
27. กรดเบนโซอิก (Benzoic acid) บริษัท Merck, Germany
28. กรดซิตริก (Citric acid) บริษัท Merck, Germany
29. กรดซอร์บิก (Sorbic acid) บริษัท Sigma, USA

30. กรดซาลิไซลิก (Salicylic acid) บริษัท Sigma, USA

31. เมทานอล (Methanol) บริษัท Merck, Germany

32. อะซีโตน (Acetone) บริษัท Merck, Germany

33. เอทานอล (Ethanol) บริษัท Labscan, Ireland

34. กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) บริษัท Merck, Germany

35. เซลลูโลส (Cellulose) บริษัท Sigma, USA

36. ไคโตซาน (Chitasan) บริษัท Sigma, USA

37. นมผงพร่องมันเนย (skimmilk) บริษัท Difco Laboratories, USA

39. แอมโมเนียมซัลเฟต (NH_2SO_4) บริษัท Sigma, USA

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเลี้ยงและการเก็บจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

รา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เป็นเชื้อที่ทำให้กลายพันธุ์ โดย สุวรรณา นพพรพันธุ์ (2538) จาก รา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่คัดแยกโดย เอก แสงวิเชียร (2531) มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

3.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.2.1 การเก็บเชื้อในระยะสั้น

เขี่ยสปอร์ของรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ลงบนอาหารแข็งเอียงตามสูตรที่ปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ (1971) ที่มีเดกซ์แทรนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จนสปอร์เจริญเต็มที่ เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.1.2.2 การเก็บเชื้อในระยะยาว

เก็บสปอร์ของราโดยการไลโอฟิไลซ์

3.2 การเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทรงกรวยเพื่อเตรียมเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14

เติมทวีน-80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเก็บเชื้อราจากข้อ 3.1.2.1 ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาแขวนลอยในทวีน-80 นับสปอร์ให้อยู่ในช่วง $2x10^7$ สปอร์ต่อมล.โดยใช้ ฮีมาไซโทมิเตอร์ ถ่ายสปอร์แขวนลอย 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงโดยศิโรจน์ ครีสรากรณ์ (2547) ความเป็นกรดเบส 4.5 ปริมาตร 50 มล.ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล.บ่มด้วยเครื่องเขย่าอัตรา 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10

I 27591588

วัน แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ส่วนน้ำใส นำมาวิเคราะห์แอคติวิตีและปริมาณโปรตีน คำนวณแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสจากรา

3.3 การตรวจสอบแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส โดยทำตามวิธีของ Fukumoto และคณะ (1971) ดังนี้ นำสารละลายเดกซ์แทรน T-2000 ความเข้มข้น 0.625% ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 4.5 ปริมาตร 0.4 มล. และสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 4.5 ปริมาตร 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 0.1 มล. แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 15 นาที นำไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาโดยวิธีของ Somogyi (1952)

1 หน่วย (Unit) ของเดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรน ที-2000 และปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

การเตรียมซับสเตรต โดยชั่งเดกซ์แทรน ที-2000 น้ำหนัก 0.625 กรัม ละลายในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 4.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดเตรียมสาร

3.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi (1952)

โดยนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 1 มล. เติมสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ปริมาตร 1 มล. นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วเติมสารละลายเนลสัน ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำปลอดประจุ 5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากกราฟมาตรฐานที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0 - 200 ไมโครกรัมต่อมล.

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1951)

โดยนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มล. เติมสารละลายผสม Lowry C ปริมาณ 5 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที จึงเติมสารละลาย Lowry D ปริมาตร 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีน จากกราฟมาตรฐานที่ใช้โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 0 - 200 ไมโครกรัมต่อมล.

3.6 การตรวจสอบโปรติเอสในสารละลายเอนไซม์

นำส่วนน้ำใสของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.2 มาหยดลงบนจานวุ้นที่ผสมนมผงพร่องมันเนย ที่เจาะให้มีรูตรงกลางจาน จากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิห้อง, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการทำงานของโปรติเอสโดยดูจากวงกลมใสที่เกิดขึ้น

3.7 การศึกษาความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

บ่มเดกซ์แทรนเนสกับบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดเบสในช่วงต่างๆ ดังนี้

อะซิเตตบัฟเฟอร์ในช่วงความเป็นกรดเบส 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วงความเป็นกรดเบส 6.0, 6.5 และ 7.0

บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 – 30 องศาเซลเซียส) และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีที่คงเหลืออยู่ตลอดช่วงการเก็บ

3.8 การทำเดกซ์แทรนเนสให้เข้มข้น

3.8.1 การหาสารเคมีที่เหมาะสมในการตกตะกอนเดกซ์แทรนเนส

เปรียบเทียบการตกตะกอนเดกซ์แทรนเนสด้วยสารเคมีต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต อะซีโตน และเอทานอล จากนั้นตรวจสอบแอคติวิตีที่เหลืออยู่ของเดกซ์แทรนเนสเพื่อคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตกตะกอนเดกซแทรนเนสเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.8.1.1 การทำเดกซ์แทรนเนสให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายของเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนอย่างช้าๆ ด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด ที่ความเข้มข้น 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) กวนสารแขวนลอยในเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอนออกจากส่วนน้ำใสด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้จากข้อ 3.7 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยใช้ปริมาณน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด นำไปไดแอไลซ์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอน วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

3.8.1.2 การทำเดกซ์แทรนเนสให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยอะซีโตน

นำสารละลายของเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยอะซีโตนที่เย็นจัดโดยค่อยๆเติมอะซีโตนอย่างช้าๆ ที่ความเข้มข้น 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พร้อมทั้งกวนเบาๆด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก จากนั้นนำสารแขวนลอยไปปั่นแยกตะกอนออกจากส่วนน้ำใสด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นำตะกอนที่ได้มาตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งจนกว่าอะซีโตนจะระเหยหมด หรือนำไประเหยอะซีโตนโดยใช้เครื่องปั่นสุญญากาศ (speed vacuum) จากนั้นละลายตะกอนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้จากข้อ 3.7 ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยใช้ปริมาณน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอน วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

3.8.1.3 การทำเดกซ์แทรนเนสให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล

นำสารละลายของเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอลที่เย็นจัดโดยค่อยๆ เติมเอทานอลอย่างช้าๆ ที่ความเข้มข้น 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก จากนั้นนำสารแขวนลอยไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเพื่อแยกตะกอนออกจากส่วนน้ำใสด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นำตะกอนที่ได้มาตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งจนกว่าเอทานอลจะระเหยหมด หรือนำไประเหยเอทานอลโดยใช้เครื่องปั่นสุญญากาศ (speed vacuum) จากนั้นละลายตะกอนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้จาก

ข้อ 3.7 ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยใช้ปริมาณน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอน วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

3.8.2 การตกตะกอนเดกซ์แทรนเนสเพื่อทำให้เดกซ์แทรนเนสเข้มข้น

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยสารที่เหมาะสม ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.7.1 จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาตรโดยการละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้ข้อ 3.7 ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ให้มีโปรตีนเริ่มต้นประมาณ 5 มก.ต่อมล.จากนั้นเติมโซเดียมเอไซด์ให้ได้ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ เพื่อเตรียมไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.9 เปรียบเทียบผลการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนสในรูปเอนไซม์หยาบกับเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอน

นำเดกซ์แทรนเนสหยาบกับเดกซ์แทรนเนสเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.8 มาเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดแอคติวิตีที่คงเหลืออยู่ตลอดช่วงการเก็บ

3.10 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

นำเดกซ์แทรนเนสเข้มข้นมาใส่ในหลอดเอฟเพนดอร์ฟ หลอดละ 0.5 มล. จากนั้นทำการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เก็บดังนี้ อุณหภูมิห้อง (28 – 30 องศาเซลเซียส), 4, -20 และ -70 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีที่คงเหลืออยู่ตลอดช่วงการเก็บ โดยการวิเคราะห์ภายใต้ภาวะมาตรฐาน

3.11 ผลของกลีเซอรอลและซอร์บิทอลที่มีต่อการเก็บเดกซ์แทรนเนสที่ -20 และ -70 องศาเซลเซียส

นำเดกซ์แทรนเนสเข้มข้นมาเติมกลีเซอรอลและซอร์บิทอลให้มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเอนไซม์ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 และ -70 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีที่คงเหลืออยู่ตลอดช่วงการเก็บ โดยการวิเคราะห์ภายใต้ภาวะมาตรฐาน

3.12 การคัดเลือกหาสารเติมแต่งที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

3.12.1 ทำการคัดเลือกหาสารเติมแต่งที่ใช้ในการเก็บรักษาเอนไซม์ตามที่มีการรายงานไว้ โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

3.12.1.1 น้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส แลคโทส ซูโครส และมอลโทส

3.12.1.2 พอลิออล ได้แก่ กลีเซอรอล ซอร์บิทอล แมนนิทอล และไอโนซิทอล

3.12.1.3 เกลือ ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ โปแตสเซียมคลอไรด์ โซเดียมซัลเฟต และแอมโมเนียมซัลเฟต

3.12.1.4 กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดเบนโซอิก กรดซิตริก กรดซอร์บิกและกรดซาลิไซลิก

3.12.1.5 ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เมทานอล อะซีโตน

3.12.1.6 สารไบฟังก์ชันนัล ได้แก่ กลูตารัลดีไฮด์

3.12.1.7 สารประเภทพอลิเมอร์ต่างๆ ได้แก่ เดกซ์แทรน เซลลูโลส และไคโตซาน

บ่มเดกซ์แทรนเนสร่วมกับการเติมสารทดสอบในกลุ่มต่างๆโดยทำการเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีที่คงเหลืออยู่ตลอดช่วงการเก็บ

3.12.2 การหาความเข้มข้นของสารเติมแต่งที่เหมาะสม

เมื่อได้สารที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.1 ในการเก็บเดกซ์แทรนเนสแล้ว จากนั้นทำการทดลองแปรผันความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด เพื่อหาความเข้มข้นของสารเติมแต่งที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์

3.13 การเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนสโดยการไลโอฟิไลซ์

3.13.1 เตรียมตัวอย่างโดยนำเดกซ์แทรนเนสหยาบไปแช่แข็ง จากนั้นนำตัวอย่างแข็งที่ได้มาทำให้แห้งด้วยเครื่องไลโอฟิไลเซอร์ ตรวจสอบแอคติวิตีหลังการทำแห้ง แล้วนำตัวอย่างเอนไซม์แห้งที่ได้มาเก็บที่ อุณหภูมิห้อง, 4 และ -20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลืออยู่ของเอนไซม์ตลอดช่วงการเก็บ

3.13.2 ผลของสารบางชนิดที่มีต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ในระหว่างการไลโอฟิไลซ์

3.13.2.1 ทำการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 3.13.1 โดยมีการเติม กลีเซอรอล ซอร์บิทอล แมนนิทอล ไอโนซิทอล นมผงพร่องมันเนย แอมโมเนียมซัลเฟต มอลโทส และแลคโทส ตามลำดับ จากนั้นเมื่อผ่านการไลโอฟิไลซ์แล้วเก็บตัวอย่างในถุงสุญญากาศที่มีซิลิกาเจล เพื่อดูดความชื้น แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ -20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ตลอดช่วงการเก็บ

3.13.2.2 ทำการแปรผันความเข้มข้นสารเติมแต่ง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเก็บเดกซ์แทรนเนสด้วยการไลโอฟิไลซ์

3.14 การศึกษาสมบัติของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการที่เหมาะสมที่สุดจากผลการทดลองที่ผ่านมาเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ

3.14.1 ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บรักษาเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ

วิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บ และ เดกซ์แทรนเนสหยาบ ตามวิธีการวิจัยในข้อ 3.3 ในสารผสมของปฏิกิริยาที่แปรผันความเป็นกรดเบสในช่วงต่างๆ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ของ

ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดเบส 2.5 – 3.5
โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดเบส 3.5 – 6.0
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดเบส 6.0 – 7.0

เปรียบเทียบช่วงความเป็นกรดเบสที่เดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบแสดงแอคติวิตี โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับค่าความเป็นกรดเบสของสารผสมปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีสูงสุดของแต่ละการทดลอง)

3.14.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บรักษาเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ

วิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบตามวิธีการวิจัยในข้อ 3.3 ในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมจากข้อ 3.14.1 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบแสดงแอคติวิตี โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับค่าความเป็นกรดเบสของสารผสมปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีสูงสุดของแต่ละการทดลอง)

3.14.3 ความเสถียรต่อความเป็นกรดเบสของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บรักษาเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ

บ่มเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บ และ เดกซ์แทรนเนสหยาบ ในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีความเป็นกรดเบสในช่วงต่างๆ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ของ

ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดเบส 2.5 – 3.5

โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดเบส 3.5 – 6.0

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดเบส 6.0 – 7.0

บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดแอคติวิตีภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

เปรียบเทียบช่วงความเป็นกรดเบสที่เดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบ แสดงแอคติวิตี โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับค่าความเป็นกรดเบสของสารผสมปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่ม)

3.14.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บรักษาเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ

บ่มเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมจากข้อ 3.14.1 ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดแอคติวิตีภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบ แสดงแอคติวิตี โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับค่าความเป็นกรดเบสของสารผสมปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่ม)

3.14.5 การหาค่าความจำเพาะต่อซับสเตรต (K_m) เดกซ์แทรน ที-2000 ของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ

บ่มเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บ และเดกซ์แทรนเนสหยาบในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมจากข้อ 3.14.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรน ที-2000 ตั้งแต่ 0.15625 – 2.5 % (0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25 และ 2.5 % ตามลำดับ) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟในรูปของไลน์ วีเวอร์เบิร์กระหว่าง 1/V และ 1/[S] หาจุดแกน X นำค่าไปคำนวณเพื่อหาค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบ