บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-10 แบบ Rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., U.S.A.

1.2 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น 340 ของบริษัท Sequoia-Turner Co.,U.S.A.

1.3 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)รุ่น ϕ 70 ของบริษัท Beckman, U.S.A.

1.4 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W 760 ของบริษัท Memmert, Germany

1.5 เครื่องปั่นผสม (Vortex) รุ่น Vortex-Genie 2 ของบริษัท Scientific Industries, Inc., U.S.A.

1.6 คาร์บอนกัมมันต์ (Activated carbon) ของบริษัท Aquachem Co., Thailand (ภาคผนวก ง-1)

1.7 ทรายแม่น้ำ (River-bed sand)(ภาคผนวก ง-1)

1.8 เม็ดแก้ว (Glass bead)(ภาคผนวก ง-1)

1.9 ตะแกรงร่อน แบบ Laboratory test sieve mesh No.8-20 ของบริษัท Endecotts Ltd., England

2. เคมีภัณฑ์

2.1 เดกซ์แทรนชนิดอุตสาหกรรม (Dextran industrial Grade) ของบริษัท Sigma, St.Louis, U.S.A.

2.2 เดกซ์แทรน ที 2000 (Dextran T 2000) ของบริษัท Phamacia Fine Chemicals, Sweden

2.3 ไซยาโนเจนโบรไมด์ (Cyanogen bromide) ของบริษัท Fluka AG. Buchs, Switzerland

2.4 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอททอกซีไซเลน (3-Aminopropyltriethoxysilane) ของบริษัท Sigma, St.Louis, U.S.A.

2.5 กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde 50% in water) ของบริษัท Fluka AG. Buchs, Switzerland

2.6 โฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

2.7 คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate 5-hydrate) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

2.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

2.9 โซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตรท (Sodium potassium tartrate) ของบริษัท Fluka AG. Buchs, Switzerland

2.10 อัลบูมิน (Fraction V, 96-99 % albumin , bovine) ของบริษัท Sigma, St.Louis, U.S.A.

2.11 ทวีน 80 (Tween 80) ของบริษัท BDH Chemicals Ltd., Poole, England

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61

ในการวิจัยนี้ใช้เชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำการคัดเลือกโดย เอก แสงวิเชียร (8) มีความสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้สูงสุด คือ 25 หน่วยต่อมล.น้ำเลี้ยงเชื้อ ปริมาณโปรตีน 0.5 มก.ต่อมล.น้ำเลี้ยงเชื้อ แอคติวิตีจำเพาะ 50 หน่วย/มก.โปรตีน

การเตรียมเดกซ์แทรนเนสนั้นเริ่มโดยการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. ซึ่งทำได้โดย เตรียมสปอร์แขวนลอยในน้ำ (spore suspension) โดยใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผสม 0.1 % ของทวีน 80 ในหลอดเก็บเชื้อ (stock culture) อายุประมาณ 5-7 วัน ใช้ลูป(loop)เขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาอยู่ในน้ำ นับสปอร์เริ่มต้นให้ได้ประมาณ $2x10^7$ สปอร์ต่อมล. โดยใช้อีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) (ภาคผนวก ค) ถ่าย 1 มล.ของสปอร์แขวนลอยลงใน 50 มล.ของอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหารของ Fukumoto และคณะ (22) (ภาคผนวก ก-1) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญและผลิตเดกซ์แทรนเนส แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 หรืออาจปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที ส่วนน้ำใสที่ได้ จะมีเดกซ์แทรนเนสที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude dextranase) อยู่ด้วย นำส่วนนี้มาตรวจสอบแอคติวิตีตามวิธีในข้อ 4 และนำไปใช้สำหรับการตกตะกอนเอนไซม์ต่อไป โดยเก็บเดกซ์แทรนเนสในสภาพแช่แข็ง (frozen state) เมื่อต้องการใช้นำมาละลาย (thawing) ซึ่งวิธีนี้จะสูญเสียแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเพียงเล็กน้อย โดยการทำแต่ละครั้งเอนไซม์จะมีแอคติวิตีจำเพาะใกล้เคียงกัน

3.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา

ใช้วิธีของ Fukumoto และคณะ (22) โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 1 มล. ซึ่งประกอบด้วย 0.4 มล. ของสารละลายเดกซ์แทรน ที 2000 ความเข้มข้น 0.625% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.5 น้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งผ่านการแยกเซลล์ออกไปแล้ว 0.1 มล. และอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.5 มล. บ่มสับสเตรทกับบัฟเฟอร์ก่อนจนอุณหภูมิได้ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้เวลาประมาณ 5 นาที แล้วจึงเติมเอนไซม์ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (65,66)

1 หน่วย (unit) ของเดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรน ที 2000 แล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะทดสอบ

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(Somogyi-Nelson)

นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปริมาตร 1 มล.เติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์รีเอเจนท์ (ภาคผนวก ก-2) 1 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็นจัดแล้วเติมเนลสันรีเอเจนท์ (ภาคผนวก ก-2) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำ 5 มล.ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน

สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมล. และใช้น้ำปลอดประจุเป็นตัวเปรียบเทียบ(blank) ดำเนินการเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น (ใช้สารละลายกลูโคสแทนสารละลายตัวอย่าง)สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ตามวิธีการของ Lowry และคณะ (67) นำสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์มาเติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ก-3) 5 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาที เติมสารละลายผสม Lowry D (ภาคผนวก ก-3) 0.5 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาปริมาณของโปรตีน โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน ที่สร้างขึ้นจากโบวินซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมล.

3.5 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสในงานวิจัยนี้ เป็นการเชื่อมเอนไซม์กับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนท์ ซึ่งในการทดลองประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. กระตุ้นตัวพยุงโดยสารกระตุ้น โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างสารกระตุ้น 2 ชนิด คือ 3 อะมิโนโพรพิลไทรเอททอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTS) และ ไซยาโนเจนโบรไมด์ (cyanogen bromide , CNBr)

2. สร้างพันธะร่วมโดยกลูตารัลดีไฮด์

3. ตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส โดยใช้เดกซ์แทรนเนสที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude dextranase)

วิธีเตรียม

3.5.1 การเตรียมตัวพยุง

การเตรียมตัวพยุงเพื่อใช้ในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ตัวพยุง 3 ชนิด คือ

1. คาร์บอนกัมมันต์ ขนาด 8-16 เมช
2. ทราย ขนาด 16-20 เมช
3. เม็ดแก้ว ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร

ก่อนนำไปใช้ นำตัวพยุงแต่ละชนิดต้มกับกรดไนตริก ความเข้มข้น 10 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนมา ล้างกรดออกด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บไว้ในขวดแก้วสะอาดปิดฝาสนิท

3.5.2 การเตรียมสารละลายของสารกระตุ้นและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

3.5.2.1 สารละลาย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอททอกซีไซเลน(APTS)

เตรียมสารละลาย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอททอกซีไซเลนในน้ำปลอดประจุให้มีความเข้มข้นเป็น 1% โดยปริมาตร สารละลาย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอททอกซีไซเลนนี้จะทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นตัวพยุง ในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูป

3.5.2.2 สารละลายไซยาโนเจนโบรไมด์ (CNBr)

เตรียมสารละลายไซยาโนเจนโบรไมด์ในน้ำปลอดประจุ ให้มีความเข้มข้นเป็น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สารละลายไซยาโนเจนโบรไมด์นี้จะทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นตัวพยุง ในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูป

3.5.2.3 สารละลายกลูตารัลดีไฮด์

เตรียมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ในน้ำปลอดประจุ ให้มีความเข้มข้นที่ใช้ คือ 2.5% โดยปริมาตร สารละลายนี้จะทำหน้าที่เป็นสารสร้างพันธะร่วมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูป

3.5.3 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปโดยใช้ APTS ร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์

บรรจุตัวพยุงที่จะใช้ในการตริงรูป 5 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง ลงในขวดแก้วทรงกรวย เติม 20 มล.ของสารละลายสารกระตุ้น APTS 1 % โดยปริมาตร pH 6 ในอัตราส่วน ตัวพยุง: APTS 1:4 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างตัวพยุงที่ผ่านการกระตุ้นแล้วด้วยน้ำปลอดประจุ 4 ครั้ง เติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ที่จะเป็นสารสร้างพันธะร่วม 2.5% โดยปริมาตร pH 6 นำไปเขย่าที่ภาวะเดิม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างตัวพยุงด้วยน้ำปลอดประจุ 4 ครั้ง จากนั้นเติม 20 มล.ของเดกซ์แทรนเนสที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude dextranase) ที่มีแอคติวิตีจำเพาะ 50 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นำไปเขย่าที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างตัวพยุงด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.5 4 ครั้ง หรือจนกระทั่งพบว่าในน้ำล้างไม่มีแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเหลืออยู่ ขั้นตอนต่างๆ แสดงด้วยภาพดังรูปที่ 8 จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทนเนสและปริมาณโปรตีนตริง ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ และคำนวณเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักไว้ (% activity retained) โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่เหลือภายหลังการตริงรูปรวมกับน้ำล้างมาหาแอคติวิตี แล้วนำมาหักออกจากแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ

$$\text{เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักไว้ (\% activity retained)} = \frac{\text{AD ก่อนใช้ตริงรูป} - (\text{AD หลังตริงรูป+น้ำล้าง})}{\text{AD ก่อนใช้ตริงรูป}} \times 100$$

หมายเหตุ AD คือ แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ

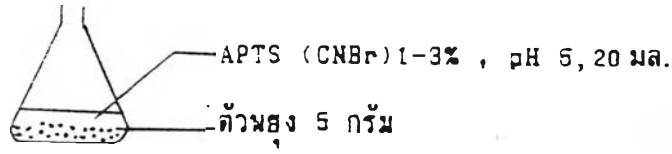
3.5.4 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปโดยใช้ CNBr ร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์

บรรจุตัวพยุงที่จะใช้ในการตริงรูป 5 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง ลงในขวดแก้วทรงกรวย เติม 20 มล.ของสารละลายสารกระตุ้น CNBr 1 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร pH 6 ในอัตราส่วน ตัวพยุง: CNBr 1:4 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างตัวพยุงที่ผ่านการกระตุ้นแล้วด้วยน้ำปลอดประจุ 4 ครั้ง เติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ที่จะเป็นสารสร้างพันธะร่วม 2.5% โดยปริมาตร pH 6 นำไปเขย่าที่ภาวะเดิม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างตัวพยุงด้วยน้ำปลอดประจุ 4 ครั้ง จากนั้นเติม 20 มล.ของเดกซ์แทรนเนสที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude dextranase) ที่มีแอคติวิตีจำเพาะ 50 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นำไปเขย่าที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างตัวพยุงด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.5 4 ครั้ง หรือจนกระทั่งพบว่าในน้ำล้างไม่มีแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเหลืออยู่ ขั้นตอนต่างๆ แสดงด้วยภาพดังรูปที่ 8 จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทนเนสและปริมาณโปรตีนตริง ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ และคำนวณเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักไว้ (% activity retained) โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่เหลือภายหลังการตริงรูปรวมกับน้ำล้างมาหาแอคติวิตี แล้วนำมาหักออกจากแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ

$$\text{เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักไว้ (\% activity retained)} = \frac{\text{AD ก่อนใช้ตริงรูป} - (\text{AD หลังตริงรูป+น้ำล้าง})}{\text{AD ก่อนใช้ตริงรูป}} \times 100$$

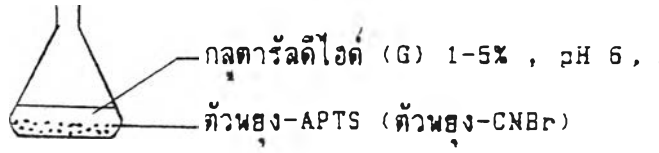
หมายเหตุ AD คือ แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ

I 1807991X



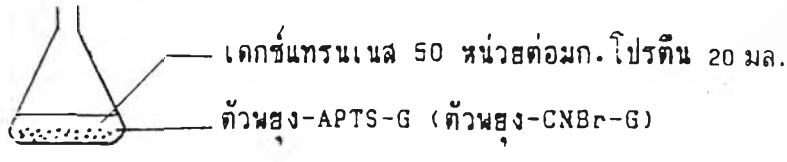
เขย่าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ล้างด้วยน้ำปลอดประจุ 4 ครั้ง



เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ล้างด้วยน้ำปลอดประจุ 4 ครั้ง



เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 4 ครั้ง

เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

รูปที่ 8 แผนผังแสดงขั้นตอนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป
แบบเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนท์

3.6 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตริงรูป

โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการหาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระเล็กน้อย โดยบ่ม 0.5 มล. ของอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.5 และ 0.4 มล.ของสารละลายเดกซ์แทรน ที 2000 ความเข้มข้น 0.625 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่ละลายในอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.5 จนได้อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้เวลาประมาณ 5 นาที ชั่งเดกซ์แทรนเนสตริงรูป 100 มก.ใส่ลงไปในสารละลายที่บ่มไว้ เขย่าด้วยเครื่องปั่นผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ระหว่างที่บ่มคอยเขย่าอยู่เสมอ หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใสนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (65,66) ซึ่งสารละลายส่วนใสนี้จะต้องปรับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลให้เหมาะสมก่อนนำไปวิเคราะห์

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตริงรูป

ใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแบบวิธีทางอ้อม(Indirect Method)โดยวิเคราะห์ จากผลต่างของปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่เริ่มต้นก่อนทำปฏิกิริยากับปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยารวมกับน้ำล้าง โดยวิเคราะห์ตามวิธีของ Lowry และคณะ (67) เช่นเดียวกับวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.4

3.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนคาร์บอนกัมมันต์

สืบเนื่องจากการที่พบว่าคาร์บอนกัมมันต์ เป็นตัวพยุงที่มีคุณสมบัติที่เอนไซม์สามารถยึดติดได้เหมาะสมที่สุด และให้แอคติวิตีจำเพาะที่สูง ในกระบวนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ดังนั้น จึงทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสกับคาร์บอนกัมมันต์ดังต่อไป

3.8.1 ทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลาย APTS และ กลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ3.5.3 โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล 3x3 (Factorial completely randomized design) ซึ่งแปรระดับความเข้มข้นของสารละลาย APTS 3 ระดับ คือ 1% , 2% และ 3% โดยปริมาตร และความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 3 ระดับ คือ 1% , 2.5% และ 5 % โดยปริมาตร โดยให้ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่ใช้คงที่คือ 50 หน่วยต่อมก.โปรตีน วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ เลือกความเข้มข้นของสารละลาย APTS และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้แบบสุ่มตลอดและทำ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.8.2 ทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และ กลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูป

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ3.5.4 โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล 3x3 (Factorial completely randomized design) ซึ่งแปรระดับความเข้มข้นของสารละลาย CNBr 3 ระดับ คือ 1% , 2% และ 3% โดยปริมาตร และความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 3 ระดับ คือ 1% , 2.5% และ 5 % โดยปริมาตร โดยให้ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่ใช้คงที่ คือ 50 หน่วยต่อมก.โปรตีน วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่เตรียมได้ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ เลือกความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม สำหรับการตริงรูปเดกซ์แทรนเนสโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้แบบสุ่มตลอดและทำ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.8.3 ทดสอบความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมในการตริงรูปเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ภาวะที่มีสารละลาย APTS 2% ร่วมกับสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% และภาวะที่มีสารละลายCNBr 3% ร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ 2.5%

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปทั้งในภาวะที่ใช้สารละลาย APTS และสารละลาย CNBr เป็นสารกระตุ้น โดยแปรความเข้มข้นของโปรตีนเอนไซม์ที่ใช้ตั้งแต่ 4-20 มก.ในปริมาณเอนไซม์ 20 มล.(10-50 หน่วยต่อมล.) วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตริงรูป แล้วคำนวนหาเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักไว้ (% activity retained) โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่เหลือภายหลังการตริงรูปรวมกับน้ำล้างมาหาแอคติวิตี แล้วนำมาหักออกจากแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักไว้ (\% activity retained)} = \frac{\text{AD ก่อนใช้ตริงรูป} - (\text{AD หลังตริงรูป} + \text{น้ำล้าง}) \times 100}{\text{AD ก่อนใช้ตริงรูป}}$$

หมายเหตุ AD คือแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ

เลือกความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปทั้งภาวะที่มีสารละลาย APTS 2% ร่วมกับสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% และภาวะที่มีสารละลาย CNBr 3% ร่วมกับสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% โดยพิจารณาจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส กับ %โปรตีนที่ถูกไว้ %แอคติวิตีที่ถูกไว้ และแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูป

3.8.4 ทดสอบหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ภาวะที่มีสารละลาย APTS 2% ร่วมกับสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% และภาวะที่มีสารละลาย CNBr 3% ร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ 2.5%

จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.1-3.8.3 จะได้ภาวะความเข้มข้นของสารกระตุ้น สารสร้างพันธะร่วมและความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป นำภาวะที่ได้มาใช้ในการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูป ตามรูปที่ 8 โดยใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่างต่างๆกัน คือ

อะซีเตทบัฟเฟอร์ ในช่วง pH 4.0-5.5

ซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วง pH 5.5-7.0

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วง pH 7.0-8.0

เป็นตัวทำละลายของ APTS หรือ CNBr และกลูตารัลดีไฮด์ รวมทั้งแทนน้ำปลอดประจุภาคที่ใช้ล้างในแต่ละขั้นตอนด้วย วัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.6

เลือกภาวะของความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม ต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปทั้งภาวะที่มีสารละลายAPTS 2% ร่วมกับสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% และภาวะที่มีสารละลาย CNBr 3% ร่วมกับสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับแอคติวิตีจำเพาะ

3.3.5 <u>ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสม ในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูป</u>

การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

ก. กระตุ้นตัวพยุงโดยสารกระตุ้น (APTS หรือ CNBr)

ข. สร้างพันธะร่วมโดยกลูตารัลดีไฮด์

ค. ตริงรูปเดกซ์แทรนเนส

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูป ตามรูปที่ 6 โดยแปรเวลาของแต่ละขั้นตอนในช่วง 0.5-5 ชั่วโมง วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่ได้ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ

เลือกเวลาที่เหมาะสม ในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปทั้งภาวะที่มีสารละลาย APTS 2% ร่วมกับสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% และภาวะที่มีสารละลาย CNBr 3% ร่วมกับสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตริงรูป

3.8.6 ศึกษาการหลุดของเอนไซม์(leaching)จากคาร์บอนกัมมันต์ของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปทั้งที่ภาวะ $A_{1-2.5}G$ และ $C_{3-2.5}G$

วิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตริงรูป ทั้ง 2 วิธีตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.6 กล่าวคือใส่สารผสมปฏิกิริยาทั้งหมดรวมทั้งเดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่ได้บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นแยกเดกซ์แทรนเนสตริงรูปออก และบ่มสารผสมปฏิกิริยาต่อไปอีกเป็นเวลา 15 นาที ตลอดปฏิกิริยานำสารละลายส่วนใสของปฏิกิริยาทุกๆ 5 นาที มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (65,66)

ศึกษาดูการหลุดของเอนไซม์จากตัวพยุงจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสและเวลาของปฏิกิริยา

3.9 การศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

3.9.1 เปรียบเทียบความเป็นกรดด่างที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตี (pH activity profile) ของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปกับเอนไซม์อิสระ

บ่มเดกซ์แทรนเนสตริงรูปปริมาณ 100 มก. และเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.5 หน่วยต่อมล. ในสารผสมของปฏิกิริยาที่ความเป็นกรดด่างในช่วงต่างๆ โดยใช้ 0.05 โมลาร์ของ

อะซีเตทบัฟเฟอร์ในช่วง pH 4.0-5.5

ซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง pH 5.5-7.0

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0-8.0

ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้ววัดแอคติวิตีตามวิธีการดำเนินการวิจัยตามข้อ 8

เปรียบเทียบช่วงความเป็นกรดด่างที่เดกซ์แทรนเนสตริงรูป และเอนไซม์อิสระ แสดงแอคติวิตีโดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับ pH ของสารผสมของปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีสูงสุดของแต่ละการทดลอง)

3.9.2 เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตี (temperature activity profile) ของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปกับเอนไซม์อิสระ

บ่มเดกซ์แทรนเนสตริงรูปปริมาณ 100 มก. และเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.5 หน่วยต่อมล. กับสารผสมของปฏิกิริยาที่ pH 5.5 สำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทรนเนสตริงรูปภาวะ $C_3G_{2.5}$ และที่ pH 5 สำหรับภาวะ $A_2G_{2.5}$ ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 30,35,40,45,50,55,60,65 และ70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้ววัดแอคติวิตี ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.5

เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เดกซ์แทรนเนสตริงรูปและเอนไซม์อิสระแสดงแอคติวิตี โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีสูงสุดของแต่ละการทดลอง)

3.9.3 <u>เปรียบเทียบความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง (pH stability profile) ของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปและเอนไซม์อิสระ</u>

บ่มเดกซ์แทรนเนสตริงรูปปริมาณ 100 มก.และเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.5 หน่วยต่อมล.ในสารผสมปฏิกิริยาที่ความเป็นกรดด่างในช่วงต่าง โดยใช้ 0.05 โมลาร์ของ

อะซีเตทบัฟเฟอร์ในช่วง pH 4.0-5.5

ซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง pH 5.5-7.0

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0-8.0

ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้ววัดแอคติวิตีตามวิธีการดำเนินการวิจัยตามข้อ 3.6

เปรียบเทียบความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปกับเอนไซม์อิสระ โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับความเป็นกรดด่างที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีสูงสุดของแต่ละการทดลอง)

3.9.4 <u>เปรียบเทียบความเสถียรต่ออุณหภูมิ (temperature stability profile) ของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปและเอนไซม์อิสระ</u>

บ่มเดกซ์แทรนเนสตริงรูปปริมาณ 100 มก.และเดกซ์แทรนเนสอิสระ 0.5 หน่วยต่อมล. ในสารผสมของปฏิกิริยาที่ pH 5.5 สำหรับเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตริงรูปภาวะ $C_3G_{2.5}$ และที่ pH 5 สำหรับภาวะ $A_2G_{2.5}$ ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 30,35,40,45,50,55,60,65 และ70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้ววัดแอคติวิตี ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.6

เปรียบเทียบความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปกับเอนไซม์อิสระ โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีสูงสุดของแต่ละการทดลอง)

3.9.5 <u>เปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการเก็บของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปกับเอนไซม์อิสระ</u>

เก็บเดกซ์แทรนเนสตริงรูป ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 ถึง 7.5 ที่อุณหภูมิห้อง(28-30 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตริงรูป เทียบกับเอนไซม์อิสระที่เก็บในสภาพที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude enzyme) ในช่วงเวลาของการเก็บ 0-45 วัน โดยวัดทุกวันในสัปดาห์แรก และทุก 2 วันในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากนั้นวัดทุก 5 วันจนครบระยะเวลา 45 วัน

เปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการเก็บของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปกับเอนไซม์อิสระโดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับระยะเวลาของการเก็บในภาวะต่างๆ

3.9.6 <u>หาครึ่งชีวิตของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปและเอนไซม์อิสระ</u>

อ่านค่าครึ่งชีวิตของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระที่เก็บไว้ในภาวะที่เหมาะสม จากกราฟความสัมพันธ์ในข้อ 3.9.5 ที่ให้ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ 50%

3.9.7 หาค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปและเอนไซม์อิสระต่อเดกซ์แทรน ที 2000

บ่มเดกซ์แทรนเนสตริงรูปปริมาณ 100 มก.และเอนไซม์อิสระ 0.5 หน่วยต่อมล. กับสารผสมของปฏิกิริยา โดยแปรความเข้มข้นของเดกซ์แทรน ที 2000 0-5.0 % ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีเอนไซม์และนำผลที่ได้มาเขียนกราฟ ให้อยู่ในรูปของไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk Plot) ระหว่าง 1/v และ 1/[s] จะได้ค่า K_m จากกราฟ

เปรียบเทียบค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปและเอนไซม์อิสระ