# บทที่ 3

# อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

## 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environmental incubator shaker) รุ่น GYROMAXIM 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., U.S.A.
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น Avanti Centrifuge J-30I บริษัท Beckman, Germany
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของ Kubota, Japan
4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Digital pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 รุ่น Cyberscan 200 บริษัท Eutech Cybernetics, สิงคโปร์, รุ่น Professional Meter PP-50 บริษัท Sartorius AG, Göttingen, Germany
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic® 401 ของ Milton Roy, U.S.A. และ รุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer บริษัทเพอร์กิน แอลเมอร์ จำกัด
6. เครื่องชั่งรุ่น PG2002-S และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
7. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co., Ltd., Japan. และรุ่น HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan.
8. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 บริษัท ISSCO, U.S.A.
9. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของ Sanyo Electronic Co., Ltd., Japan.
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760 บริษัท Memmert, เยอรมนี
11. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.
12. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502-P บริษัท PMC, U.S.A.
13. เครื่องโครมาโทกราฟี รุ่น Bio-Logic LP ของ BioRad, U.S.A.
14. เครื่องอีเลคโทรโฟริซิสแบบแผ่น (Slab gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-Protein II Dual ของ BioRad, U.S.A.

## 3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ไซแลนจากไม้เบิร์ช (xylan from birchwood) ของ Sigma, U.S.A.
2. ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan) ของ Sigma, U.S.A.
3. พารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside) ของ Sigma, U.S.A.
4. พารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท (*p*-nitrophenyl acetate) ของ Sigma, U.S.A.
5. พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ของ Sigma, U.S.A.
6. แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี (Macro-Prep DEAE) ของ BioRad, U.S.A.
7. เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ (Sephacryl S-200 HR) ของ Amersham pharmacia
8. ไฮดรอกซีอะปาไทต์ (Hydroxyapatite) ของ BioRad, U.S.A.
9. บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน (Butyl hydrophobic interaction) ของ BioRad, U.S.A.
10. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ของ Merck, Germany
11. อะคริลาไมด์ (Acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.
12. N,N,N',N'-เตตระเมธิลีนไดอามีน (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine, TEMED) ของ Sigma, U.S.A.
13. N,N'-เมธิลีนบิสอะคริลาไมด์ (N,N'-Methylene bis acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.
14. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) ของ Sigma, U.S.A.
15. สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250) ของ Fluka, Switzerland.
16. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) ของ Sigma, U.S.A.
17. ชุดโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุล ของ BioRad, U.S.A.
18. อะลูมินา (Alumina) ของ Sigma, U.S.A

## 3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.3.1 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 และการเตรียมอะซีทิลเอสเทอเรส

#### 3.3.1.1 การเตรียมสปอร์ *Streptomyces* sp. PC22

ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารแข็งเอียงข้าวไรย์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จนสายใยเจริญเต็มที่ และนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 วัน จนสปอร์แก่เป็นสีเทา จึงนำมาขูดสปอร์ออกโดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวแขวนลอย ดูดสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองผ่านชุดกรองสปอร์ นำสปอร์แขวนลอยที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างสปอร์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยใน 30 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $2\times10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บเป็นปริมาตรน้อย ๆ (aliquots) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

#### 3.3.1.2 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22

1. ถ่ายสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ความเข้มข้น $2\times10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริพติคซอยบรอท (Tryptic soy broth, TSB) pH 9 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

2. ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม (Xylan complex medium) สำหรับผลิตอะซีทิลเอสเทอเรส (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) pH 9 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3. นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและกากอาหารที่เหลือออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส และปริมาณโปรตีนเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

### 3.3.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

การตรวจสอบแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Kormelink และคณะ (1993) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท (*p*-nitrophenyl acetate) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายใน 50 เปอร์เซ็นต์ เมธานอล

0.1 มิลลิลิตร ของ 0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5

0.3 มิลลิลิตร ของน้ำกลั่น

0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที นำไปวัดปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ที่ถูกปล่อยออกมาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้ พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ความเข้มข้นในช่วง 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 3)

1 หน่วยของอะซีทิลเอสเทอเรส เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท แล้วให้ พารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง

### 3.3.3 การวิเคราะห์แอคติวิตีของไซแลเนส

การตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนสดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakajima และคณะ (1984) โดยการวัดปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เกิดจากการย่อยสลายไซแลน ซึ่งในปฏิกิริยามีส่วนผสมดังนี้

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5

0.8 มิลลิลิตร ของ 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

นำส่วนผสมนี้ไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi และ Nelson (1952) และกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดลอง

### 3.3.4 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเซลลูเลส

การวิเคราะห์แอคติวิตีของเซลลูเลสโดยวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากการย่อยสลายโซเดียมคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (Sodiumcarboxymethyl cellulose) ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 และ 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi และ Nelson (1952) และกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายโซเดียมคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดลอง

### 3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi และ Nelson (1952)

นำสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.1) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 15 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมสารละลายเนลสัน (Nelson's reagent) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.2) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติมน้ำ 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคส ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.1 และ 1.2)

### 3.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยนำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.3) 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลาย D (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.4) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

### 3.3.7 การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์

3.3.7.1 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนอะซีทิลเอสเทอเรส

นำส่วนน้ำใสเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งกวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นลำดับส่วน คือ 0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80 และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ กวนแต่ละลำดับส่วนของสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกจากส่วนน้ำใสด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 โดยใช้ปริมาตรน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.7.2 การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.7.1 พร้อมทั้งกวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) กวนสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอนออกจากส่วนน้ำใสด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบ โดยใช้ปริมาตรน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ครั้งสุดท้ายไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.7.3 ผลของเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ (N-ethylmaleimide) ในการยับยั้งการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

บ่มอะซีทิลเอสเทอเรสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 3.3.7.2 ปริมาณเท่า ๆ กัน ในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปหาแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสตามวิธีการในข้อ 3.3.2

3.3.7.4 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์

นำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 3.3.7.2 ปริมาณเท่า ๆ กัน บ่มกับสับสเตรทและโซเดียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0-700 มิลลิโมลาร์ นำไปหาแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสตามวิธีการในข้อ 3.3.2

i 41705 41

3.3.7.5 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.3.7.5.1 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี (Macro-Prep DEAE)

ล้างสารแขวนลอยแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบา ๆ แล้วปล่อยให้เจลนอนก้น เทส่วนน้ำใสทิ้งพร้อมกับเจลละเอียดที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ แช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สุญญากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 28 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 50 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อย ๆ ใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-90 เปอร์เซ็นต์ ลงบนผิวหน้าเจล ชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลออกโดยใช้ 0-1000 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 2.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสและไซแลเนสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมเอาลำดับส่วนที่พบแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสเข้าด้วยกัน ทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้นโดยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ซึ่งมีเมมเบรนที่มีการคัดขนาดโมเลกุล (Molecular weight cut off) 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำตัวอย่างไปไดอะไลส์ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเวลาข้ามคืน สุดท้ายนำไปไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.7.5.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน (Butyl hydrophobic interaction)

ล้างสารแขวนลอยบิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน ด้วยน้ำกลั่นใช้แท่งแก้วคนเบา ๆ แล้วปล่อยให้เจลนอนก้น เทส่วนน้ำใสพร้อมกับเจลละเอียดที่ลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ ครั้งสุดท้ายแช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 กำจัดฟองอากาศออกโดยการดูดอากาศออกประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 3.5 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 1.7 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟตที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ลงในคอลัมน์ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำผงแอมโมเนียมซัลเฟตมาละลายกับตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.3.7.5.1 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.7 โมลาร์ แล้วนำมาใส่ลงบนผิวหน้าของเจล ชะโปรตีนที่ไม่จับกับตัวกลางด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับตัวกลางในคอลัมน์ออกโดยใช้ 1.7-0 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟตเกรเดียนท์ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เก็บลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่พบแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสเข้าด้วยกัน ลดปริมาตรตัวอย่างโดยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ซึ่งมีเมมเบรนที่มีการคัดขนาดโมเลกุล (Molecular weight cut off) 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำไปไดอะไลส์ใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 นานข้ามคืน และนำไปไดอะไลส์ต่อใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ละลายใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 นาน 4-5 ชั่วโมง วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์

3.3.7.5.3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทต์ (Hydroxyapatite)

แช่ไฮดรอกซีอะปาไทต์ใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง เทสวนน้ำใสพร้อมเจลละเอียดทิ้ง ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ นำเจลไปดูดอากาศออกประมาณ 20-30 นาที บรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร สูง 9.5 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 3.7 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์บิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน ในข้อ 3.3.7.5.2 มาผ่านลงคอลัมน์ ชะโปรตีนที่ไม่จับคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จากนั้นจึงชะโปรตีนที่ถูกจับด้วยไฮดรอกซีอะปาไทต์ออกจากคอลัมน์โดยการเพิ่มความเข้มข้นจาก 20-500 มิลลิโมลาร์ ของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์

3.3.8 **การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอะซีทิลเอสเทอเรส โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส** (Native polyacrylamide gel electrophoresis) **ดัดแปลงจากวิธีการของ** Laemmli (1970)

ประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3×10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3×10.2 เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.8) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้เต็มแผ่น ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ซับน้ำออกจนหมด เทสารละลายผสมสแตกกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.9) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว เสียบแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอีเลคโทรโฟรีซีส ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.1) เติมอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอีเลคโทรโฟรีซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาเจือจางในบัฟเฟอร์ที่จะใช้วิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.6) จากนั้นหยอดสารละลายโปรตีน 20 ไมโครลิตร ในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำการอีเลคโทรโฟริซิสที่ 200 โวลท์ จนสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้ว แช่เจลในสารละลายย้อมโปรตีน (staining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.10) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.11) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน สำหรับการย้อมแอคติวิตี (activity staining) ของอะซีทิลเอสเทอเรสทำโดยแช่เจลในสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 นาน 15 นาที แล้วนำไปแช่ต่อใน พารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบแถบสีเหลืองของพารา-ไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้น

### 3.3.9 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.9.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรส โดยการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์

ล้างสารแขวนลอยเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ (Sephacryl S-200 HR) ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบา ๆ แล้วปล่อยให้เจลนอนก้น เทส่วนน้ำใสทิ้งไป ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง ครั้งสุดท้ายแช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 กำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สุญญากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร สูง 49 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 40 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 7.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ได้จากขั้นตอนการผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทต์มาใส่ลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ ชะโปรตีนด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม เก็บลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสในแต่ละลำดับส่วน

จากนั้นใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานได้แก่ โกลบูลิน (globulin) โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) โอวัลบูมิน (ovalbumin) และไซโตโครม ซี (cytochrome c) น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 150,000, 66,000, 45,000 และ 13,237 ดาลตัน ตามลำดับ ผ่านลงในคอลัมน์เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ โดยภาวะเดียวกันกับเอนไซม์ข้างต้น นำแต่ละลำดับส่วนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สำหรับไซโตโครม ซี ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์

3.3.9.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรส โดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ตามวิธีการของ Laemmli (1970)

นำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ได้จากขั้นตอนการผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทต์ มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส และติดตามด้วยการย้อมแอคติวิตีและตัดแถบสีเหลืองที่เกิดขึ้นแล้วแยกโปรตีนออกจากเจล นำอะซีทิลเอสเทอเรสและสารละลายโปรตีนมาตรฐานมาทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3×10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3×10.2 เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบทั้งสองข้าง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับจุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.10) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงเต็มแผ่นกระจก ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ซับน้ำออกจนหมด เทสารละลายสแตกกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.11) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอีเลคโทรโฟริซิส ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.1) เติมอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงในช่องชุดทำอีเลคโทรโฟริซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.8) ต้มในน้ำเดือด 5 นาที หยอดสารละลายโปรตีนนี้ 20 ไมโครลิตร และโปรตีนมาตรฐานซึ่งเป็น Prestained SDS-PAGE standard 7.5 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วทำการอีเลคโทรโฟริซิสที่ 200 โวลท์ จนสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้วและย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออก ด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรสโดยพิจารณาการเคลื่อนที่ของอะซีทิลเอสเทอเรสเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

3.3.10 **สมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก** *Streptomyces* sp. PC22

3.3.10.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

นำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 35-75 องศาเซลเซียส

3.3.10.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

นำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยแปรความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ดังนี้

| | |
|---|---|
| 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตท บัฟเฟอร์ | ในช่วง pH 4.0-6.5 |
| 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ | ในช่วง pH 6.0-8.0 |
| 500 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ | ในช่วง pH 8.0-9.0 |

3.3.10.3 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่ออุณหภูมิ

บ่มอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 35-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยมีอะซีทิลเอสเทอเรสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.3.10.4 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.0 ดังระบุในข้อ 3.3.10.2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาหาแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยมีอะซีทิลเอสเทอเรสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.3.10.5 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท ($K_m$) ของอะซีทิลเอสเทอเรส

นำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน มาผสมกับสับสเตรท คือ พารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายขณะทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0.2-1.0 มิลลิโมลาร์ นำไปหาแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส ตามวิธีการในข้อ 3.3.2

3.3.10.6 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของอะซิทิลเอสเทอเรส

นำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน มาวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยเติมอิออนของโลหะชนิดต่าง ๆ ลงในสารผสมปฏิกิริยา ที่ความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิโมลาร์ ดังนี้

| | |
|---|---|
| แคลเซียมคลอไรด์ | ($CaCl_2 \cdot 5H_2O$) |
| โคบอลต์คลอไรด์ | ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) |
| คอปเปอร์ซัลเฟต | ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) |
| เฟอรัสซัลเฟต | ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) |
| เมอคิวรัสคลอไรด์ | ($HgCl_2$) |
| แมกนีเซียมซัลเฟต | ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) |
| แมงกานีสซัลเฟต | ($MnSO_4 \cdot H_2O$) |
| ซิงค์ซัลเฟต | ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) |

3.3.10.7 ผลของอีดีทีเอ (EDTA) ต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

นำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน มาวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยเติมอีดีทีเอลงในสารผสมปฏิกิริยาที่ความเข้มข้น 0.1-3.0 มิลลิโมลาร์ นำไปหาแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส ตามวิธีการในข้อ 3.3.2

3.3.10.8 ผลของสารดัดแปลงกรดอะมิโนต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

บ่มแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน ในสารดัดแปลงกรดอะมิโนลงไปโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาหาแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยมีอะซีทิลเอสเทอเรสที่ไม่ผ่านการบ่มในสารดัดแปลงกรดอะมิโนเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยสารดัดแปลงกรดอะมิโนที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

Ethylmethylaminopropylcarbodiimide (EDAC)

Iodoacetamide (IAM)

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

3.3.10.9 การตรวจสอบแอคติวิตีข้างเคียง (side activity) ต่อสับสเตรทต่าง ๆ

นำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่า ๆ กัน มาตรวจสอบแอคติวิตีข้างเคียงต่าง ๆ โดยแสดงเป็นค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity) โดยใช้สับสเตรทชนิดต่าง ๆ และวิเคราะห์แอคติวิตี ดังต่อไปนี้

- แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส (acetyl esterase) ใช้ *p*-nitrophenyl acetate (*p*-NPA) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ วิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.2

- แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส (α-L-arabinofuranosidase) ใช้ *p*-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ การวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Manin และคณะ (1994) โดยสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ ปริมาตร 0.025 มิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 และสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.025 มิลลิลิตร นำส่วนผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) นำไปวัดพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

- แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส (β-xylosidase) ใช้ *p*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ วิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.11.3

- แอคติวิตีของไซแลเนส (xylanase) ใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต และไซแลนจากไม้เบิร์ช ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.3

- แอคติวิตีของเซลลูเลส (cellulase) ใช้ sodiumcarboxymethyl cellulose ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.4

3.3.10.10 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนปลายสายเอ็น ($NH_2$-terminal) ของอะซีทิลเอสเทอเรส

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากการย้อมแอคติวิตีโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส และแยกโปรตีนออกจากเจล ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ซึ่งมีเมมเบรนที่มีการคัดขนาดโมเลกุล (Molecular weight cut off) 10,000 ดาลตัน วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตร แล้ววิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนปลายสายเอ็น ด้วยความอนุเคราะห์ของ ดร. จันทรกานต์ พิภพมงคล สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.3.11 การทำงานร่วมกันของอะซีทิลเอสเทอเรส บีตา-ไซโลสิเดส และไซแลเนส

3.3.11.1 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. CH7 และการเตรียมบีตา-ไซโลสิเดส

3.3.11.1.1 การเตรียมสปอร์ *Streptomyces* sp. CH7

ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. CH7 ในอาหารแข็งเอียงข้าวไรย์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 วัน จนสปอร์แก่ จึงนำมาขูดสปอร์ออกโดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวแขวนลอย ดูดสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองผ่านชุดกรองสปอร์ นำสปอร์แขวนลอยที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วล้างสปอร์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 รอบ จากนั้นแขวนลอยใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $2\times10^{8}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บเป็นปริมาตรน้อย ๆ (aliquots) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.11.1.2 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. CH7

1. ถ่ายสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *Streptomyces* sp. CH7 ความเข้มข้น $2\times10^{8}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริพติคซอยบรอท (Tryptic soy broth, TSB) pH 7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

2. ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลน คอมเพล็กซ์มีเดียม (Xylan complex medium) สำหรับผลิตบีตา-ไซโลสิเดส (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) pH 7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. กรองแยกเซลล์และส่วนน้ำใสด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ล้างเซลล์ด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาเตรียมบีตา-ไซโลสิเดสตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Nakanishi และคณะ (1987) โดยนำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกโดยบดรวมกับผงอะลูมินาในโกร่งด้วยอัตราส่วนน้ำหนักเซลล์เปียกต่อผงอะลูมินาเท่ากับ 1 ต่อ 1 จากนั้นเติม 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 เพื่อเป็นตัวทำละลาย นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

4. นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มความเข้มข้นโปรตีน นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส และปริมาณโปรตีนเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.11.1.3 การวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส

วิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Nakanishi และคณะ (1984) โดยส่วนผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside) ปริมาตร 0.025 มิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 และสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร นำส่วนผสมไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดไปปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

3.3.11.2 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 และการเตรียมไซแลเนส

3.3.11.2.1 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22

1. เตรียมหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 โดยถ่ายสปอร์แขวนลอยเชื้อความเข้มข้น $2\times10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริพติคซอยบรอท pH 9 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

2. ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม (Xylan complex medium) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) pH 9 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

3. แยกเอาเซลล์และกากอาหารที่เหลือออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของไซแลเนสและปริมาณโปรตีนเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.11.2.2 การทำไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์

1. การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ตกตะกอนส่วนน้ำใสด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งกวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจนได้ 80 เปอร์เซ็นต์ กวนสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกจากส่วนน้ำใสด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์เดิม ครั้งสุดท้ายไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของไซแลเนส ตามวิธีการในข้อ 3.3.3

2. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน แมคโคร-เพรบ ดีอีเออี (Macro-Prep DEAE)

ล้างสารแขวนลอยแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบา ๆ แล้วปล่อยให้เจลนอนก้น เทส่วนน้ำใสทิ้งพร้อมกับเจลละเอียดที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ แช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สุญญากาศประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 28 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 50 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อย ๆ ใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-80 เปอร์เซ็นต์ ลงบนผิวหน้าเจลชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลออกโดยใช้ 0-1000 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 2.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของไซแลเนสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมเอาลำดับส่วนที่พบแอคติวิตีไซแลเนสเข้าด้วยกัน ทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้นโดยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ซึ่งมีเมมเบรนที่มีการคัดขนาดโมเลกุล (Molecular weight cut off) 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำตัวอย่างไปไดอะไลส์ใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็นเวลาข้ามคืน สุดท้ายนำไปไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของไซแลเนส

3.3.11.3 การวิเคราะห์การทำงานร่วมกันของแอคติวิตีอะซีทิลเอสเทอเรส บีตา-ไซโลสิเดส และไซแลเนส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.3 โดยให้ไซแลนจากไม้เบิร์ช (birchwood xylan) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสับสเตรท และกำหนดปริมาณของไซแลเนสเท่ากับ 0.01 หน่วย จากนั้นเปรียบเทียบการเติมและไม่เติมบีตา-ไซโลสิเดสและอะซีทิลเอสเทอเรสในปฏิกิริยา โดยเอนไซม์เตรียมได้จาก

อะซีทิลเอสเทอเรส จากเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนไฮดรอกซีอะปาไทต์ จากข้อ 3.3.7.5.3 ปริมาณ 0.3 หน่วย

บีตา-ไซโลสิเดส จากเชื้อ *Streptomyces* sp. CH7 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.11.1.3 ปริมาณ 0.2 หน่วย

ไซแลเนส จากเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ปริมาณ 0.01 หน่วย

โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 วิเคราะห์การย่อยไซแลน โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.1)