พระมหากรุณาธิคุณ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่า (Rotary shaker) รุ่น G10 Gyrotory shaker ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.,Inc. EDISON, NJ,USA.

2. เครื่องเหวี่ยงแรงสูง (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, USA.

3. เครื่องคลื่นเสียงสูง (Sonicator) รุ่น W-385 ของบริษัท Heat Systems-Ultrasonics, New York,USA

4. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น 70 ของบริษัท Beckman USA.

5. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA - 3D ของบริษัท Hirayama Manufacturing corperation, Japan.

6. เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan

7. เครื่องเก็บลำดับส่วน (Fraction collector) รุ่น Frac-100 ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

8. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น spectronic 21 ของบริษัท Bausch and Lomb, USA.

9. เครื่องวัดค่าดูดกลืนลำแสงคู่ (double beam spectrophotometer) รุ่น 200-20 ของบริษัท Hitachi, Japan.

10. เครื่องทำอิเลคโทรโฟริซิส (electrophoresis) ของบริษัท Hoefer Scientific Instruments,San Francisco,USA.

11. เครื่อง French Pressure Cell Press ของบริษัท American Instrument Company,USA.

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เคมีภัณฑ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคโตเปปโตน (Bacto-peptone) ของ Difco Laboratories USA.

ผงสกัดยีสต์ (Yeast extract) ของ Difco Laboratories USA.

ผงสกัดมอลท์ (Malt extract) ของ Difco Laboratories USA.

กลูโคส (Glucose) ของ E. Merck Darmstadt,Germany

โปตัสเซียมไซยาไนด์ (KCN) ของ E. Merck Darmstadt, Germany

2. เคมีภัณฑ์สำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

ลินามาริน (Linamarin) ของ Sigma Chemical Company, St.Louis,USA.

คลอรามินที (Chloramin T) ของ BDH Biochemicals Ltd., Poole,England

3-เมทธิล-1-ฟีนิล-5-ไพราโซโลน (3-Methyl-1-phenyl-5-pyrazolone) ของ BDH Biochemicals Ltd., Poole England

บิสไพราโซโลน (Bispyrazolone) ของ BDH Biochemicals Ltd., Poole,England

ไพรีดีน (Pyridine) ของ E. Merck Darmstadt, Germany

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของ E.Merck, Germany

เอนไซม์ลินามาเรส (Linamarase) ของ Sigma Chemical Company,St.Louis,USA.

พาราไนโตรฟินิล-เบต้า-ดี กลูโคซายด์ (p-Nitrophenyl-β-D-glucoside) ของ Sigma Chemical Company,St.Louis,USA.

3. เคมีภัณฑ์สำหรับวัดปริมาณโปรตีน

นีนอลรีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu's phenol reagent)ของ E.Merck,Darmstadt, Germany

คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate 5-hydrate) ของ E.Merck, Germany.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของ E.Merck, Germany.

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

อัลบูมิน (Fraction V ,96-99% albumin,bovine)ของ Sigma,USA.

4. เคมีภัณฑ์สำหรับการทำโครมาโตกราฟี

ดีอีเออี-โตโยเพิร์ล 650 เอ็ม (DEAE-Toyopearl 650 M) โตโยเพิร์ลเอชดับเบิลยู-55 และ 40 (Toyopearl HW-55,HW-40) ของ TOSOH, Japan

อะคริลาไมด์ (Acrylamide) ของ Sigma, St.Louis,USA.

บิส (N,N-Methylene bis acrylamide) ของ Sigma,USA.

ทริส (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)ของ Sigma,USA.

TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine) ของ Sigma,USA.

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) ของ BDH Laboratory Chemical

ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) ของ Sigma, USA.

ไกลซีน (Glycine) ของ E.Merck,Germany

กรดอะซิติก (Acetic acid) ของ E. Merck, Germany

เมธานอล (Methanol) ของ May & Baker Ltd.,Dagenham, England

สีโคแมสซี บลู จี-250(Coomassie brilliant blue G-250) ของ Fluka AG. Buchs, Switzerland.

วิธีการทดลอง

1. แยกเชื้อยีสต์จากมันสำปะหลังหมัก

ใช้มันสำปะหลังสด (Manihot esculenta Crantz) 2 ชนิด คือ ชนิดหวาน และชนิดขม สับเป็นชิ้นขนาดประมาณ 3 ซม.x2 ซม.x2 ซม. หมักในโหลแก้ว ในสภาวะกึ่งไร้อากาศ เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันโดยนำชิ้นมันหมัก มาใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แช่ประมาณ 20 นาที แล้วนำมาแยกบนอาหารวุ้นวายเอ็ม (YM) (ภาคผนวก ก ข้อ1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนมีโคโลนีของเชื้อปรากฏขึ้น แยกโคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อยีสต์ แล้วเก็บไว้ในอาหารแข็งวุ้นเอียง YM

2. การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส(β-glucosidase) การทดลองได้ปรับปรุงวิธีของ Okafor และ Ejiofor (1986)

เตรียม 1% พาราไนโตรฟีนิล - เบต้า- ดี กลูโคซายด์ หรือ พีเอ็นพีจี (p-nitrophenyl-β-D-glucoside หรือ PNPG) ปริมาตร 0.2 มล.เกลี่ยให้ทั่วบนอาหารวุ้นเอ็นเอ (Nutrient agar) (ภาคผนวก ก ข้อ3) ในจานเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นดูดสารจนชื้มทั่วผิวหน้าอาหารและรอให้แห้ง นำเชื้อที่ต้องการทดสอบขีดเป็นรูปกากบาทขนาด 0.5 ซม. บนผิวอาหารวุ้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อที่ สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคไซเดส จะให้สีเหลืองของสารพาราไนโตรฟีนอล ที่ถูกเอนไซม์เบต้า-กลูโคไซเดส ไฮโดรไลซ์ออกมารอบโคโลนี

3. การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ลินามาเรส

เนื่องจากเอนไซม์ลินามาเรส เป็นเบต้า - กลูโคซิเดสชนิดหนึ่ง ดังนั้น เอนไซม์เบต้า-กลูโคไซเดสที่ได้จากเชื้อบางตัวอาจไม่ใช่ลินามาเรสก็ได้ มีรายงานพบว่าการสร้างเอนไซม์ลินามาเรสในจุลชีพจะต้องมีการกระตุ้นด้วยลินามาริน (Okafor,1985; Ikediobi,1985) ดังนั้นจึงทำการทดลองคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการสร้างเอนไซม์ลินามาเรสในอาหารเหลวที่มีลินามาริน เป็นตัวกระตุ้น

ในการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจะใช้ลินามารินที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นที่เตรียมได้จาก ภาคผนวก ค ข้อ 2 เป็นสับสเตรทในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

3.1 เลี้ยงยีสต์แต่ละไอโซเลทที่ได้จากข้อ 2 ในอาหารเหลวซาเพคดอกซ์(ภาคผนวก ก ข้อ 2) ที่มีลินามารินสกัด 0.05% (เตรียมได้ตามวิธีใน

ภาคผนวก ค ข้อ 1) เป็นตัวกระตุ้น เทียบกับในอาหารเหลวที่ไม่มีลินามารินเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม. เนื่องจากลินามาเรสที่ได้จากยีสต์ที่ทำการศึกษาเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซล จึงต้องทำการสกัดเอนไซม์ออกจากเซลยีสต์ตามวิธีในข้อ 4 และนำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรสตามวิธีในข้อ 5

3.2 ทดสอบความสามารถของยีสต์ในการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสในอาหารเหลวที่ไม่มีลินามารินเป็นตัวกระตุ้น เนื่องจากลินามารินเป็นสารที่มีราคาแพงและสกัดออกมาใช้ได้ยาก ดังนั้นจึงต้องการคัดเลือกเชื้อที่ไม่ต้องอาศัยลินามารินกระตุ้นในการสร้างเอนไซม์เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายในส่วนนี้

โดยนำสายพันธุ์ยีสต์ทั้งหมดที่มีการสร้างเอนไซม์ลินามาเรสได้ ในอาหารที่ไม่มีลินามาริน จากข้อ 3.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2 ชนิด เปรียบเทียบกัน คือ ชาเพคดอกซ์และ YM เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.1 คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด เพียงสายพันธุ์เดียว เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

4. การสกัดเอนไซม์ออกจากเซลยีสต์เพื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส

จากการทดลองคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ลินามาเรส พบว่า เอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากยีสต์ที่ทำการทดลองเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซล (Intracellular enzyme) ดังนั้นจึงต้องทำการสกัดเอนไซม์ออกจากเซลยีสต์ โดยแยกเซลยีสต์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 5000 x g เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ชั่งน้ำหนักเซลเปียกที่ได้ นำเซลยีสต์ไปแขวนลอยใน (suspend) 20 มล.ของ 0.1 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 จากนั้นทำให้เซลแตกโดยใช้เครื่องคลื่นเสียงสูง (Sonicator) ซึ่งตั้งระบบการทำงานของเครื่อง (Output control) เท่ากับ 9 และมีการทำงาน 50% ภายใน 1 นาที (50% duty cycle) เป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความเย็น แล้วนำไปปั่นแยกเศษเซลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 5000 x g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปตรวจสอบหาแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 5

5. การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรสตามวิธีของCooke(1979)

เตรียมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นพอเหมาะจำนวน 0.1 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลายลินามารินเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ง ข้อ 1) ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 0.5 มล. ปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว บ่มที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วเติม 0.2 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.6 มล.เพื่อหยุดปฏิกิริยา

วิเคราะห์หาปริมาณไซยาไนด์โดยเติม 0.1โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 2.8 มล. และ สารละลายคลอรามิน-ที(ภาคผนวก ข ข้อ1)0.2 มล.ปิดหลอดด้วยลูกแก้ว เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที เติมสารละลายไพริดีน-ไพราโซโลน รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข ข้อ 1) 0.8 มล.เขย่าเบาๆให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที สารละลายจะมีการเปลี่ยนสีจากชมพูเป็นม่วง และน้ำเงินตามลำดับ วัดค่าการดูดคลื่นแสงที่ 620 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โปตัสเซียมไซยาไนด์ แล้วคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ลินามาเรส คือปริมาณของเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทลินามาริน และ มีการปลดปล่อย 1 ไมโครโมล ของกรดไฮโดรไซยานิค (HCN) ออกมาภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ผลิตเอนไซม์ลินามาเรส

ในการทดลองต่อไปนี้จะใช้สินามารินบริสุทธิ์ของบริษัท Sigma เป็นสับเสตรทในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรสจนสิ้นสุดการทดลอง

<u>การเตรียมหัวเชื้อ</u> (inoculum)

ชุดเชื้อ B-1-14 ที่คัดเลือกแล้วว่ามีการสร้างเอนไซม์ลินามาเรสได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นจาก YM slant 1 ลูป ลงในอาหารเหลว YM 50 มล. นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำไปศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส

6.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ใส่หัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 อายุ 24 ชม.1 มล. ลงในอาหารเหลว YM(ภาคผนวก ก ข้อ 1)ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเข้มข้น 1% ดังนี้คือ มอลโตส, ซูโครส, เซลโลไบโอส, กลูโคส, ฟรุกโตส, แลคโตส และกาแลคโตส เทียบกับเมื่อไม่เติมแหล่งคาร์บอน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชม. สกัดเอนไซม์ออกจากเซลยีสต์ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 และ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการทดลอง ในข้อ 5

จากการทดลองพบว่ากลูโคส เป็นแหล่งของคาร์บอนที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด จึงนำมาแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเหลว YM ตั้งแต่ 0 - 5 % และเลี้ยงเชื้อในสภาวะเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์

6.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ใส่หัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์ B-1-14 อายุ 24 ชม. 1 มล.ลงในอาหารเหลว YM ที่มีกลูโคส 0.5% แปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนดังรายละเอียดข้างล่าง และเลี้ยงในสภาวะเดียวกันกับข้อ 6.1

สารไนโตรเจนอินทรีย์ (Organic N_2) ได้แก่ 0-1% ยูเรีย แบคโต-เปปโตน และ แอมโมเนียมซิเตรต

สารไนโตรเจนอนินทรีย์ (Inorganic N_2)ได้แก่ 0-1% แอมโมเนียมไนเตรท,แอมโมเนียมซัลเฟต, และโซเดียมไนเตรท

และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส

6.3 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของผงสกัดยีสต์ (Yeast extract)

ใส่หัวเชื้อยีสต์ B-1-14 ในอาหารเหลว สูตรเดียวกันกับข้อ 6.2 โดยใช้แบคโต-เปปโตน 0.5% และ แปรผันความเข้มข้นของผงสกัดยีสต์ ที่ความเข้มข้น 0,0.1,0.3,0.5,0.7 และ 1.0% ในสภาวะเดียวกับข้อ 6.1 แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส

6.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของผงสกัดมอลท์ (Malt extract)

เตรียมอาหารเหลว สูตรเดียวกับข้อ 6.3 โดยใช้ผงสกัดยีสต์ 0.3% และแปรผันความเข้มข้นของผงสกัดมอลท์ที่ 0,0.1,0.3,0.5,0.7 และ 1.0% เลี้ยงเชื้อ B-1-14 ในสภาวะเดียวกับข้อ 6.1 แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส

6.5 ชนิดและปริมาณของเกลือแร่ชนิดอื่น

เตรียมอาหารเหลว สูตรเดียวกับข้อ 6.4 โดยใช้ผงสกัดมอลท์ 0.3% เติมเกลือแร่บางชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ 0.001% และ 0.005% $FeSo_4$, 0.1% และ 0.5%, K_2HPO_4, 0.05% และ 0.1% $MgSO_4$, 0.05% และ 0.1% KCl เทียบกับเมื่อไม่มีการเติมแหล่งของเกลือแร่ใดๆ และ เลี้ยงเชื้อ B-1-14 ในสภาวะเดียวกับข้อ 6.1 แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส

6.6 ผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์

เตรียมอาหารเหลวสูตรเดียวกับข้อ 6.5 โดยไม่ต้องเติมเกลือแร่ใดๆและปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 4-9 เลี้ยงเชื้อ B-1-14 ในสภาวะเดียวกับข้อ 6.1 แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส

6.7 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อ B-1-14 ในอาหารสูตรเดียวกับข้อ 6.6 ที่มี pH ตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0 แต่นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ 25,30,อุณหภูมิห้อง(32±1),35 และ 40 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส

6.8 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าต่อการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อ B-1-14 ในอาหารสูตรเดียวกับ ข้อ 6.7 ที่อุณหภูมิห้อง แต่ปรับความเร็วรอบของเครื่องเขย่าต่างกันคือ 100,150,200 และ 250 รอบต่อนาที เนื่องศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์

6.9 ผลของสารบางชนิดต่อการผลิตเอนไซม์ลินามาเรส

6.9.1 โปตัสเซียมไซยาไนด์

เลี้ยงเชื้อ B-1-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรเดียวกับข้อ 6.6 โดยเติมโปตัสเซียมไซยาไนด์ ความเข้มข้นต่างๆกัน ตั้งแต่ 10-250 ส่วนในล้านส่วน (ppm)เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม. วัดแอคติวิตีของเอนไซม์

6.9.2 สารลดแรงตึงผิว

ใส่หัวเชื้อ B-1-14 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกับข้อ 6.6 และเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้อ 6.1 แต่แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด

ชุดที่ 1 มีการเติม TWEEN-80 ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-1% ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชุดที่ 2 เติม TRITON X -100 ความเข้มข้น 0-5% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรสในชั่วโมงที่ 48

7. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างเอนไซม์และการเจริญของเชื้อยีสต์ B-1-14

ใส่หัวเชื้อ B-1-14 อายุ 24 ชม. 1 มล. ในอาหารเหลวที่มีการปรับแล้วว่าให้แอคติวิตีสูงสุด บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของเชื้อที่เวลาต่างๆ โดยการวัดความขุ่นที่เพิ่มขึ้น ที่ค่าการดูดกลืนแสง 560 นาโนเมตร พร้อมทั้งตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรส และการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

8. การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-TOYOPEARL 650 M

เทสารแขวนลอย DEAE-TOYOPEARL ลงในปีกเกอร์ประมาณ 200 มล. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทส่วนน้ำใสทิ้ง และเติม 1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 500 มล. ลงไป โดยกวนเป็นครั้งคราวเป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดอิออนบางชนิดที่ปนเปื้อนอยู่ในเจล เทส่วนน้ำใสพร้อมเจลละเอียดบนผิวหน้าทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง จนไม่มีโซเดียมคลอไรด์เหลืออยู่ ตรวจสอบโดยนำน้ำที่ล้างมาทำปฏิกิริยากับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$) จะไม่เห็นตะกอนขุ่นขาวของซิลเวอร์คลอไรด์ ($AgCl$) เกิดขึ้น จากนั้นเติม 0.01 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 500 มล. ลงในเจลที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้สมดุลด้วยการอิ่มตัว (equilibrate) แล้วนำไปบรรจุลงในคอลัมน์แก้วของ Pharmacia ขนาด 70 x 1.6 ซม.ให้มีความสูงประมาณ 58 ซม. ผ่านฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ชนิดเดียวกันข้ามคืนจนเจลอยู่ในสภาพสมดุลที่อัตราการไหล 28 มล/ชม. ค่อย ๆ ใส่เอนไซม์ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ (หลังจากตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 30-60% มาแล้ว) ลงบนผิวหน้าของเจลแล้วชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยอิออนบนเม็ดเจลออกให้หมด ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH 6 ตรวจสอบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงในหลอดต่าง ๆ จะได้ค่า OD_{280} เข้าใกล้ 0 จากนั้นจึงชะโปรตีนที่ถูกจับอยู่กับเจลออกด้วย 0-0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์แกรเดียนท์ เก็บสารละลายโปรตีนหลอดละ 7 มล. ตรวจวัดโปรตีน ที่ถูกชะออกมาด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรสในแต่ละหลอดด้วย จากนั้นรวมหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรสสูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตรที่ได้ พร้อมทั้งวัดแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1951) ตามวิธีใน ภาคผนวก ง ข้อ 2

9. การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์เจลฟิลเตรชั่น Toyopearl HW-55

เทเจล HW-55 500 มล.ลงในปีกเกอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทส่วนน้ำใส พร้อมเจลละเอียดบนผิวหน้าทิ้งเติม 0.01 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 500 มล. ลงไปกวนเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 1 ชม. เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำไปบรรจุในคอลัมน์แก้วขนาด 70 x 2.5 ซม. แล้วผ่านฟอสเฟตบัฟเฟอร์ดังกล่าวข้ามคืนจนเจลอยู่ในสภาพสมดุลอิ่มตัว (equilibrate) ที่อัตราการไหล 12 มล/ชม. นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ DEAE และ ทำให้แห้งโดยเครื่องระเหิดแห้ง(Lyophilizer) มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 5 มล. (น้อยกว่า 3% ของปริมาตรเจลทั้งหมดในคอลัมน์) แล้วค่อยๆเติมลงในคอลัมน์เจลฟิลเตรชั่น เก็บสารละลายโปรตีนจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 3 มล. วัดปริมาณโปรตีนที่ OD_{280} แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์

10. การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-60 %

เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่คำนวณแล้วว่ามีความเข้มข้นเป็น 30% ของปริมาตรทั้งหมดลงในเอนไซม์สกัด โดยกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชม. นำไปปั่นตกตะกอนโปรตีนที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชม. ที่ 0 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใสที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนต่อโดยเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปจนมีความเข้มข้นเป็น 60 % ของปริมาตรทั้งหมดของเอนไซม์สกัด และกวนตลอดเวลาเช่นเดียวกับตอนต้น หลังจากนำไปปั่นตกตะกอนโปรตีนที่ 10,000 รอบต่อนาทีแล้ว นำตะกอนมาละลายใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตรน้อยที่สุดที่จะทำให้ตะกอนละลายได้หมด นำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟต วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลินามาเรสตามวิธีในข้อ 5 และวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีในภาคผนวก ง ข้อ 2

11. การทำโพลีอะครีลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีสชนิดแท่ง (Disc.polyacrylamide gel eletrophoresis) ตามวิธีของ Williams และ Reisfeld (1964)

โดยบรรจุสารละลายผสม 7 เปอร์เซ็นต์เซพาเรติงเจล (Separating gel, ภาคผนวก ข ข้อ 3.1) ในหลอดแก้วขนาด 0.5 x 8 ซม. ให้มีความสูง 7 ซม. ปิดทับหน้าเจลด้วยน้ำสูง 0.5 ซม. เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบ หลังจากเจลแข็งตัวแล้วดูดน้ำที่ผิวเจลทิ้ง เทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (Stacking gel, ภาคผนวก ข

ข้อ 3.2) ให้มีความสูงประมาณ 0.5 ซม. ปิดทับหน้าด้วยน้ำเช่นกันตั้งทิ้งไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ จนกระทั่งเจลแข็งตัว ผ่านสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบความบริสุทธิ์ 20 ไมโครลิตร (ปริมาณโปรตีน 50-100 ไมโครกรัม) ใน 40 ไมโครลิตร กลีเซอรอล และ 10 ไมโครลิตรของ 0.005% บรอมฟีนอลบลู ลงในแท่งเจล และทำอีเลคโตรโฟรีซีส โดยใช้สารละลายทริสไกลซีน pH 8.3 (ภาคผนวก ข ข้อ 3.3) เป็นบัฟเฟอร์ ผ่านกระแสไฟฟ้า 6.0 มิลลิแอมแปร์ต่อแท่งเจลจนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนลงมาเกือบถึงปลายสุดของเจล นำเจลออกจากแท่งแก้วและแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining solution, ภาคผนวก ข ข้อ 3.4) เป็นเวลา 1 ชม. ล้างสีส่วนเกินออกโดยใช้น้ำยาล้างสี (destaining solution, ภาคผนวก ข ข้อ 3.5) หลาย ๆ ครั้ง จนเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์บนแท่งเจล โดยใช้แท่งเจลที่ทำอีเลคโทรโฟรีซีสแต่ไม่ได้ผ่านการย้อมสีมาตัดเป็นชิ้นขนาด 2 มม. หลายๆชิ้นโดยเปรียบเทียบกับแท่งเจลที่ผ่านการย้อมสี ชะโปรตีนออกมาโดยแช่ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH6.0 เป็นเวลา 6 ชม. แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

12. การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ลินามาเรส

12.1 น้ำหนักโมเลกุล

จากการประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ โดยการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์ TOYOPEARL HW-55 เปรียบเทียบค่า K_{av} (Partition coefficient) ของเอนไซม์ลินามาเรสกับโปรตีนมาตรฐานที่ผ่านคอลัมน์เดียวกันที่อัตราการไหล 12 มล.ต่อชม. เก็บตัวอย่างหลอดละ 3 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ยกเว้นไซโตโครมซี จะวัดที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร) ด้วย UV. Spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟและคำนวณหาค่า K_{av} จากสูตร (Andrew, 1964)

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

เมื่อ V_e คือปริมาตรของบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการชะเอนไซม์หรือโปรตีนมาตรฐานได้สูงสุด

V_o คือปริมาตรของช่องว่าง ระหว่างเม็ดเจล

V_t คือปริมาตรภายในคอลัมน์

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับค่า K_{av}

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่

ไซโตโครมซี	น้ำหนักโมเลกุล	12,500	ดาลตัน
ซีรัมอัลบูมิน	"	67,000	"
อัลโดเลส	"	158,000	"
คะตะเลส	"	240,000	"

12.2 การหาค่า K_m ของเอนไซม์ต่อสับสเตรท

12.2.1 การหาค่า K_m เมื่อใช้ลินามารินเป็นสับสเตรท

นำเอนไซม์ลินามาเรสความเข้มข้นพอเหมาะ ทำปฏิกิริยากับสารละลายลินามาริน ความเข้มข้นต่างกันตั้งแต่ 0.1-1.4 มก./มล. และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างกัน ตั้งแต่ 0-40 นาที นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟในรูปของ ไลน์-วีเวอร์เบิร์ก ระหว่าง 1/V และ 1/[S]

12.2.2 การหาค่า K_m เมื่อใช้ PNPG เป็นสับสเตรท

นำเอนไซม์ลินามาเรสความเข้มข้นพอเหมาะ 0.1 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลาย PNPG 1 มล. ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.41 มิลลิโมลาร์ หยุดปฏิกิริยาด้วยโซเดียมบอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.8 2 มล. เติมน้ำกลั่นจนเป็น 4 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร (ปรับปรุงจากวิธีการของ Ikediobi และคณะ, 1980 และ Nashida และคณะ, 1987) นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟไลน์-วีเวอร์เบิร์ก ระหว่าง 1/V และ 1/[S]

12.3 การหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ลินามาเรส 0.1 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลายลินามารินที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ซึ่งมีช่วงของ pH ต่างกัน ตั้งแต่ 4.0-9.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์

บัฟเฟอร์ที่ใช้ได้แก่ 0.1 โมลาร์อะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.0-5.5

0.1 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.5-8.0

0.1 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0-9.5

12.4 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นพอเหมาะ 0.1 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลายลินามารินใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 20-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์

12.5 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความร้อน

บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 20-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายลินามารินใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เพื่อวัดแอคติวิตีที่เหลือเทียบกับเอนไซม์เริ่มต้นก่อนนำไปบ่ม

13. การจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ B-1-14(Identification of Yeast)

โดยศึกษาลักษณะเฉพาะตัวทางสัณฐานวิทยา(Morphological characteristics) และสรีรวิทยา (Physiological characteristics) ของเชื้อยีสต์ B-1-14 พร้อมทั้งใช้ Key เพื่อจำแนกสกุล (Genus) และชนิด (Species) ที่รายงานโดย Lodder (1970)

13.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา (Morphological Studies)

13.1.1 เลี้ยงยีสต์ B-1-14 1 ลูปในอาหารเหลว YM ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง เพื่อดูว่าเชื้อมีฝ้า (pellicle) เกิดขึ้นที่ผิวหน้าหรือไม่ และนำเซลยีสต์มาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะรูปร่างเซล, ลักษณะการแตกหน่อ, และวัดขนาดของเซล

13.1.2 ตรวจดูการขยายพันธุ์แบบใช้เพศ (Sexual Reproduction)โดยการเลี้ยงเซลในอาหารแข็งวุ้นเอียงโปแตสเซียมอะซิเตต(ภาคผนวก ก ข้อ 4.6) และโกรอดคาวา (ภาคผนวก ก ข้อ 4.5) บ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน นำมาตรวจดูแอสคัส และแอสโคสปอร์ของยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายทั้งหมด 1000 เท่า

13.2 การทดสอบทางสรีรวิทยา (Physiological tests)

การเตรียมเชื้อยีสต์ B-1-14 ตั้งต้น (starting culture)

แตะเชื้อยีสต์ B-1-14 อายุ 24 ชม. จากอาหารแข็งวุ้นเอียง YM ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 มล.ให้มีจำนวนเซลประมาณ 10^6 เซล/มล. เพื่อนำไปทดสอบในอาหารต่างๆ โดยจะเติม 0.05 มล. ของเชื้อตั้งต้นนี้ ลงในอาหารที่จะทดสอบทุกชนิด

13.2.1 ทดสอบการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

เติม 0.05 มล. ของเซลยีสต์ตั้งต้น B-1-14 ตั้งต้น ลงในอาหารเหลวที่จะทดสอบ (ภาคผนวก ก ข้อ 4.1; Fermentation medium) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ

25 องศาเซลเซียสตรวจดูการเกิดแก๊สในหลอดดูแรม ในวันที่ 1,2,7,14 และ 21

13.2.2 ตรวจดูการใช้คาร์บอนชนิดต่างๆ เพื่อการเจริญเติบโตในสภาพที่มีอากาศ

เติม 0.05 มล. ของยีสต์ตั้งต้น B-1-14 ลงในอาหารเหลว (ภาคผนวก ก ข้อ 4.3, Carbon assimilation medium) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจผลการเจริญของเชื้อในวันที่ 2,7,14 และ 21

13.2.3 ตรวจดูการใช้แหล่งของไนโตรเจนในสภาวะที่มีอากาศ

เติม 0.05 มล. ของยีสต์ตั้งต้น B-1-14 ลงในอาหารเหลวตามภาคผนวก ก ข้อ 4.2 (Nitrogen assimilation medium) บ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจดูการเจริญในวันที่ 1,2,7,14 และ 21

13.2.4 ตรวจดูการเจริญในอาหารเหลวที่ไม่มีแหล่งของวิตามิน

เติม 0.05 มล. ของยีสต์ตั้งต้น B-1-14 ลงในอาหารเหลวตามภาคผนวก ก ข้อ 4.4 (Vitamin - free medium) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจดูการเจริญในวันที่ 1,2,7,14 และ 21