# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 แบคทีเรีย

### 3.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 3.1.1.1 LB medium

| | | |
|---|---|---|
| yeast extract | 5 | กรัม |
| tryptone | 10 | กรัม |
| NaCl | 10 | กรัม |

เติมน้ำกลั่นลงไป 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร หลังจากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นแข็งให้เติม agar ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 17 กรัมต่อลิตร ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ

#### 3.1.1.2 chitin medium

| | | |
|---|---|---|
| yeast extract | 0.5 | กรัม |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.3 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 6 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | 10 | กรัม |
| Colloidal chitin | 0.2 | เปอร์เซ็นต์ (w/v) |

เติมน้ำกลั่นลงไป 900 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ นำมาเติมน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นแข็งให้เติม agar ลงไป 17 กรัมต่อลิตร ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ

### 3.1.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

นำ slant มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ประมาณ 18 ชั่วโมง) เขี่ยเชื้อจาก slant 1 ลูพ (loop) ใส่ลงใน LB medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนสามารถวัดความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ได้ในช่วง 0.2-0.3 หน่วย (ประมาณ 1-2 ชั่วโมง)

**3.1.3 การเก็บรักษาเชื้อ**

**3.1.3.1 การเก็บในระยะสั้น**

เก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการทดลองไว้ใน LB medium ชนิดวุ้นแข็ง ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร ในลักษณะลาดเอียง โดยเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีจากจานเลี้ยงเชื้อไปขีด (streak) ลงบนอาหารวุ้นเอียง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มที่ ปิดฝาจุกให้แน่น พันพาราฟิลม์นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานไม่เกิน 1 เดือน หลังจากนั้นต้องนำเชื้อมาเตรียมเก็บในระยะสั้นอีกครั้ง เมื่อต้องการใช้เชื้อในการทดลองให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ประมาณ 18 ชั่วโมง) ตามวิธีในข้อ 3.1.2

**3.1.3.2 การเก็บในระยะยาว**

**3.1.3.2.1 การเก็บเชื้อในกลีเซอรอล**

เลี้ยงเชื้อใน LB medium จนเชื้อเจริญถึงระยะทวีคูณ (log phase) แล้วเก็บเชื้อในหลอด eppendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกลีเซอรอลที่ปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาจุกให้แน่น พันพาราฟิลม์ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บประมาณ 1 ปี

**3.1.3.2.2 การเก็บเชื้อด้วยวิธีไลโอฟิไลเซชัน (Lyophilization)**

เลี้ยงเชื้อใน LB medium จนเชื้อเจริญถึงระยะทวีคูณ (log phase) นำไปบรรจุลงใน ampule แล้วนำ ampule ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสโดยให้ ampule อยู่ในลักษณะเอียงประมาณ 30 องศาทิ้งไว้ประมาณ 5 ชั่วโมง นำ ampule ซึ่งบรรจุเชื้อไปต่อเข้ากับตัวเครื่อง (freeze-dryer) ซึ่งมีอุณหภูมิ –50 องศาเซลเซียส จากนั้นเปิดปั๊มสูญญากาศจนภายนอกของ ampule อุ่นขึ้นจนเท่าอุณหภูมิห้อง ซึ่งแสดงว่ากระบวนการเสร็จสิ้น ทำการปิดปากหลอด ampule ด้วยความร้อน นำหลอด ampule ซึ่งบรรจุเชื้อที่แห้งแล้วไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เก็บได้เป็นระยะเวลานาน เมื่อจะนำเชื้อมาใช้ให้นำเชื้อไปเขี่ยลงใน LB medium แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

**3.1.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อติดตามการเจริญของเชื้อและเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนส**

ดูดเชื้อตั้งต้น 10 มิลลิลิตร (ข้อ 3.1.2) ใส่ลงใน chitin medium (ข้อ 3.1.1.2) pH 7.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการดูดเชื้อออกมาทำ serial dilution ทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใช้ sterile normal saline เป็นตัวเจือจาง จากนั้นใช้ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ใส่ใน LB plate ที่ปลอดเชื้อจานละ 0.1 มิลลิลิตร โดยดูดจากความเข้มข้นต่ำมายังความเข้มข้นสูง ใช้แท่งแก้วรูปตัว L กระจายเชื้อใน LB

plate นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการนับจำนวนจุลินทรีย์ในจานที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี นำไปคำนวณจำนวนโคโลนีต่อ 1 มิลลิลิตร ทำการตรวจสอบแอคติวิตีของไคทิเนสและปริมาณโปรตีนทุก 8 ชั่วโมง โดยดูดเชื้อจากหลอดแก้วที่ปลอดเชื้อที่เหลือ ใส่ลงในหลอด eppendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นในที่เย็นที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสที่ได้เพื่อนำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนต่อไป

**3.2 การวัดแอคติวิตีของไคทิเนสด้วยวิธีวัดสี** (Colorimetric method)

ทำตามวิธีของมณีรัตน์ มีพลอย (2542) ซึ่งดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Imoto และ Yagishita (1971) ซึ่งเป็นการวัดสมบัติรีดิวซ์ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากไคทิเนสย่อยไคทินโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะไปรีดิวซ์เฟอร์ริกไซยาไนด์ซึ่งมีสีเหลืองให้เป็นเฟอร์โรไซยาไนด์ซึ่งไม่มีสี

เติมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และคอลลอยดัลไคทินเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5.0 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 1.1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 30 นาที เติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 1.3) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที นำไปแช่ในน้ำแข็ง(ประมาณ 5 นาที) นำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ค่อย ๆ ดูดส่วนใสออกมา 2 มิลลิลิตร ด้วยปิเปตอัตโนมัติใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เทียบกับน้ำกลั่น

หลอดควบคุม (control) ใส่คอลลอยดัลไคทินภายหลังการต้มเอนไซม์กับบัฟเฟอร์ในน้ำเดือดแล้ว เพื่อทำให้เอนไซม์เสียสภาพ

หลอด blank ให้ใส่บัฟเฟอร์แทนเอนไซม์และคอลลอยดัลไคทินซึ่งใช้เป็นสับสเตรท

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิด N-acetylglucosamine 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง

แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) คือ จำนวนหน่วยเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม

### 3.3 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ทำตามวิธี microprotein assay ของ Bradford (1976) ใช้สำหรับวัดปริมาณโปรตีน 1-10 ไมโครกรัม

นำสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรมาผสมกับสารละลาย Bradford (Bradford working solution) (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 2.2) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 9 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Jenway ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร หาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน Bovine serum albumin (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 2.3) ความเข้มข้น 1-10 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร

### 3.4 การเตรียมไคทิเนสที่ได้จาก *B. cereus* ให้บริสุทธิ์บางส่วน

ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยกเว้นที่ระบุไว้

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายเอนไซม์ในปริมาณมาก โดยการเลี้ยงเชื้อบาซิลลัสใน LB medium แล้วทำการถ่ายเชื้อตั้งต้น (ข้อ 3.1.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน chitin medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36-38 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปแยกเอนไซม์โดยการปั่นแยกเซลล์และไคทินออกด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง Beckman L-21C ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสคือสารละลายเอนไซม์อย่างหยาบที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.4.1 การทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุลทราฟิลเตรชัน

กรอง crude enzyme ผ่านอุลทราฟิลเตรชันยูนิตซึ่งใช้แผ่นกรอง (membrane) เบอร์ YM10 ซึ่งกรองโมเลกุลที่มีขนาด 10,000 ดาลตันขึ้นไป โดยมีแก๊สไนโตรเจนช่วยดันที่ความดัน 30 psi เก็บสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้นี้ไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

#### 3.4.2 การทำโครมาโตกราฟีแบบการแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้ดีอีเออีเซลลูโลส (DEAE-cellulose)

##### 3.4.2.1 การเตรียมคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส

ล้างดีอีเออีเซลลูโลสปริมาณ 40 กรัมด้วยทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 400 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 3.1) ปริมาตร 700 มิลลิลิตรพร้อมทั้งกวนเบา ๆ ด้วยแท่งกวนแม่เหล็กประมาณ 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ดีอีเออีเซลลูโลสตกตะกอน หลังจากนั้นเทส่วนน้ำใสและเศษผงที่ลอยอยู่ออก ล้างด้วยทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 3.2) ปริมาตร 700 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำไปกรอง หลังจากนั้นนำไป suspend ด้วยทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาบรรจุลงไปในคอลัมน์ขนาด

2.3x20 เซนติเมตร ผ่านสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 200 มิลลิลิตรด้วยอัตราการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์

**3.4.2.2 การแยกเอนไซม์ด้วยคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส**

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการกรองชนิดอุลทราแล้วจากข้อ 3.4.1 เติมลงในคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส แล้วชะด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ประมาณ 400 มิลลิลิตรจนไม่มีโปรตีนออกมาจากคอลัมน์ (วัดค่า $OD_{280}$ เท่ากับ 0) จึงเปลี่ยนมาชะด้วย linear salt gradient 0.1-0.5 M ซึ่งเตรียมจาก 0.1 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 3.4) ปริมตร 100 มิลลิลิตรกับ 0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 3.5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามด้วยการชะด้วย 0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สุดท้ายชะด้วย 1.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 3.6) จนไม่มีโปรตีนออกมาจากคอลัมน์ (วัดค่า $OD_{280}$ เท่ากับ 0) โดยเก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตรติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำมาวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และติดตามความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์โดยการวัดความนำไฟฟ้าของโซเดียมคลอไรด์ในสารละลาย นำแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์มารวมกัน จากนั้นทำให้ปริมาตรลดลงโดยใช้เครื่องกรองชนิดอุลทราเพื่อทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้น วัดปริมาตร ตรวจวัดปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีเพื่อที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินต่อไป

**3.4.3 การทำโครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพด้วยรีเจนเนอเรทเทดไคทิน (Regenerated chitin affinity)**

**3.4.3.1 การเตรียมคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน**

นำรีเจนเนอเรทเทดไคทินไปบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 10.5x1.9 เซนติเมตร ให้ได้ความสูงเป็น 7 เซนติเมตร ผ่านสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 4.1) ลงในคอลัมน์ที่บรรจุรีเจนเนอเรทเทดไคทินปริมาตร 4-5 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพที่สมดุลย์

**3.4.3.2 การแยกเอนไซม์ด้วยคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน**

ทำตามวิธีของมณีรัตน์ มีพลอย (2542) ซึ่งทำการดัดแปลงจากวิธีของ Watanabe และคณะ (1997)

นำสารละลายเอนไซม์ส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ DEAE-cellulose ที่มีแอคติวิตีของไคทิเนส (ข้อ 3.4.2.2) ที่ทำให้เข้มข้นแล้วด้วยการกรองชนิดอัลทรา (MW cut off ของเมมเบรน

10,000 ดาลตัน) ปริมาตรไม่เกิน 10 มิลลิลิตรไปไดอะไลซ์ (dialyse) ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 100 เท่าของปริมาตรสารละลายเอนไซม์ 3 ครั้ง ครั้งละ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเติมลงในคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินที่อยู่ในสภาพที่สมดุลย์แล้ว ชะด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 4 เท่าของคอลัมน์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วเปลี่ยนมาชะด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 4.2) ปริมาตร 4 เท่าของคอลัมน์ จากนั้นจึงชะด้วย linear pH gradient 5.5-3.1 โดยเตรียมจากสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับ กรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์ pH 3.1 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 4.3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ชะด้วยกรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์ pH 3.1 เป็นลำดับสุดท้าย ตรวจสอบจนไม่มีโปรตีนออกมาจากคอลัมน์อีก (วัด $A_{280}$ ได้เท่ากับ 0) เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายแต่ละหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และวัดค่า pH ของสารละลาย นำหลอดที่มีแอคติวิตีของไคทิเนสมารวมกัน นำไปไดอะไลซ์ในทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ทำให้ปริมาตรลดลงโดยใช้อุลทราฟิลเตรชั่น วัดปริมาตรรวม แอคติวิตีรวม และปริมาณโปรตีนรวมของเอนไซม์ก่อนที่จะนำไปทำบริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

### 3.4.4 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200

#### 3.4.4.1 การเตรียมคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200

นำคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 ขนาด 2.0x90 เซนติเมตรซึ่งบรรจุเจลสูง 75 เซนติเมตร มาผ่านสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 อีกประมาณ 3-4 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์

#### 3.4.4.2 การแยกเอนไซม์ด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200

ผ่านสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.4.3.2 ลงในคอลัมน์ (ปริมาตร ไม่เกิน 2 เปอร์เซนต์ของปริมาตรคอลัมน์) แล้วชะด้วยทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 5.1) เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตรติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายมาวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ นำหลอดที่มีแอคติวิตีของไคทิเนสมารวมกัน ทำให้ปริมาตรของเอนไซม์ลดลงโดยใช้ aqua sorb ดึงน้ำออกแล้วนำไปไดอะไลซ์วัดปริมาตรรวม แอคติวิตีรวม และปริมาณโปรตีนรวมของเอนไซม์ก่อนที่จะนำไปศึกษาต่อไป

### 3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไคทิเนสโดยการทำดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส (Disc-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

#### 3.5.1 การเตรียมพอลีอะคริลาไมด์เจล 7.5 เปอร์เซ็นต์

เตรียม separating gel โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 6.4) 2.5 มิลลิลิตร สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.8 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 6.2) 2.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 6.5) 50 ไมโครลิตร และ TEMED 10 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน นำสารละลายไปบรรจุลงในแบบเจล (gel mold) ซึ่งเป็นแผ่นแก้วสี่เหลี่ยมขนาด 8.3x10 เซนติเมตร วางขนานกันห่างกัน 1.0 มิลลิเมตร ซึ่งมี spacer ขั้นไว้จนได้สารละลายที่มีความสูงห่างจากขอบบนประมาณ 2.8 เซนติเมตร ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่างรวดเร็วเพื่อให้ได้หน้าเจลที่เรียบ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 60 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัวโดยเมื่อเจลแข็งตัวแล้วจะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจนจึงเทน้ำกลั่นออกจากผิวหน้าของเจล

เตรียม stacking gel 5 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ 670 ไมโครลิตร สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.8 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 6.3) 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2.3 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน เติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 30 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วใช้ปิเปตพลาสติกดูดสารละลายแล้วนำไปหยอดลงบนผิวหน้าเจลของส่วน separating gel ให้ระดับสารละลายต่ำกว่าขอบบนประมาณ 2 มิลลิเมตร หลังจากนั้นค่อย ๆ ใส่หวี (comb) ลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 60 นาที เมื่อสังเกตเห็นเจลแข็งแล้วจึงค่อย ๆ ดึงหวีออก แล้วนำไปใช้ในการทดลอง

#### 3.5.2 การเตรียมสารละลายโปรตีน

นำสารละลายจากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำบริสุทธิ์ซึ่งมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 3 นาโนกรัม-110 ไมโครกรัม มาเติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 6.6) ในอัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร โดยให้ปริมาตรรวมไม่เกิน 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เตรียมนำไปหยอดลงในหลุมเจลในขั้นตอนการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสต่อไป

#### 3.5.3 การทำอิเล็กโทรฟอรีซีส

บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่สารละลายทริส-ไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ pH 8.3 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 6.1) ลงในอ่างบัฟเฟอร์ชั้นบนให้ท่วมปลายทั้ง 2 ข้างของแผ่นเจล และชั้นล่างให้ท่วมแผ่นกระจกที่บรรจุเจลอยู่เพื่อให้กระแสไฟฟ้าไหลต่อเนื่องในแผ่นเจลให้ครบวงจร หยอดสารละลายโปรตีนที่เตรียมจากข้อ 3.5.2 ลงบนหลุมเจล หลังจากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้า

ขนาด 20 มิลลิแอมแปร์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวล์ตต่อแผ่นเจล เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งแถบสี (tracking dye) เคลื่อนที่ไปอยู่ขอบเจลด้านล่างจึงปิดกระแสไฟฟ้า

### 3.5.4 การติดตามแถบโปรตีน

ย้อมโปรตีนโดยทำ silver stain ตามวิธีของ Wedrychowski และคณะ (1986)

หลังจากการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแล้ว ถ่ายเจลจากข้อ 3.5.3 ออกจากแผ่นแก้ว แล้วนำไปแช่ใน 50% methanol/10% acetic acid (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 6.7) เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายอย่างน้อย 2-3 ครั้งเพื่อตรึงเจล ต่อจากนั้นจึงนำแผ่นเจลไปล้างด้วยน้ำอย่างน้อย 3 ครั้งภายในเวลา 30 นาทีเพื่อล้าง 50% methanol/10% acetic acid ออก หลังจากนั้นนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 6.8) 15 นาทีพร้อมทั้งเขย่าเบา ๆ ล้างด้วยน้ำที่กำจัดไอออนออกแล้ว (deionized water) 2 ครั้ง แล้วเปลี่ยนน้ำแช่ทิ้งไว้ 2 นาทีพร้อมทั้งเขย่าเบา ๆ หลังจากนั้นนำมา develop ใน developing solution (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 6.9) จากนั้นแถบสีน้ำตาลดำของโปรตีนจะค่อย ๆ ปรากฏขึ้นภายในเวลา 10 นาที เมื่อแถบสีโปรตีนปรากฏชัดเจนเพียงพอแล้วให้นำเจลไปแช่ใน 1 % acetic acid (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 6.10) เพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยา ต่อจากนั้นล้างเจลด้วยน้ำอย่างน้อย 1 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เก็บเจลไว้ในน้ำหรือนำไปทำให้แห้ง

### 3.5.5 การติดตามแอคติวิตีของไคทิเนสในแผ่นพอลีอะคริลาไมด์เจล

ทำตามวิธีของมณีรัตน์ มีพลอย (2542) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Trudel และ Asselin (1989)

ทำเหมือนข้อ 3.5.1 แต่เติมไกลคอลไคทินเฉพาะใน separating gel ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หลังจากทำอิเล็กโทรฟอรีซีสเสร็จแล้ว ถ่ายเจลออกจากแผ่นแก้ว นำไปแช่ลงในสารละลายโซเดียม-อะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.0 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 8.1) เป็นเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าเบา ๆ เป็นครั้งคราวเพื่อให้เอนไซม์ย่อยไกลคอลไคทินในแผ่นเจล หลังจากนั้นเทสารละลายโซเดียม-อะซิเตทบัฟเฟอร์ออก นำเจลมาแช่ในสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 8.3) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงเทสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ออกแล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องหลาย ๆ ครั้ง จนเห็นแถบแอคติวิตีของไคทิเนสเป็นแถบดำบนพื้นเจลสีฟ้า เมื่อนำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอุลทราไวโอเลท

## 3.6 การศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส เอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจล (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

ทำตามวิธีของมณีรัตน์ มีพลอย (2542)

**3.6.1 การเตรียมเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจล 12.5 เปอร์เซ็นต์**

เตรียม separating gel โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 7.4) 4.17 มิลลิลิตร สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 8.8 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 7.2) 2.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 3.33 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 7.5) 50 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน นำสารละลายเจลไปบรรจุลงในแบบเจล จนกระทั่งสารละลายอยู่ต่ำจากขอบกระจกด้านบนประมาณ 2.8 เซนติเมตร ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 60 นาที เมื่อเจลแข็งตัวแล้วจะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำกลั่นอย่างชัดเจน เทน้ำกลั่นออกจากผิวหน้าเจล

เตรียม stacking gel โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ 670 ไมโครลิตร สารละลายทริส-เอสดีเอสบัฟเฟอร์ pH 6.8 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 7.3) 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 7.5) 30 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันแล้วนำไปหยอดลงในแบบเจลซึ่งได้เตรียม seperating gel ไว้แล้ว ให้ระดับสารละลายต่ำกว่าขอบบนประมาณ 2 มิลลิเมตร ค่อย ๆ ใส่หวีลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 60 นาที เมื่อสังเกตเห็นเจลแข็งแล้วจึงค่อย ๆ ดึงหวีออก แล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

**3.6.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์**

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือ สารละลายผสมของแอลฟา-แลคตาบูมิน ($\alpha$-Lactabumin) ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor) คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase) โอวัลบูมิน (Ovalbumin) และฟอสฟอริลเลส บี (Phosphorylase b) น้ำหนักโมเลกุล 14,400 20,100 30,000 45,000 และ 97,000 ดาลตัน ตามลำดับ ละลายโปรตีนมาตรฐานในบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.0625 โมลาร์ 2 เปอร์เซ็นต์ SDS และ 10 เปอร์เซ็นต์ glycerol

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์โดยให้มีปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 3 นาโนกรัม-110 ไมโครกรัมต่อตัวอย่าง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 7.6) ในอัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร ใส่ใน eppendrof ปิดฝาหลอดแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ ~100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจนมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้องก่อนนำไปหยอดลงในหลุมเจลที่เตรียมไว้

**3.6.3 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส**

ทำเหมือนข้อ 3.5.3 แต่ใช้สารละลายทริส-เอสดีเอสอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 7.1) แทนสารละลายทริส-ไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์

**3.6.4 การติดตามแถบโปรตีน**

ถ่ายเจลจากข้อ 3.6.3 ออกจากแผ่นเจล นำมาย้อมสีโปรตีนตามวิธีข้อ 3.5.4

**3.6.5 การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์**

วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสีน้ำตาลของโปรตีนที่ได้จากการย้อมด้วย silver และระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่ในแผ่นเจล นำมาคำนวณหาอัตราการเคลื่อนที่ ดังนี้

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบสีโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

หาน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

**3.6.6 การตามแอคติวิตีของไคทิเนสในแผ่นเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจล**

ทำเหมือนข้อ 3.6.1 แต่เติมไกลคอลไคทินเฉพาะใน separating gel ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หลังจากทำอิเล็กโทรฟอรีซิสเสร็จแล้ว ถ่ายเจลออกจากแผ่นแก้ว นำไปแช่ในสารละลาย Triton X-100 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 9.2) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าเบา ๆ เพื่อให้ Triton X-100 ในสารละลายไปดึงเอสดีเอสออกจากแผ่นเจลเพื่อทำให้เอนไซม์เกิดการรีเนเจอร์ และสามารถย่อยไกลคอลไคทินในแผ่นเจลได้ นำเจลออกมาแช่ในสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 9.4) ประมาณ 15 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้งที่อุณหภูมิห้องจนเห็นแถบแอคติวิตีของไคทิเนสเป็นแถบสีน้ำเงินเข้มบนพื้นเจลสีฟ้าเมื่อนำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอุลทราไวโอเลท

## 3.7 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนที่เตรียมได้

**3.7.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200**

หา void volume และ total bed volume โดยการผ่านสารละลายบลูเด็กซ์แทรน 5 มิลลิกรัม และโปแตสเซียมไดโครเมต 3 มิลลิกรัม ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ ชะด้วย

ทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 วัดพีคของบลูเด็กซ์แทรนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร และวัดพีคของโปแตสเซียมไดโครเมตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร หลังจากนั้นผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งได้แก่ ไซโตโครม ซี (cytochrome C) น้ำหนักโมเลกุล 12,500 ดาลตัน โอวัลบูมิน (Ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 43,000 ดาลตัน โบไวซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) น้ำหนักโมเลกุล 68,000 ดาลตัน และคาตาเลส (Catalase) น้ำหนักโมเลกุล 232,000 ดาลตัน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน วัดปริมาตรของสารละลายเมื่อโปรตีนแต่ละตัวออกจากคอลัมน์ และวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาค่า $K_{av}$ ดังนี้

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

เมื่อ $V_e$ คือ elution volume ของคอลัมน์ วัดได้จากปริมาตรของสารละลายเมื่อโปรตีนหรือเอนไซม์ผ่านออกมา

$V_0$ คือ void volume ของคอลัมน์ วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายบลูเด็กซ์แทรนผ่านออกมา

$V_t$ คือ ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ในส่วนเจลที่บรรจุอยู่ (total bed volume) วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมทผ่านออกจากคอลัมน์

ผ่านสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์ แล้วหา elution volume ของเอนไซม์โดยการวัดแอคติวิตีและปริมาณโปรตีน คำนวณค่า $K_{av}$ แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังกล่าวข้างต้น

### 3.7.2 การศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วตามวิธีข้อ 3.2 ทำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่เปลี่ยนภาวะการทดลองจาก pH 5.0 เป็น pH 3.0-9.0 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 10.1-10.6) หลังจากนั้นให้นำ pH ที่ได้ไปทำการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โดยเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองจาก 37 องศาเซลเซียส เป็น 30-70 องศาเซลเซียส

I21014619

3.7.3 **การศึกษาผลของเวลาในการบ่มเอนไซม์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์**

เมื่อได้ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมแล้วจากข้อ 3.7.2 ทำการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมดังกล่าว โดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่เวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-120 นาที แล้ววัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น นำผลที่ได้ไปพลอตกราฟระหว่างเวลาที่ใช้ในการบ่มและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเพื่อหาช่วงเวลาที่กราฟมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงเพื่อนำสภาวะที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อ ๆ ไป

3.7.4 **การศึกษาถึงความเสถียรของไคทิเนสที่** pH **และอุณหภูมิต่าง ๆ**

นำสารละลายเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3-12 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 10.1-10.8) ในอัตราส่วน 1:2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออกมา 1 ส่วนมาปรับ pH เป็น 6 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ในอัตราส่วน 3:7 แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของไคทิเนสที่เหลือตามวิธีข้อ 3.2 เปรียบเทียบกับแอคติวิตีตั้งต้นของเอนไซม์ (ที่เวลา 0 นาที pH 6.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและวัดแอคติวิตีตามข้อ 3.2)

นำสารละลายเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 0.1 มิลลิลิตร มาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25-90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของไคทิเนสตามวิธีข้อ 3.2 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่หาได้จากข้อ 3.7.2-3.7.3 เปรียบเทียบกับแอคติวิตีที่ pH ที่มีแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ซึ่งให้เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

3.7.5 **การศึกษาสับสเตรทของไคทิเนส**

นำสารละลายเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วไปบ่มกับไคทินและอนุพันธุ์ของไคทินชนิดต่าง ๆ ได้แก่ คอลลอยดัลไคทิน ไคทินผงบริสุทธิ์ รีเจนเนอเรทเทดไคทิน ไกลคอลไคทิน ไกลคอลไคโตแซน ไคทินผง (ไม่บริสุทธิ์ขนาด 35-mesh) ไคโตแซน (~90%deacetylation) (ความเข้มข้นของสับสเตรทแต่ละชนิดเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v)) เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 3.2 ในสภาวะที่เหมาะสมที่หาได้จากข้อ 3.7.2-3.7.3

3.7.6 **การตรวจสอบชนิดของไคทิเนสโดยวิธีการใช้สับสเตรทที่มีสี** (Chromogenic method)

ทำตามวิธีของมณีรัตน์ มีพลอย (2542) ซึ่งดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Roberts และ Selitrennikoff (1988)

เติมสารละลายเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย p-nitrophenyl-chitooligosaccharides ชนิดต่าง ๆ เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 60

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 30 นาที รอให้เย็น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เทียบกับ blank

หลอดควบคุม (control) ให้ต้มสารละลายเอนไซม์ในน้ำเดือดก่อน เป็นเวลา 30 นาทีแล้วจึงเติมสารละลายบัฟเฟอร์ และสารละลายสับสเตรท

หลอด blank ทำเหมือนตัวอย่างแต่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนสารละลายเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิด p-nitrophenol 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง

### 3.7.7 การศึกษาผลของไอออนบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์

บ่มสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตรกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารชนิดใดชนิดหนึ่งต่อไปนี้ คือ $CaCl_2$ $ZnSO_4$ $MnCl_2$ $MgCl_2$ $FeCl_2$ $CuSO_4$ หรือ $HgCl_2$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปวัดแอคติวิตีตามข้อ 3.2 ในสภาวะที่เหมาะสมที่หาได้จากข้อ 3.7.2-3.7.3 เปรียบเทียบแอคติวิตีกับภาวะที่ไม่มี $CaCl_2$ $ZnSO_4$ $MnCl_2$ $MgCl_2$ $FeCl_2$ $CuSO_4$ หรือ $HgCl_2$