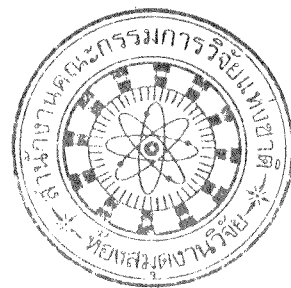


บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย



3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้

3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือหลักที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.1.1.1 เครื่อง MALDI-TOF MS Bruker Daltonics (Autoflex II, Bremen, Germany)
- 3.1.1.2 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Agilent Model 110 Series)
- 3.1.1.3 เครื่อง Gas Chromatography (Agilent Model 110 Series)
- 3.1.1.4 เครื่อง Mass Spectrometry (Agilent Model 5973)
- 3.1.1.5 เครื่อง micrOTOF-Q II™ ESI-Qq-TOF mass spectrometer (Bruker; Berman, Germany)
- 3.1.1.6 เครื่อง Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) และ คอลัมน์ Superose™ 12 (GE HealthCare, USA)
- 3.1.1.7 เครื่อง sieving machine รุ่น AS 200 (Retsch, Germany)
- 3.1.1.8 เครื่องปั่นแยกแรงเหวี่ยงสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (High Speed Refrigerated Centrifuge Sorvall Super T21)
- 3.1.1.9 ชุดเครื่องมือ Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, (Amersham™ ECL™ Gel Box Made in ISRAEL) และเครื่อง power supply สำหรับให้กระแสไฟฟ้า (Bucher instruments)
- 3.1.1.10 อุปกรณ์และเครื่องมือพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ (ภาคผนวก ก)

3.1.2 วัสดุดิบและสารเคมีที่จำเป็นในการทดลอง

- 3.1.2.1 โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง (GNC, USA)
- 3.1.2.2 ACE kit-WST(Dojindo co., Japan)
- 3.1.2.3 Amersham ECL Gel 10% (GE HealthCare, USA)
- 3.1.2.4 Albumin bovine serum (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.2.5 Molecular weight standard marker (GE HealthCare, USA)
- 3.1.2.6 โปรตีนมาตรฐาน(Vivantis, Malaysia)
- 3.1.2.7 Coomassie Brilliant Blue R350 และ Coomassie Brilliant BlueR250
- 3.1.2.8 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.2.9 ascorbic acid (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.2.10 เอนไซม์โปรติเอส ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

ไฟเทน (ficain) (165 TU/mg, Sigma- Aldrich, USA)

โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* (≥ 500 U/g, Sigma- Aldrich, USA)

โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* (7-15 U/mg Sigma- Aldrich, USA)

เพปซิน (pepsin) (≥ 400 U/mg, Sigma- Aldrich, USA)

ทริปซิน (trypsin) (1,900 U/mg solid, Sigma- Aldrich, USA)

ปาเปน (papain) ค่า CDU เท่ากับ 13,144.15 ซีดียู/มิลลิกรัม จาก

ห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย

3.1.2.11 สารเคมีพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ (ภาคผนวก ก)

3.1.3 เชื้อจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ข)

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ซึ่งจะซื้อจากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยแบ่งเป็น

แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่

- *Staphylococcus aureus* TISTR 118

- *Bacillus cereus* TISTR 687

แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่

- *Escherichia coli* TISTR 780

- *Enterobacter aerogenes*

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar slant เก็บ stock เชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการ subculture เชื้อทุก 1 เดือน

3.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง

โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้ว 1 ลิตร คนด้วย Magnetic stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (ทำซ้ำ 4 รอบ) เก็บส่วนใสไว้ทำการทดลองต่อไป

3.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์โปรติเอส

3.3.1 เอนไซม์ปาเปน

ทำการศึกษการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยปาเปน ซึ่งมีค่า CDU เท่ากับ 13,144.15 ซีดียู/มิลลิกรัม โดยนำสารละลายโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองจาก ข้อ 3.2 ในปริมาตรที่แตกต่างกันคือ 2.5 3.0 และ 3.5 มิลลิลิตร นำมาย่อยด้วยปาเปนจำนวน 20 และ 50 มิลลิกรัม ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่เวลา 30, 60 และ 90 นาที จากนั้นนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรตโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วคำนวณร้อยละของการย่อยโปรตีน

3.3.2 เอนไซม์ไฟเซน

ทำการศึกษการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ไฟเซน (165 TU/mg) โดยนำสารละลายโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองจาก ข้อ 2.1 ในปริมาตรที่แตกต่างกันคือ 2.5 3.0 และ 3.5 มิลลิลิตร นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ไฟเซน จำนวน 20 และ 50 มิลลิกรัม ละลายใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ปริมาตร 200 เวลา 30, 60 และ 90 นาที จากนั้นนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วคำนวณร้อยละของการย่อยโปรตีน

3.4 การศึกษาการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ โดยการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

3.4.1 เอนไซม์ไฟเซนที่เวลาต่างๆ

ทำการผสมเอนไซม์ไฟเซน 200 มิลลิกรัม กับ ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 3.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมา 400 ไมโครลิตร เติมอะซิโตน 3 เท่า ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวออก ทำการละลายตะกอนโปรตีนด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการดูดไลโซลอด 28 ไมโครลิตร และเติม Coomassie Brilliant Blue R 350 7 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงทำการ load sample ลงในแต่ละ well บน stacking gel หลังจากนั้นจึงทำการ Running gel ใช้ไฟฟ้ากระแสตรง 160 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

3.4.2 เอนไซม์เพปซินที่เวลาต่างๆ

ทำการผสมเอนไซม์เพปซิน 200 มิลลิกรัม กับ 0.2 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ไฮโดรคลอริกแอซิก บัฟเฟอร์ (KCl-HCl) pH 2.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 2.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที นำไปต้มเป็น

เวลา 10 นาที แล้วนำมา 400 ไมโครลิตร เติม acetone 3 เท่า ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวออก ทำการละลายตะกอนโปรตีนด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการดูสีหลอด 28 ไมโครลิตร และเติม Coomassie Brilliant Blue R 350 7 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงทำการ load sample ลงในแต่ละ well บน stacking gel หลังจากนั้นจึงทำการ Running gel ใช้ไฟฟ้ากระแสตรง 160 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

3.4.3 เอนไซม์ทริปซินที่เวลาต่างๆ

ทำการผสมเอนไซม์ทริปซิน 1000 มิลลิกรัม กับ 0.1M Tris(hydroxymethyl) aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 2.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมา 400 ไมโครลิตร เติมอะซิโตน 3 เท่า ปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวออก ทำการละลายตะกอนโปรตีนด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการดูสีหลอด 28 ไมโครลิตร และเติม Coomassie Brilliant Blue R 350 7 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงทำการ load sample ลงในแต่ละ well บน stacking gel หลังจากนั้นจึงทำการ Running gel ใช้ไฟฟ้ากระแสตรง 160 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

3.4.4 เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* ที่เวลาต่างๆ

ทำการผสมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* 2.5 มิลลิลิตร กับ 0.1 โมลาร์ Tris (hydroxymethyl) aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำมาปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 2.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมา 400 ไมโครลิตร เติมอะซิโตน 3 เท่า ปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวออก ทำการละลายตะกอนโปรตีนด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการดูสีหลอด 28 ไมโครลิตร และเติม Coomassie Brilliant Blue R 350 7 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงทำการ load sample ลงในแต่ละ well บน stacking gel หลังจากนั้นจึงทำการ Running gel ใช้ไฟฟ้ากระแสตรง 160 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

3.4.5 เอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* ที่เวลาต่างๆ

ทำการผสมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* 2.5 มิลลิลิตร กับ 0.1M Tris (hydroxymethyl) aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำมาปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 2.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมา 400 ไมโครลิตร เติมเอทานอล 3 เท่า ปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวออก ทำ

การละลายตะกอนโปรตีนด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการดูใส่หลอด 28 ไมโครลิตร และเติม Coomassie Brilliant Blue R 350 7 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงทำการ load sample ลงในแต่ละ well บน stacking gel หลังจากนั้นจึงทำการ Running gel ใช้ไฟฟ้ากระแสตรง 160 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

3.4.6 เอนไซม์ไฟเซนที่เวลาต่างๆ และผ่านการคัดแยกเพปไทด์สายสั้นโดย Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K

ทำการผสมเอนไซม์ไฟเซน 200 มิลลิกรัม กับ 0.1 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 5 มิลลิตร นำมาปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 3.5 มิลลิตร ที่เวลา 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K จากนั้นนำส่วนที่ผ่าน Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K มา 400 ไมโครลิตร เติมด้วยอะซิโตน 3 เท่า ปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวออก ทำการละลายตะกอนโปรตีนด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการดูใส่หลอด 28 ไมโครลิตร และเติม Coomassie Brilliant Blue R 350 7 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงทำการ load sample ลงในแต่ละ well บน stacking gel หลังจากนั้นจึงทำการ Running gel ใช้ไฟฟ้ากระแสตรง 160 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

3.5 วิธีการทำ SDS-PAGE โดยใช้ Amersham ECL Gel Box และ Amersham ECL 10%Gel สำเร็จรูป

3.5.1 การเตรียม SDS-PAGE

เตรียม Running บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1X โดยทำการเจือจางจากบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10X Amersham ECL Gel Running บัฟเฟอร์ โดยใช้ปริมาตร 171 มิลลิตรผสมกับ 10X Amersham ECL Gel Running บัฟเฟอร์ปริมาตร 190 มิลลิตร ต่อการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส 1 ครั้ง เติม Running Buffer 1X ปริมาตร 90 มิลลิตรลงในแต่ละ Tank ของ Amersham ECL Gel Box ด้านของ Amersham ECL เจล นำเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่น นำ Amersham ECL เจลใส่ใน Amersham ECL Gel Box ด้านที่เจลมีช่องใส่สารตัวอย่างหันไปในทิศทางขั้ว Cathode ใส่ Safety lid ด้านบน Amersham ECL Box เชื่อมต่อ Amersham ECL Box กับ Power supply กระแสตรงทำการ pre-run เจลนาน 12 นาที โดยใช้กระแสไฟฟ้า 160 V เมื่อ pre-run เสร็จเรียบร้อยแล้วปิดสวิตช์ Power Supply ดึง Safety lid ออก ใช้ comb ในการทำให้เกิดช่องใส่สารตัวอย่าง (well) เติม บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1X ปริมาตร 6 มิลลิตร ลงใน well container

3.5.2 การใส่สารตัวอย่าง

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 10.5 -175 kDa และนำสารละลายตัวอย่าง โดยการเติม 2X sample บัฟเฟอร์ลงในสารตัวอย่างสัดส่วน 1:1 incubate sample ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำสารละลายตัวอย่างไปปั่นด้วยเครื่อง Microcentrifuge และใส่สารละลายตัวอย่างอย่างรวดเร็วในช่องใส่สารตัวอย่าง (well) ของเจล โดย Well แรกจะใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่าน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนหลายชนิด (11 ชนิด) โดยมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 175 - 10.5 kDa ส่วน Well ที่ 2-10 จะใส่สารละลายตัวอย่าง ปิด Safety lid ด้านบนเครื่อง Amersham ECL Gel Box Running Conditions ใช้กระแสไฟฟ้ากระแสตรง 160 โวลต์ นาน 60 นาที



รูปที่ 3.1 Amersham™ ECL™ Gel Box System

3.5.3 การนำเจลออกจาก Amersham ECL Box

ปิดสวิทช์เครื่อง Power supply นำเจลออกจาก Amersham ECL Box เพื่อทำการ Fixing นาน 30 นาที ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue R 250 หรือ สี Coomassie Brilliant Blue R 350 นาน 10 นาทีและล้างสีออกจากเจลต่อไป เก็บเจลที่ล้างสีย้อมโปรตีนออกแล้วในสารละลาย Preservative ต่อไปเพื่อเก็บเจลได้นานไม่เสียสภาพและถ่ายภาพบันทึกผลการทดลอง ตรวจสอบความบริสุทธิ์และขนาดของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

3.6 การคัดแยกเปปไทด์สายสั้นโดย Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K

3.6.1 เอนไซม์ไฟเซน

ทำการผสมเอนไซม์ไฟเซน 1,000 มิลลิกรัม กับ 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาเติมลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 20 มิลลิลิตร เขย่าผสมเป็น

เวลา 90 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K เก็บส่วนที่ผ่าน Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ในขวดสีชา รวบรวมไว้ต่อไป

3.6.2 เอนไซม์เพปซิน

ทำการผสมเอนไซม์เพปซิน 3,000 มิลลิกรัม กับ 0.2 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ไฮโดรคลอริกแอซิก บัฟเฟอร์ pH 1.5 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร นำมาเติมลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 20 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสเติมลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 20 มิลลิลิตร เขย่าผสมเป็นเวลา 90 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K เก็บส่วนที่ผ่าน Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ในขวดสีชา รวบรวมไว้ต่อไป

3.6.3 เอนไซม์ทริปซิน

ทำการผสมเอนไซม์ทริปซิน 3,000 มิลลิกรัม กับ 0.1 โมลาร์ Tris(hydroxymethyl) aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาเติมลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 20 มิลลิลิตร เขย่าผสมเป็นเวลา 90 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K เก็บส่วนที่ผ่าน Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ในขวดสีชา รวบรวมไว้ต่อไป

3.6.4 เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis*

ทำการผสมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* 10 มิลลิลิตร ลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 20 มิลลิลิตร เขย่าผสมเป็นเวลา 90 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K เก็บส่วนที่ผ่าน Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ในขวดสีชา รวบรวมไว้ต่อไป

3.6.5 เอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae*

ทำการผสมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* 5 มิลลิลิตร ลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 20 มิลลิลิตร เขย่าผสมเป็นเวลา 90 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K เก็บส่วนที่ผ่าน Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ในขวดสีชา รวบรวมไว้ต่อไป

3.7 การตรวจวิเคราะห์เพปไทด์โดย เครื่อง Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

นำเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากข้อ 3.6 ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง lyophilized เพื่อให้ตัวอย่างอยู่ในสภาพของแข็งก่อนนำไปวิเคราะห์โปรตีนโดย เครื่อง MALDI-TOF MS สำหรับการวิเคราะห์เพปไทด์โดยใช้

เครื่อง MALDI-TOF MS นั้น ได้ดำเนินการส่งวิเคราะห์ที่ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยการวิเคราะห์ Mass spectra เพปไทด์โปรตีนสกัดด้วยวิธี Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF Mass spectrometer) บริษัท Bruker Daltonics (Bremen, Germany) รุ่น Autoflex II โดยใช้ไนโตรเจนเลเซอร์ ที่ความยาวคลื่น 337 นาโนเมตร สารตัวอย่างผสมกับสารละลาย matrix (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) และใช้สารตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์และใช้กระแสไฟฟ้า 20 kV ผลการทดลอง Mass spectra ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ ซอฟต์แวร์ Flex Analysis บริษัท Bruker Daltonics

3.8 การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ โดยวิธี DPPH

3.8.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองคือ ascorbic acid (Vitamin C) โดยใช้ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิตรผสมสาร 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100 (Absolute ethanol) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง หลังจากนั้นทำการคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (ภาคผนวก ง)

3.8.4 การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์สายสั้นด้วยวิธี DPPH

นำเพปไทด์ที่ได้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ผ่านการคัดแยกเพปไทด์สายสั้นโดย Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ไมโครโมลาร์ 1 มิลลิตรผสมสาร 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง หลังจากนั้นทำการคำนวณหา ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (ภาคผนวก ง)

3.9 การศึกษาความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ของเพปไทด์สายสั้น

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี agar diffusion ซึ่งดัดแปลงจาก Blair 1970 Murray 1999 และ NCCLS 2001 ดังนี้

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes* และ *Escherichia coli* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) (ภาคผนวก ข) ปั่นที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเตรียมเชื้อให้มีความชุ่มเท่ากับ Mac Farland No. 0.5 (ภาคผนวก จ) จากนั้นใช้ cotton swap ที่ปราศจากเชื้อป้ายเชื้อให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar ที่เจาะรูขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร หยดเพปไทด์สายสั้นจากเอนไซม์ชนิดต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับตัวควบคุมคือตัวทำลายที่ละลายตัวอย่าง และ แผ่นกระดาษกรองที่มียาปฏิชีวนะ

หลังจากบ่มไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง บริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (inhibition zone)

3.10 การแยกเพปไทด์โดยวิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

นำเพปไทด์ที่ผ่านการคัดแยกเพปไทด์สายสั้นโดย Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K มาแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ด้วยคอลัมน์ชนิด Superose™ 12 โดยใช้ น้ำกลั่นในการชะโปรตีน Flow rate 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นนำเพปไทด์ที่แยกได้ในแต่ละเฟรกชันไปทำการศึกษาต่อไป

3.11 การวิเคราะห์ angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity (ACEi)

นำเพปไทด์ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง FPLC มาวิเคราะห์แอกติวิตีของ angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEi) โดยใช้ ACE kit-WST(Dojindo co., Japan) ในการวิเคราะห์

3.12 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid profile)

สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนจากเพปไทด์ โดยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) ได้ส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกลาง กรุงเทพมหานคร โดยห้องปฏิบัติการกลาง อ้างอิงวิธีตาม J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72(6). 1989 โดยมีรายละเอียดในการวิเคราะห์ดังนี้

HPLC	: Agilent Model 1100 Series
Column	: Pico tag Hydrolysate amino acid Column, 3.9x150mm
Injection volume:	20 µl
Detector	: Diode Array (254 nm)
Column Oven:	40 °C
Flow rate	: 1 ml/min

ส่วนการวิเคราะห์ Tryptoplan จะใช้เครื่อง GC/MS ในการวิเคราะห์ โดยรายละเอียดการวิเคราะห์ดังนี้

GC/MS condition

GC : Agilent Model 6890N
Column : Zebron Amino Acid, 10x0.25 mm
Injection : Split 1:15@250 °C, 2 µl
Carrier Gas : Helium 1.1 ml/min constant flow
Oven program: 30 °C/min from 110 °C to 320 °C

MS : Agilent Model 5973

Source : 230 °C
Quad : 150 °C
Auxiliary : 320 °C
Scan range : 35-500 m/z
Sampling rate : 2² (3.15 scan/s)

3.13 การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี LC/MS-MS

สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนจากเปปไทด์ โดย LC/MS-MS ได้ส่งวิเคราะห์ที่โรงพยาบาลจุฬาฯ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีวิธีการดังนี้ ละลายเปปไทด์ในสารละลาย 0.1%กรดฟอร์มิก นำไปวิเคราะห์ MS/MS โดยใช้ micrOTOF-Q II™ ESI-Qq-TOF mass spectrometer (Bruker; Berman, Germany) และใช้ The Ultimate/nano LC system (Dionex / LC Packings) ด้วย 5 mm x 300 µm ID C18PepMap100 Precolumn™ (5 mm, 100 Å) and a 15 cm x 75 µm ID PepMap100™ column (3 mm, 300 Å) วิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูล MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) the SWISSPROT database