

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่นำมาแยกเอนโดไฟติกฟังไจ (endophytic fungi) เก็บจากอุทยานแห่งชาติคอกยู่เทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่
2. อาหารที่ใช้สำหรับแยกและเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟติกฟังไจ (ภาคผนวก ข)
 - 2.1 Rose bengal malt extract agar
 - 2.2 Malt extract agar
 - 2.3 อาหารเหลวสำหรับใช้ทดสอบการสร้าง และผลิตไซลันเนส
3. สารเคมี
 - 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบไซลันเนส โดยวิธี gel diffusion assay
 - 3.1.1 0.1 M ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (citrate phosphate buffer พีเอช 4.8)
 - 3.1.2 0.2 M K_2HPO_4
 - 3.1.3 1.0% คองโกเรด (congo red)
 - 3.1.4 1 M โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
 - 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ค)
 - 3.2.1 DNS reagent
 - 3.2.2 40% โพแทสเซียมทาทเรต (sodium-potassium tartrate)
 - 3.3 0.1 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer)
 - 3.4 0.1 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer)
4. เครื่องมือ
 - 4.1 Spectrophotometer รุ่น UV 2100 ยี่ห้อ Shimadzu
 - 4.2 Incubator shaker ยี่ห้อ Lab-Line
 - 4.3 Reciprocal shaker รุ่น NR-80 ยี่ห้อ Taitec
 - 4.4 Incubator ยี่ห้อ Memmert

4.5 อ่างควบคุมอุณหภูมิ	ยี่ห้อ Memmert
4.6 pH meter รุ่น F-21	ยี่ห้อ Horiba
4.7 หม้อนึ่งอัดไอน้ำ รุ่น SS-325	ยี่ห้อ Tomy
4.8 เครื่องเหวี่ยง รุ่น EBA 12 R	ยี่ห้อ Hettich
4.9 ตู้เย็นเก็บสารเคมี	

วิธีการทดลอง

1. การแยกเอนโดไฟติกฟังไจจากพืชสมุนไพรตัวอย่าง

- 1.1 เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรจำนวน 7 ชนิด คือ กระเจี๊ยบแดง(*Hibiscus sabdariffa* Linn.), เสลดพังพอน(*Barleria lupulina* Lindl.), ทองพันชั่ง(*Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz), คนทีสอ(*Vitex trifolia* Linn.), คิวินิน(*Cinchona succirubra* vP&K), สาบเสือ(*Eutophorium odoratum* Linn), น้ำมันราชสีห์(*Euphorbia thymifolia* Linn.) จากคอกยสุเทพบุษ
- 1.2 นำตัวอย่างมาทำการล้างน้ำเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ผิวบางส่วนทิ้งไป
- 1.3 ตัดตัวอย่างพืช (กิ่งหรือใบ) ให้มีขนาด 0.5 – 1.0 เซนติเมตร และทำการฆ่าเชื้อที่ผิว (70%ethanol 1 นาที, 5% sodiumhypochloride 5 นาที, 95%ethanol 30 วินาที) (Asano และคณะ 1999)
- 1.4 วางชิ้นตัวอย่างบนอาหาร rose bengal malt extract agar (ภาคผนวก ก) บ่มเป็นเวลา 7 วัน
- 1.5 แยกเชื้อที่ปรากฏบนชิ้นตัวอย่างลงในอาหาร malt extract agar (ภาคผนวก ข)

2. การคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลลาเนส โดย Gel diffusion assay (Downie และคณะ 1993)

- 2.1 ถ่ายเชื้อที่แยกได้ลงในหลอดทดลองขนาด 15 x 150 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเหลว 5 ml. (ภาคผนวก ข) โดยมีไข่แลนเป็นสับสเตรทในการชักนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์
- 2.2 นำไปเขย่าบน reciprocal shaker ด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน
- 2.3 นำน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (Kqueen และคณะ 1999) ปริมาตร 10 μ l. หยดลงในหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm. บนจานอาหารแข็งสำหรับทดสอบ ไลลาเนส และบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

- 2.4 เท 0.2 M K_2HPO_4 ลงบนจานอาหารพร้อมกับทำการเขย่าเป็นระยะๆ เป็นเวลา 30 นาที และเททิ้ง
- 2.5 ซ้อมด้วย 1.0%(w/v) คองโกเรดเขย่าเบาๆเป็นเวลา 15 นาที และเททิ้ง
- 2.6 ถ้างด้วย 1 M โซเดียมคลอไรด์ จนสามารถเห็นวงใสได้ และทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

3. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลันเนส

- 3.1 นำเชื้อที่ให้ค่าวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 cm. ขึ้นไป เลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 30 ml. ในฟลasks ขนาด 250 ml. โดยมีไซแลน (birchwood xylan) เป็นสับสเตรท
- 3.2 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน และทำการแยกเซลล์ออกโดยการเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสมาทำการตรวจสอบหากิจกรรมของเอนไซม์โดย บ่มเอนไซม์กับสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method (Miller, 1959) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm. โดย spectrophotometer (Shimadzu : UV-2100)
- 3.3 คำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ภาคผนวก ง)

4. การตรวจสอบผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์กับสับสเตรท

นำ crude เอนไซม์จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม ปริมาตร 50 μ l เติมสับสเตรท ปริมาตร 50 μ l และบัฟเฟอร์ปริมาตร 50 μ l นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C เป็นเวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 นาที ทำการตรวจสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ และคัดเลือกหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

5. การหาเวลาและสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

5.1 การหาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

- 5.1.1 นำเชื้อไอโซเลต D01 เลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ (ภาคผนวก ข) ที่มี 0.1% ไซแลน 10 ml. ในฟลasks ขนาด 125 ml เป็นสับสเตรทเพื่อเป็นก้ำเชื้อ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน

- 5.1.2 ถ่ายกล้ำเชื้อลงในอาหารเหลวชนิดเดียวกันที่มี 1% ไชเลน เป็นสับสเตรทปริมาตร 140 ml. ในพลาสติกขนาด 500 ml. เชื้อ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน
- 5.1.3 เก็บน้ำเลี้ยงปริมาตร 5.0 ml. ทุก 24 ชั่วโมง นำมาเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เพื่อแยกเซลล์ออก และนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดหาน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS method

5.2 การหาสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

สับสเตรทที่ใช้ในการทดลองคือ กลูโคส (glucose), แลคโตส (lactose), เซลโลไบโอส (cellobiose), ไชโลส (xylose) , คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Cmcellulose), wheat bran), corn cob powder, ชานอ้อย และ ฟางข้าว โดยใช้ 1% ของสับสเตรทเดิมลงในอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง และทำการแยกเซลล์ออกโดยการกรอง นำส่วนใสมาทำกิจกรรมของเอนไซม์

6. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

6.1 การหาพีเอช ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

- 6.1.1 นำเชื้อที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเลี้ยงในอาหารเหลว ปริมาณ 30 ml. ที่มี ไชเลนเป็นสับสเตรท
- 6.1.2 ทำการปรับพีเอชของอาหารโดยใช้พีเอชมิเตอร์ (pH meter) (Horiba : F-21) เท่ากับ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 โดยใช้ 0.5 M ไฮโดรคลอริก (HCl) และ 0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 6.1.3 เขย่าที่อุณหภูมิที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน
- 6.1.4 นำส่วนใสมาทำการตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์

6.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

- 6.2.1 นำเชื้อที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาณ 30 ml. ที่มี ไชเลนเป็นสับสเตรทและทำการปรับค่า พีเอช ให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์
- 6.2.2 เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35, 40 °C เป็นเวลา 5 วัน

6.2.3 แยกเซลล์ออกและนำส่วนไซมาทำการตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์

7 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

7.1 การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

การตกตะกอนจะทำเป็น fraction โดยเริ่มจาก 0-30, 30-50, 50-60, 60-70, 70-80 และ 80-90% ของสารละลายอิมัวแอมโมเนียมซัลเฟต โดยในแต่ละความเข้มข้นของเกลือจะเติมเกลือเพิ่มขึ้นเท่ากับ 16.6, 11.9, 6.1, 6.3, 6.6 และ 6.8 g/crude 100 ml. เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตลงในน้ำเลี้ยงอย่างช้าๆ พร้อมกับทำการกวนจนเกลือละลายหมด ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที และนำไปเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนที่ได้ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 ปริมาตร 2.5 ml. สารละลายใส่ที่เหลือปริมาตร 500 ml. นำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในความเข้มข้นลำดับต่อไป นำตะกอนในแต่ละ fraction ที่ละลายใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 มาทำการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry ในการตกตะกอนด้วยเกลือจะทำการแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนโดยการทำไดอะไลซิส

การทำ dialysis

นำ dialysis bag มาต้มในสารละลาย 0.05% EDTA เป็นเวลา 10 นาที คลี่ถุงไดอะไลซิสออก และนำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมมาเติมใน ถุงไดอะไลซิส มัดด้านหัวและท้ายให้แน่น และนำไปแช่ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 ที่อุณหภูมิ 4 °C เปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกๆ 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำเอนไซม์ที่ได้มาตรวจสอบหา กิจกรรมของเอนไซม์และโปรตีนต่อไป ถุงไดอะไลซิสที่จะเก็บไว้ใน 20% ethanol หรือ 0.1 M โซเดียมเอไซด์ (sodium azide)

7.2 Anion exchange column chromatography

การเตรียม Anion exchange column

1. เตรียมสารละลาย 30 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 เพื่อใช้ในการเตรียมตัวกลางและชะตัวอย่างจากคอลัมน์
2. ทำการละลายตัวแลกเปลี่ยนประจุ (DEAE-cellulose DE-52 ; whatman) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มากเกินไป ร่อนจนกระทั่งอิมัวเต็ม

3. เติมตัวแลกเปลี่ยนประจุลงในคอลัมน์ พร้อมกับค่อยเปิดวาล์วให้มีการไหลอย่างช้าๆ จนกระทั่งตัวกลาง pack ตัวกันอยู่ในระดับความสูงที่ต้องการ และทำการชะด้วย บัฟเฟอร์จนแน่ใจว่า พีเอช ที่ออกมาจาก คอลัมน์เท่ากับ พีเอช ของบัฟเฟอร์ คือเท่ากับ 8.0 จึงทำการปิดวาล์ว
4. เติมสารละลายโปรตีนตัวอย่างลงในคอลัมน์และค่อยๆปล่อยให้ตัวอย่างไหลผ่านคอลัมน์อย่างช้าๆ
5. ทำการล้างคอลัมน์โดยใช้ บัฟเฟอร์ปริมาณ 2-5 เท่า ของปริมาตรคอลัมน์ เพื่อทำการชะโปรตีนที่ไม่จับกับตัวกลาง หรือ จับกันด้วยแรงอ่อนๆออกไป
6. ทำการชะ โปรตีนที่จับกับตัวกลางโดยใช้ high salt buffer (0.1 M และ 0.5 M โซเดียมคลอไรด์ ใน 30 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0) โดยทำการเติมลงในคอลัมน์อย่างระมัดระวัง
7. ปิดวาล์วอย่างช้าๆเพื่อให้ high salt buffer ไหลผ่านคอลัมน์ และควรระวังไม่ให้ผิวหน้าของตัวกลางแห้ง
8. เก็บตัวอย่างสารละลายตัวอย่าง fraction ละ 5.0 ml.

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการจับของเอนไซม์กับตัวแลกเปลี่ยนประจุ โดยทำการชั่ง 0.1 g DEAE-cellulose ใส่ในหลอดทดลองและทำการล้างด้วย 20 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ประมาณ 5-6 ครั้ง เติมเอนไซม์ตัวอย่างปริมาตร 1.0 ml. ลงในหลอดทดลองที่มีตัวแลกเปลี่ยนประจุทิ้งไว้นาน 15 นาที และนำส่วนใสมาทำการตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองลำดับต่อไป ทำการเตรียมคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm. ยาว 40 cm.) โดยใช้ DEAE-cellulose (whatman DE52) เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุ เติมตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์และทำการชะด้วย 20 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในปริมาตร 1.5-3 เท่าของ packing volume ด้วยอัตราการไหล 0.8 ml/min. เก็บตัวอย่าง fraction ละ 5.0 ml. และทำการชะตัวอย่างโปรตีนด้วย 0.1 M และ 0.5 M โซเดียมคลอไรด์ ใน 20 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละ fraction มาทำการตรวจวัดโปรตีนที่ 280 nm และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ รวม fraction ที่มีค่ากิจกรรมของโปรตีนที่สนใจ และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยทำ ultrafiltration

7.3 Gel filtration chromatography

การเตรียม Gel filtration column

1. ทำการละลายตัวกลาง (Sephadex G-100) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มากเกินไป รอน กระทั่งตัวกลางอิ่มตัวเต็มที่
2. เติมตัวกลางลงในคอลัมน์ พร้อมกับค่อยเปิดวาล์วให้มีการไหลอย่างช้าๆ จนกระทั่ง ตัวกลางมีการ packed กันอยู่ในระดับความสูงที่ต้องการ และทำการชะด้วยบัฟเฟอร์จน แน่ใจว่า พีเอช ที่ออกมาจาก คอลัมน์เท่ากับ พีเอช ของบัฟเฟอร์ คือเท่ากับ 6.0 จึงทำการ ปิดวาล์ว
3. เติมตัวอย่างปริมาณ 1.0 ml. ลงในคอลัมน์อย่างระมัดระวัง เพื่อป้องกันการรบกวนผิว หน้าของ gel
4. ปล่อยให้ตัวอย่างไหลผ่านคอลัมน์อย่างช้าๆ และควรระวังไม่ให้ผิวหน้าของ gel แห้ง
5. ชะตัวอย่างด้วย 30 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 โดยควบคุมอัตราการไหล ให้อยู่ในช่วง 0.5-0.8 ml/min.
6. เก็บตัวอย่าง fraction ละ 2.5 ml.

ทำการเตรียมคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 cm. ยาว 100 cm.) โดยใช้ Sephadex-G100 เป็นตัวกลางในการแยกโปรตีน เติมตัวอย่างโปรตีนปริมาตร 2 ml. ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นแล้วลงในคอลัมน์และชะโปรตีนด้วย 20 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 5.5 โดยทำการควบคุมอัตราการไหลประมาณ 0.3 ml/min. ทำการเก็บตัวอย่าง fraction ละ 2.5 ml. ตรวจสอบโปรตีนที่ 280 nm และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละ fraction

7.4 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)(ภาคผนวก จ)

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยสังเกตจากแถบของโปรตีนที่ปรากฏ และทำการคาดประมาณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่สนใจจากการเปรียบเทียบกับ marker (Phosphorylase b (97 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carbonic anhydrase (30 kDa), Trypsin inhibitor (20 kDa), α -Lactalbumin (14.4 kDa))

8 การศึกษาลักษณะบางประการของ crude xylanase และ ไซแลนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

8.1 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ปริมาตร 50 μL กับ 1 % ไซแลน ปริมาตร 50 μL และ 0.1 M บัฟเฟอร์ พีเอช 3.0-8.0 ปริมาตร 50 μL นำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทและทำการตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method เพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

8.2 ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่อ พีเอช

บ่มเอนไซม์ปริมาตร 50 μL กับบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 3.0-8.0 ปริมาตร 50 μL ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับ 1 % ไซแลน บ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม และตรวจสอบหากิจกรรมของเอนไซม์และทำการตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method เพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

8.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ปริมาตร 50 μL กับ 1 % ไซแลน ปริมาตร 50 μL และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 50 μL บ่มที่อุณหภูมิ 30-80 $^{\circ}\text{C}$ ที่เวลาเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์และทำการตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method เพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

8.4 ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

นำเอนไซม์ปริมาตร 50 μL และ บัฟเฟอร์ที่มีค่า พีเอช ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ปริมาตร 50 μL บ่มที่อุณหภูมิ 30-80 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากการบ่มแล้วนำเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับ 1% ไซแลน ปริมาตร 50 μL ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมเพื่อทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ โดยการตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา

8.5 ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท

ทำการตรวจสอบความจำเพาะของเอนไซม์ต่อการย่อยสลายสับสเตรทโดยสับสเตรทที่ใช้ คือ ไซแลน (oat spelt xylan และ birchwood xylan), CMC, locust bean gum, arabic

gum ความเข้มข้น 1 % นำสับสเตรทปริมาตร $50\ \mu\text{l}$ บ่มกับเอนไซม์ปริมาตร $50\ \mu\text{l}$ และ บัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอชเหมาะสมปริมาตร $50\ \mu\text{l}$ ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทและทำการตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method เพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

8.6 ศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย ไซแลน ของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ปริมาตร 0.5 ml. กับ 0.5 ml. 2% ไซแลน ในบัฟเฟอร์ปริมาตร 0.5 ml. ที่อุณหภูมิ $50\ ^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างปริมาตร $1\ \mu\text{l}$ มาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โดย Thin-layer chromatography (Kqueen และคณะ 1999)(ภาคผนวก น)