วิธีการทดลอง

1. ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆต่อการผลิตเอนไซม์สลายไฟบริน

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Xylaria* sp. BL 25 ในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ได้แก่ Potato dextrose broth (PDB), Sabouraud dextrose broth (SDB), Malt yeast broth (MY), Peptone yeast extract glucose medium (PYGM) และ Minimal salt medium (MM) อาหารทุกชนิดปรับให้มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 โดยทำการเลี้ยงแบบ submerged culture บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเส้นใยราออกจากอาหาร เก็บส่วนของเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี fibrin plate

2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของราและการผลิตเอนไซม์

จากผลการทดลองในข้อ1 เลือกใช้อาหาร PYGM ที่ทำให้ราผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดมาทำการเลี้ยงราในลักษณะเดียวกันกับการทดลองที่1 เก็บตัวอย่างที่เวลา 3,7,10,12 และ 14 วัน โดยเมื่อครบกำหนดช่วงเวลาแต่ละระยะนำตัวอย่างมาปั่นแยกเส้นใยและอาหาร ส่วนของเส้นใยนำไปหาน้ำหนักแห้ง ส่วนของเหลวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อนำไปหากิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี fibrin plate

3 ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์

3.1 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหาร

ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหาร PYGM ให้เป็น 5, 6 และ 7 ทำการเลี้ยงราเช่นเดียวกับการทดลองที่1 เป็นเวลา 7 วัน ตัวอย่างที่ได้นำมาปั่นแยกเส้นใยและอาหาร ส่วนของเส้นใยนำไปหาน้ำหนักแห้ง ส่วนของเหลวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อนำไปหากิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี fibrin plate

3.2 ผลของอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์

ทำการเลี้ยงราตามวิธีในการทดลองที่1 โดยมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 6 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ, 30°ซ และ 35°ซ ความเร็วรอบการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำตัวอย่างมาปั่นแยกเส้นใยและอาหาร ส่วนของเส้นใยนำไปหาน้ำหนักแห้ง ส่วนของเหลวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อนำไปหากิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี fibrin plate

3.3 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตเอนไซม์

ทำการเลี้ยงราในอาหาร PYGM ที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ความเร็วรอบการเขย่าเป็น 150, 200 และ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ตัวอย่างนำมาปั่นแยกเส้นใยและอาหาร ส่วนของเส้นใยนำไปหาน้ำหนักแห้ง ส่วนของเหลวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อนำไปหากิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี fibrin plate

หมายเหตุ ทุกการทดลองจะทำสองซ้ำ แต่ละซ้ำเมื่อนำไปทดสอบกิจกรรมการสลายไฟบรินจะใช้ fibrin plate 2 จาน และใช้สถิติ one way ANOVA จากโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS ช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูล

4. **การเตรียมเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์**

4.1 การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเส้นใยออกโดยใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 20-40, 40-60 และ 60-80 เปอร์เซ็นต์ หลังการตกตะกอนแต่ละครั้งนำของเหลวไปปั่นแยกเอาตะกอนออก โดยใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปตกตะกอนในลำดับต่อไป ตะกอนที่ได้นำไปละลายใน 0.02 M phosphate buffer pH 5.7 และนำไปหากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน

4.2 การทำ dialysis

สารละลายเอนไซม์ที่ได้นำไปทำ dialysis โดยใช้ถุง dialysis bag ที่มี molecular weight cut off 7,000 daltons ใน 0.02 M phosphate buffer pH 5.7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีการเปลี่ยน buffer 2 ครั้ง หลังจากนั้นจึงทิ้งไว้ค้างคืน สารละลายเอนไซม์ที่ได้นำไปหากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน

4.3 การทำ ultrafiltration

ของเหลวที่ผ่านการทำ dialysis แล้ว นำไปทำ ultrafiltration โดยใช้ membrane สำเร็จรูป Vivacell 70 ซึ่งมี molecular weight cut off 10,000 Dalton ของเหลวที่ได้นำไปหากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน และนำไปใช้ทดสอบปัจจัยบางประการที่มีผลต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์

5. **ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์**

5.1 อุณหภูมิ

ทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิต่างๆด้วยวิธีแบบ fibrin plate หลังจากนั้นนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25,30, 35 และ 40°ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นจากการสลายไฟบริน วัดกิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่าของพื้นที่วงกลม เปรียบเทียบกิจกรรมที่ได้เป็นค่า relative activity

5.2 อนุมูลโลหะบางชนิด

นำเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ผสมในสารละลายที่มีอนุมูลโลหะได้แก่ Ca ($CaCl_2$), Co ($CoCl_2$), Cu ($CuSO_4$) Hg ($HgCl_2$), K (KCl), Mg ($MgCl_2$), Mn (MnCl) และ Zn ($ZnCl_2$) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายเป็น 2 mM นำไปบ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี fibrin plate

5.3 สารยับยั้ง

นำเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ผสมในสารละลายที่มีสารยับยั้งได้แก่ p-chloromecuribenzoic acid (PCMB, 2 mM), phenylmethyl sulfonylfluoride (PMSF,0.5mM), p-nitrophenyl p' guanidinobenzoate (NPGB, 0.5mM), N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK, 2 mM), p-toluenesulfonyl-L-lysine chloromethyl ketone TLCK(2 mM) และ ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA, 5 mM) นำไปบ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี fibrin plate

6. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์

6.1 ผลของอุณหภูมิ

เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์ นำเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ไปใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70°ซ เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี fibrin plate

6.2 ผลของพีเอช

นำเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ไปผสมกับ buffer ที่มีพีเอชแตกต่างกันตั้งแต่ pH 3-11 bufferที่ใช้มีดังนี้

pH 3,4 และ 5 ใช้ citrate buffer 0.2 M

pH 5.7 และ 7 ใช้ phosphate buffer 0.2 M

pH 8, 9 และ 10 ใช้ glycine -NaOH 0.2 M

pH 11 ใช้ Na_2HPO_4 -NaOH 0.2 M

นำ solution ที่ประกอบด้วยเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ผสมกับ buffer ไปใส่ใน water bath อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 20 นาที ครบเวลานำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี fibrin plate

หมายเหตุ pH 5.7 ใช้เป็น control

6.3 ระยะเวลาในการเก็บรักษา

นำเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น(4-10°ซ) อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ย 30°ซ) และอุณหภูมิ 37°ซ ทำการเก็บตัวอย่างในสัปดาห์ที่ 2, 4, 8 และ 12 เพื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี fibrin plate