บทที่ 2
การทดลอง

2.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

2.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	Grade	มวลโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid (glacial, d=1.05 kg/l)	A	60.05	Merck
Acrylamide	A	71.08	Sigma
β - Alanine	A	89.10	Fluka
Alginate (sodium salt)	A		Fluka
Amberlite XAD-7 (20-60 mesh)	A		Sigma
Ammonium persulphate	A	228.20	Merck
Ammonium sulphate	A	132.14	Carlo Erba
Basic fuchsin	A		Sigma
Bentonite	A		Aldrich
Boric acid		61.83	Merck
Bovine serum albumin (BSA)	A	66.00	Fluka
Calcium chloride	A	110.99	BDH
Carboxymethyl cellulose (CM-cellulose)	A		Sigma
Casein	A		Sigma
Celite for GLC (30-80 mesh)	A		BDH
Citric acid	A	210.14	Merck
Coomassie brilliant blue G-250	A	854.00	Sigma
Coomassie brilliant blue R-250	A	826.00	Sigma
Copper sulphate anhydrous	A	159.60	Merck
Cysteine	A	121.16	Fluka
Diethylaminoethyl cellulose (DEAE-cellulose)	A		Sigma

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ชื่อสารเคมี	Grade	มวลโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Duolite A-368	A		Supelco
Duolite C-280	A		Supelco
Duolite C-464	A		Supelco
Ethanol (95%)	C	46.10	Merck
Ethylenediaminetetraacetic acid (disodium salt, EDTA)	A	372.24	Merck
Hydrochloric acid (35.4%, d=1.19 kg/l)	A	36.46	BDH
Methanol	C	32.04	BDH
N,N'–Methylene-bis-acrylamide	A	154.20	Sigma
Methyl red	A	291.30	Riesel
Papain (Dried papaya latex, 1.1 U/mg solid)	A		Sigma
Papain (Dried papaya latex, 1.7 U/mg solid)	A		Sigma
Papain (Dried papaya latex, 11.9 U/mg solid)	A		Sigma
Phenolphthalene	A	318.33	Merck
Phosphoric acid	A	98.00	J.T.Baker
Potassium hydrogen phthalate (KHP)	A	204.22	AJAX
Potassium hydroxide	A	56.11	Carlo Erba
Potassium metabisulphite	A	222.33	BDH
Sand	A		Sargent
Sodium chloride	A	58.50	Merck
tri-Sodium citrate	A	294.10	BDH
Sodium dihydrogen phosphate	A	137.99	Fluka
di-Sodium hydrogen phosphate	A	141.96	Fluka
Sodium hydroxide	A	40.00	Thasco
Sucrose	A	342.30	Fluka

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ชื่อสารเคมี	Grade	มวลโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Sulphuric acid (96-98%, d=1.84 kg/l)	A	98.08	Merck
N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	A	88.15	BDH
Trichloroacetic acid	A	163.39	Carlo Erba
Tyrosine	A	181.19	Fluka

2.1.2 **เครื่องมือและอุปกรณ์**

ชื่อเครื่องมือและอุปกรณ์	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
Blender	MXT31GN	Main System
Centrifuge, Refigerate	6800	Kubota
Densitometer	CS-9301PC	Shimadzu
Dialysis membrane tubing (mw cut-off = 3,500)	132720	Spectrum medical Indus. Inc.
Electrophoresis Set	SE 280	Hoefer Scientific
Power Supply	250	BRL
Heating mantle	EM0500/C	Electrothermal
Hotplate & Stirrer	HPMS	Whatman
Oven	400	Memmert
pH Meter	PHM 61	Radiometer
Pipette, Adjustable Micropipette		Biohit
Shaking water bath	1083	GFL
Shaker	VRN – 360	Gemmy Industrial
UV/Visible Spectrophotometer	PU 8620	Philips

2.1.3 **วัตถุดิบ**

ยางมะละกอ	อำเภอเมือง และอำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่
ถั่วเหลืองซีกกะเทาะเปลือก	ตลาดพยอม จังหวัดเชียงใหม่
แป้งถั่วเหลือง	โครงการหลวงดอยคำ
ผงเนื้อนุ่ม เบลลี่	บริษัท เอส แอนด์ ดี เทรดดิ้ง จำกัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

2.2 วิธีการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้เริ่มจากการศึกษาสมบัติของโปรติเอสในยางมะละกอ จากนั้นจึงตรวจสอบชนิดของไธออลโปรติเอสในยางจากผลมะละกอดิบ โดยอาศัยเทคนิคแคโทดอิเลคโตรฟอริซิส ทั้งนี้ได้แยกปาเปนและไธออลโปรติเอสอื่นๆ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20-80%

เนื่องจากในการเตรียมไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอในรูปของการอบแห้ง ดังเช่นที่ซื้อได้จากบริษัทซิกมา (Sigma) มีความสะดวกในการใช้ การเก็บรักษา และการขนส่ง ดังนั้นจึงทดลองเตรียมไธออลโปรติเอสในรูปยางมะละกอผงโดยการอบแห้งในตู้อบ โดยได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการอบแห้งและศึกษาประสิทธิภาพของไธออลโปรติเอสที่เตรียมได้ เพื่อประโยชน์ในการเตรียมนมถั่วเหลืองผงที่ละลายง่ายและมีขายอยู่ในปัจจุบัน โดยได้เปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึง

2.2.1 การเปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรติเอสจากยางมะละกอที่แตกต่างกัน

เนื่องจาก ยางมะละกอสามารถพบได้จากทุกส่วนของต้นมะละกอ ซึ่งได้แก่ ก้าน ใบ ผล และลำต้น ดังนั้นจึงหาแอคติวิตีของโปรติเอสในยางจากส่วนต่างๆ และเปรียบเทียบกับโปรติเอสในยางมะละกออบแห้งของบริษัทซิกมาและในผงเนื้อนุ่มเบลลี่ที่มีขายตามท้องตลาด

2.2.1.1 วิธีเตรียมสาร

ก. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 7

ละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.07 กรัม และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.42 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 ลบ.ซม.

ข. สารละลายเอนไซม์

เตรียมโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 7 เป็นตัวทำละลายทั้งหมด

สารละลายโปรติเอสจากก้านและใบมะละกอเตรียมได้ 2 วิธี วิธีแรกเตรียมได้โดยกรีดยางจากก้านและใบมะละกอ แล้วนำมาละลายให้มีความเข้มข้น 1 มก./มล. แยกตะกอนส่วนที่ไม่ละลายออกโดยเซนตริฟิวจ์ที่ 6,000xg เป็นเวลา 5 นาที ส่วนวิธีที่ 2 เตรียมได้โดยชั่งน้ำหนักก้านและใบมะละกอ จากนั้นตัดและปั่นให้ละเอียด ใส่ลงในผ้าขาวบางแล้วนำไปคั้น แยกตะกอนส่วนที่ไม่ละลายออกโดยเซนตริฟิวจ์เช่นเดียวกัน เป็นเวลา 20 นาที นำมาเจือจาง 100 เท่า จะได้สารละลายโปรติเอสในยางและในสารสกัดจากก้านและใบ ตามลำดับ

สารละลายโปรติเอสจากยางมะละกออบแห้งของบริษัทซิกมาและจากผงเนื้อนุ่มเบลลี่เตรียมให้มีความเข้มข้น 1 และ 100 มก./ลบ.ซม. ตามลำดับ แยกตะกอนส่วนที่ไม่ละลายในสารละลายยางมะละกออบแห้งโดยเซนตริฟิวจ์ เป็นเวลา 5 นาที

สารละลายโปรติเอสจากผงมะละกอดิบเตรียมโดยกรีดยางจากผลดิบในช่วง 8-10 น. โดยใช้มีดสแตนเลสกรีดตั้งแต่ขั้วผลลงมาตามยาวจนถึงปลายผล ให้แผลที่กรีดลึกประมาณ 1 มม. จากนั้นใช้ขวดแก้วสีชารองรับน้ำยาง และเมื่อน้ำยางหยุดไหล รอสักครู่ จึงขูดยางส่วนที่จับกันเป็นก้อนที่ผลรวมเข้าด้วยกัน แบ่งยางมาละลายโดยให้มีความเข้มข้น 1 มก./ลบ.ซม. แยกตะกอนส่วนที่ไม่ละลายออกโดยเซนตริฟิวจ์ที่ 6,000xg เป็นเวลา 5 นาที

ค. สารละลาย activating agent (20 mM EDTA และ 50 mM ซิสเทอีน)

เตรียมโดยละลาย EDTA 0.0744 กรัม และซิสเทอีน 0.0606 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 4 ลบ.ซม. ในบีกเกอร์ใบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ผสมสารละลายทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 10 ลบ.ซม.

ง. สารละลายเคซีน 1% (w/v)

เตรียมโดยชั่งเคซีน 1 กรัม เติมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหาแอคติวิตี 100 ลบ.ซม. อุ่นให้เคซีนละลายหมด

2.2.1.2 **วิธีหาแอคติวิตี**

ในการหาแอคติวิตีโปรติเอสได้ใช้วิธีไฮโดรไลส์เคซีน ตามวิธีของ Kimmel และ Smith[16] โดยใส่สารละลายเคซีน 0.50 ลบ.ซม. สารละลาย activating agent 0.10 ลบ.ซม. และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 7 ปริมาตร 0.35 ลบ.ซม. ลงในหลอดทดลอง 2 หลอด อุ่นสารละลายที่ 37°C 5 นาที เติมสารละลายเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 อุ่นสารละลายทั้งสองหลอดต่อไป เป็นเวลา 10 นาที พร้อมกับเขย่า จากนั้นทำให้สารละลายเย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลาย 5% TCA 1.50 ลบ.ซม. ลงในหลอดทดลองทั้งสองหลอดและเขย่าให้สารผสมกัน เติมสารละลายเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 2 นำสารละลายทั้งสองหลอดไปเซนตริฟิวจ์ที่ 6,000 xg เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยให้สารละลายในหลอดที่ 2 เป็นสารละลายเปรียบเทียบ นำค่า A_{275} ที่ได้จากการทดลองไปเทียบหาแอคติวิตีโปรติเอสจากกราฟมาตรฐานไทโรซีน

2.2.2 **การศึกษาสมบัติของโปรติเอสจากยางมะละกอ**

โปรติเอสจากยางมะละกอที่นำมาใช้ในขั้นตอนนี้ ได้จากการกรีดผลดิบจากต้นมะละกอพันธุ์พื้นเมืองในจังหวัดเชียงใหม่ ยางมะละกอที่เก็บได้นี้นำมาเก็บไว้ในตู้เย็น

2.2.2.1 **วิธีเตรียมสารละลาย**

ก. สารละลายเอนไซม์จากยางมะละกอ

ชั่งยางที่กรีดจากผลดิบมะละกอ ละลายในน้ำกลั่นโดยให้มีความเข้มข้น 1 มก./ลบ.ซม. แยกตะกอนส่วนที่ไม่ละลายออก โดยเซนตริฟิวจ์ที่ 6,000xg เป็นเวลา 5 นาที

ข. สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 6

ละลายกรดซิตริก 5.25 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 6 ด้วย 6 M NaOH ปรับปริมาตรให้ครบ 500 ลบ.ซม.

ค. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 7

ละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.07 กรัม และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.42 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 ลบ.ซม.

ง. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 8

ละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4692 กรัม และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3.06 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 ลบ.ซม.

จ. สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 9 และ 10

เตรียมโดยนำบีกเกอร์มา 2 ใบ แต่ละใบใส่กรดบอริก 1.5458 กรัม แล้วละลายในน้ำกลั่น 400 ลบ.ซม. ปรับพีเอชของสารละลายด้วย 6 M NaOH ให้เป็น 9 และ 10 ในบีกเกอร์ใบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 500 ลบ.ซม.

ฉ. สารละลาย 0.5 M EDTA

เตรียมโดยชั่ง EDTA 0.9306 กรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 ปริมาตร 3 ลบ.ซม. แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 5 ลบ.ซม.

ช. สารละลาย 0.5 M ซิสเทอีน

เตรียมโดยชั่งซิสเทอีน 0.3029 กรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 ปริมาตร 3 ลบ.ซม. แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 5 ลบ.ซม.

2.2.2.2 **วิธีหาพีเอชที่เหมาะสม**

หาแอคติวิตีโปรติเอส (ข้อ 2.2.1.2) ที่ 37°C 10 นาที โดยสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายยางมะละกอ 50 ไมโครลิตร สารละลายเคซีน 1% 0.50 ลบ.ซม. activating agent 0.10 ลบ.ซม. และสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอชต่างๆ (6-10) 0.35 ลบ.ซม. โดยแต่ละพีเอชทำการทดลอง 4 หลอด หลอดแรกเป็นหลอดเปรียบเทียบ และอีก 3 หลอดเป็นตัวอย่าง

2.2.2.3 วิธีหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

หาแอคติวิตีโปรติเอส (ข้อ 2.2.1.2) จากสารละลายยางมะละกอ 50 ไมโครลิตร ในการไฮโดรไลส์เคซีน 0.50 ลบ.ซม. ที่มี activating agent 0.10 ลบ.ซม. และสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 7 ปริมาตร 0.35 ลบ.ซม. ที่อุณหภูมิต่างๆ (20-90°C) 10 นาที โดยแต่ละอุณหภูมิทำการทดลอง 4 หลอด หลอดแรกเป็นหลอดเปรียบเทียบ และอีก 3 หลอดเป็นตัวอย่าง

2.2.2.4 วิธีหาอิทธิพลของ EDTA และซิสเทอีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

หาอิทธิพลของ EDTA และซิสเทอีน ในการไฮโดรไลส์เคซีน 0.50 ลบ.ซม. ด้วยโปรติเอสจากสารละลายยางมะละกอ 50 ไมโครลิตร โดยในการหาแอคติวิตี เติมสารละลาย EDTA 0.5 M ปริมาตรต่างๆ เพื่อให้มีความเข้มข้นในสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0, 10.0 และ 20.0 mM (ชุดที่ 1) และเติมสารละลายซิสเทอีน 0.5 M ให้มีความเข้มข้นในสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30 และ 40 mM (ชุดที่ 2) ตามลำดับ ในแต่ละความเข้มข้นของทั้ง 2 ชุด ทำการทดลอง 3 หลอด หลอดแรกเป็นหลอดเปรียบเทียบ และอีก 2 หลอดเป็นตัวอย่าง

2.2.3 การแยกและการตรวจสอบไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอ

ในน้ำยางจากผลมะละกอมีไธออลโปรติเอสหลายชนิด ซึ่งได้ตกตะกอนแยกไธออลโปรติเอสแต่ละชนิด โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 20-80% ของสารละลายอิ่มตัวโดยแยกตะกอนโปรตีนที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงที่เพิ่มเกลือทุก 10% และทำบริสุทธิ์ปาเปนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 40% ของสารละลายอิ่มตัว แล้วตรวจสอบตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยแคโทดิคอิเลคโตรฟอริซิสและหาปริมาณไธออลโปรติเอสโดยใช้เครื่องเดนซิโทมิเตอร์

2.2.3.1 วิธีเตรียมสาร

ก. สารละลายสีย้อมในการหาปริมาณโปรตีน

ชั่ง coomassie brilliant blue G 250 100 มก. ละลายใน 95% เอธานอล 50 ลบ.ซม. จากนั้นเติม 85% กรดฟอสฟอริก 100 ลบ.ซม. ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองสารละลายและเก็บในขวดสีชา

ข. สารละลายอะคริลาไมด์ 60%

ประกอบด้วยอะคริลาไมด์ 60% และบิส-อะคริลาไมด์ 0.4% เตรียมได้โดยชั่ง อะคริลาไมด์ 60 กรัม และบิส-อะคริลาไมด์ 0.4 กรัม ลงในบีกเกอร์ใบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ละลายในน้ำกลั่น ผสมสารละลายทั้งสอง แล้วปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 100 ลบ.ซม.

ค. สารละลายอะคริลาไมด์ 10%

ประกอบด้วยอะคริลาไมด์ 10% และบิส-อะคริลาไมด์ 25% เตรียมได้โดยชั่ง อะคริลาไมด์ 10 กรัม และบิส-อะคริลาไมด์ 2.5 กรัม ลงในบีกเกอร์ใบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ละลายในน้ำกลั่น ผสมสารละลายทั้งสอง แล้วเติมน้ำกลั่นให้สารละลายครบ 100 ลบ.ซม.

ง. สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 1.0 M พีเอช 4.3

ปิเปตสารละลาย KOH 1.0 M 48 ลบ.ซม. ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น 17.2 ลบ.ซม. และ TEMED 4.0 ลบ.ซม. ปรับพีเอชของสารละลายผสมให้เป็น 4.3 ด้วย 6 M HCl แล้วเติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 ลบ.ซม.

จ. สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.5 M พีเอช 6.7

ปิเปตสารละลาย KOH 1.0 M 48 ลบ.ซม. ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น 2.87 ลบ.ซม. และ TEMED 0.46 ลบ.ซม. ปรับพีเอชของสารละลายผสมให้เป็น 6.7 ด้วย 6 M NaOH แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ลบ.ซม.

ฉ. Separating gel

ผสมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 1.0 M พีเอช 4.3 ปริมาตร 2 ลบ.ซม. อะคริลาไมด์ 60% 4 ลบ.ซม. และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 ลบ.ซม. เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน

ช. Stacking gel

ผสมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.5 M พีเอช 6.7 ปริมาตร 1 ลบ.ซม. อะคริลาไมด์ 10% 2 ลบ.ซม. และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 5 ลบ.ซม. เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน

ซ. สารละลายบัฟเฟอร์อิเล็คโทรด พีเอช 4.5

เตรียมโดยชั่ง β-alanine 31.2 กรัม ละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 8 ลบ.ซม. เติมน้ำกลั่น ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็น 4.5 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรของสารละลายเป็น 1 ลิตร

ฌ. สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

เตรียมโดยชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.0280 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 10 ลบ.ซม. (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ญ. สารละลายบัฟเฟอร์ของสารตัวอย่าง

เตรียมได้โดยชั่งซูโครส 1 กรัม และ basic fuchsin 2 มก. ละลายในอะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอช 6.7 แล้วปรับปริมาตรสารละลายเป็น 10 ลบ.ซม.

ฎ. สารละลายของตัวอย่าง

ผสมสารตัวอย่างกับสารละลายบัฟเฟอร์ของสารตัวอย่าง ในอัตราส่วน 1 : 1 นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะนำไปทำอิเลคโตรฟอริซิส

ฎ. **สารละลายสีย้อมโปรตีน**

ผสมเมทานอล สารละลาย coomassie brilliant blue R-250 0.25% ในน้ำกลั่น และกรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 5 : 4 : 1 โดยปริมาตร

ฐ. **สารละลายล้างสีย้อมโปรตีน**

ผสมกรดอะซิติกเข้มข้น 75 ลบ.ซม. และเอธานอล 50 ลบ.ซม. เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ฑ. **สารละลายปาเปนมาตรฐาน**

ละลายปาเปน 50 มก. ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 5 ลบ.ซม.

2.2.3.2 **วิธีการแยกไธออลโปรติเอส**

การแยกไธออลโปรติเอสชนิดต่างๆ ในยางมะละกอนั้น ได้ใช้วิธีของ Kimmel และ Smith[16] ซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 40% อิ่มตัวแยกปาเปนออกจากสารละลายของยางมะละกอบแห้ง แล้วจึงทำบริสุทธิ์ปาเปนโดยการตกผลึกใหม่ในโซเดียมคลอไรด์ 10% ในที่นี้ได้ตรวจหาองค์ประกอบของไธออลโปรติเอสในยางมะละกอสดก่อนที่จะแยกปาเปน โดยการตกตะกอนแยกไธออลโปรติเอสออกจากสารละลายยางมะละกอสดด้วยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ

ก. **การทำบริสุทธิ์ปาเปน**

ในการทำบริสุทธิ์ปาเปนนี้ ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Kimmel และ Smith[15] ซึ่งทำได้โดยผสมยางมะละกอสด 10 กรัม กับทรายที่ล้างแล้ว 7 กรัม ในโกร่งบดสาร เติมสารละลายซิสเทอีน 0.04 M 10 ลบ.ซม. บดสารผสม 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เซนตริฟิวจ์แยกสารละลายใสเก็บไว้ สกัดเอนไซม์อีกครั้งด้วยสารละลายซิสเทอีน 10 ลบ.ซม. รวมสารละลายใสที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้ง ค่อยๆ เติมสารละลาย NaOH 1.0 M ให้พีเอชของสารละลายเท่ากับ 9 แยกสารละลายใสไปทำให้เย็นที่ 4°C แล้วเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น 40% ของสารละลายอิ่มตัว คนสารละลาย 1 คืน แยกตะกอนมาละลายด้วยสารละลายซิสเทอีน 0.02 M 10 ลบ.ซม. ตกตะกอนโดยเติมโซเดียมคลอไรด์ 2 กรัมช้าๆ กวนสารละลายที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน เซนตริฟิวจ์ที่ 6,000xg 30 นาที 4°C แยกตะกอนมาละลายในสารละลายซิสเทอีน 2 mM พีเอช 6.5 10 ลบ.ซม. ที่อุณหภูมิห้องและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน เซนตริฟิวจ์แยกตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น โดยให้มีความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 1% (w/v) นำสารละลายที่ได้มาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว ในอัตราส่วนของสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัวต่อสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้เท่ากับ 1:30 (โดยปริมาตร) อย่างช้าๆ พร้อมกับคนสารละลาย ตั้งไว้

ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน เซนตริฟิวจ์แยกตะกอนปาเปนที่ได้ มาละลายในสารละลายซิส-เทอีน 0.02 M 5 ลบ.ซม. กำจัดเกลือออกด้วยไดอะไลซิสใน 5 mM ซิสเทอีนที่ 4°C 48 ชั่วโมง วัดปริมาตรก่อนตรวจสอบด้วยแคโทดอิเลคโตรฟอริซิส

ข. การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 20-80% ของสารละลายอิ่มตัว

เตรียมสารสกัดหยาบของไธออลโปรติเอสโดยชั่งยางมะละกอดิบ 10 กรัม และทรายที่ล้างแล้ว 14 กรัม ใส่ลงในโกร่งบดสาร เติมสารละลายซิสเทอีน 0.04 M 10 ลบ.ซม. บดที่อุณหภูมิห้อง เซนตริฟิวจ์แยกสารละลายใสเก็บไว้ เติมสารละลายซิสเทอีนลงในตะกอนอีก 10 ลบ.ซม. และบดซ้ำอีกครั้ง กรองผ่าน buchner funnel โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 ล้างตะกอนด้วยสารละลายซิสเทอีน นำสารละลายใสที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนที่ไม่ต้องการ โดยเติมสารละลาย 1.0 M NaOH ช้าๆ พร้อมกับคนสารละลายตลอดเวลา จนพีเอชของสารละลายเท่ากับ 9 เซนตริฟิวจ์แยกตะกอนทิ้งไป นำสารสกัดหยาบที่ได้มาตกตะกอน โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น 20% ของสารละลายอิ่มตัว คนสารละลายช้าๆ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน เซนตริฟิวจ์แยกสารละลายใสมาตกตะกอนต่อด้วย 30-80% ของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวในทำนองเดียวกับการตกตะกอนครั้งแรก นำตะกอนที่แยกได้ไปล้างด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนนั้นๆ ละลายตะกอนด้วยสารละลายซิสเทอีน 20 mM 10 ลบ.ซม. ไดอะไลส์ใน 5 mM ซิสเทอีน 48 ชั่วโมง วัดปริมาตรและตรวจสอบด้วยอิเลคโตรฟอริซิส

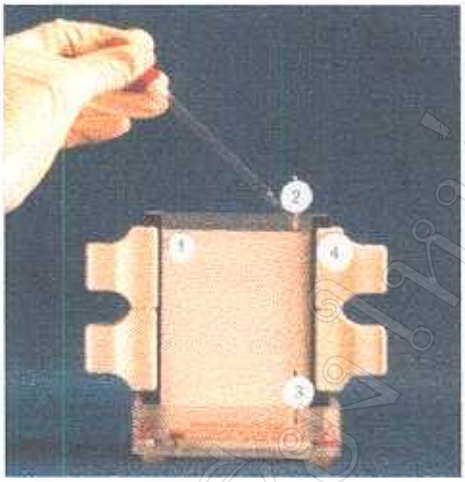
2.2.3.3 วิธีหาปริมาณโปรตีน

ในการหาปริมาณโปรตีนได้ใช้วิธี Bradford[61] ซึ่งเตรียมโดยใช้หลอดทดลอง 3 หลอด ปิเปตสารละลายโปรติเอส 0.10 ลบ.ซม. ใส่ลงในหลอดที่ 2 และ3 เติมน้ำกลั่นทุกหลอดให้ปริมาตรครบ 0.70 ลบ.ซม. ตามลำดับ เติมสารละลายสีย้อมลงไป 4.30 ลบ.ซม. ในทุกหลอด ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำสารละลายไปวัด A_{595} โดยให้หลอดที่ 1 เป็นสารละลายเปรียบเทียบโดยใช้ BSA เป็นสารละลายมาตรฐาน

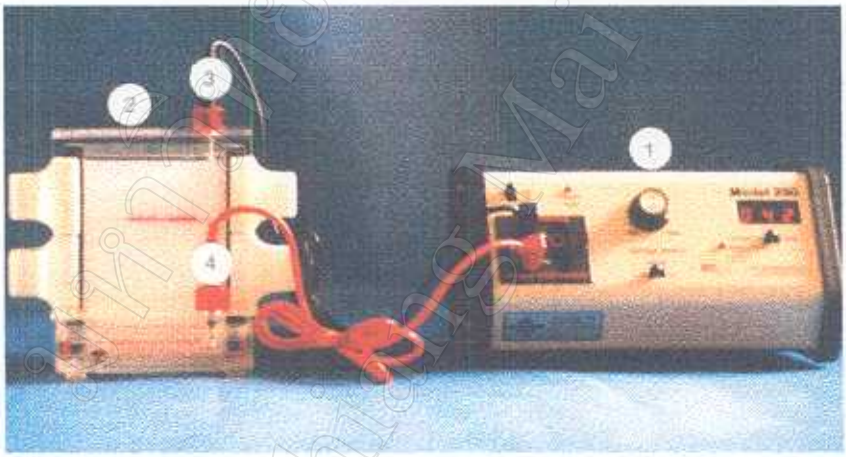
2.2.3.4 วิธีทำแคโทดโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรฟอริซิส[8,62]

ประกบแผ่นกระจกขนาด 10x12 ซม. ของชุดทำอิเลคโตรฟอริซิสเข้ากับแผ่นอะลูมินาโดยใส่ spacer ทางขอบด้านข้างระหว่างแผ่นทั้งสอง นำไปวางทับบนแผ่นที่เป็นร่องรูปตัวยู (chamber บน) ใช้คลิปหนีบด้านข้างเพื่อยึดให้ส่วนที่เป็นกระจก spacer แผ่นอะลูมินา และchamber บน เข้าด้วยกัน นำไปวางในตำแหน่งที่ตั้งใน chamber ล่าง จากนั้นปิดขอบด้านล่างของแผ่น

กระจกด้วยสารละลายอะกาโรส 10% (w/v) ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 50°C เมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้ว ค่อยๆ ใส่สารละลาย separating gel ลงไปในช่องว่างของกระจกทางด้านบน ดังรูปที่ 2.1 โดยให้ระดับของสารละลายเจลอยู่ห่างจากขอบบนของกระจกประมาณ 2 ซม. แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปเบาๆ บนหน้าเจลให้เต็มช่องว่าง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อ separating gel แข็งตัวแล้ว รินน้ำออกจากเจลให้หมด ตั้งเครื่องมือลงเช่นเดิม จากนั้นใส่สารละลาย stacking gel ลงไปให้เต็มช่องว่าง แล้วเสียบแผ่นหวีลงไปบน stacking gel ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อ stacking gel แข็งตัวแล้ว เติมอิเล็คโทรดบัฟเฟอร์ลงใน chamber บนและล่าง ดึงแผ่นหวีออกจาก stacking gel ใส่สารละลายตัวอย่างที่ต้องการศึกษาจากการตกตะกอนไธออลโปรติเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งเตรียมดังข้อ 2.2.3.1 ฎ ลงไปในช่องจากซ้ายไปขวาโดยช่องที่ 1 และ 8 ใส่สารละลายปาเปนมาตรฐาน 2 ไมโครลิตร ช่องที่ 2 ใส่สารสกัดหยาบของเอนไซม์ 1 ไมโครลิตร ช่องที่ 3-7 ใส่สารละลายไธออลโปรติเอสที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 40, 50, 60, 70 และ 80% ของสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาตร 8, 5, 4, 8 และ 15 ไมโครลิตร ตามลำดับ สำหรับสารละลายไธออลโปรติเอสที่ได้จากขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ปาเปนนำมาศึกษาโดยช่องที่ 1 และ 6 ใส่สารละลายมาตรฐานปาเปน 2 ไมโครลิตร ช่องที่ 2 ใส่สารสกัดหยาบของเอนไซม์ 1.3 ไมโครลิตร ช่องที่ 3 ใส่สารละลายที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 40% ของสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต 2.3 ไมโครลิตร ช่องที่ 4 และ 5 ใส่สารละลายไธออลโปรติเอสที่ได้จากการทำปาเปนให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการตกผลึกครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ด้วยสารละลาย 10% NaCl 1.2 ไมโครลิตร หลังจากใส่สารละลายลงในแต่ละช่องแล้วปิดฝา chamber ต่อสายไฟเชื่อมอิเล็คโทรดจาก chamber บนและ chamber ล่างเข้ากับขั้วบวกและลบของเครื่องจ่ายกระแสไฟ ตามลำดับ ปรับให้กระแสไฟฟ้าเข้าสู่แผ่นเจลประมาณ 40 มิลลิแอมแปร์ ดังรูปที่ 2.2 เมื่อเห็นสีแดงของ basic fuchsin เคลื่อนที่ลงมาถึงปลายล่างของเจลให้หยุดผ่านกระแสไฟฟ้า ถอดอุปกรณ์ แล้วค่อยๆ ลอกแผ่นเจลออกจากแผ่นอะลูมินา ระวังอย่าให้เจลขาด นำแผ่นเจลไปย้อมสีโปรตีนโดยวางแผ่นเจลลงในกล่องพลาสติคซึ่งมีสารละลายสีย้อมพอท่วมแผ่นเจล ปิดฝากล่อง นำไปเขย่าบน platform shaker ด้วยความเร็ว 10 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างในสารละลายล้างสีย้อม เขย่าด้วยความเร็วเท่าเดิมเป็นเวลา 1 คืน เปลี่ยนน้ำยาล้างสีย้อม 2 ครั้งหรือจนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนบนแผ่นเจลใส นำไปถ่ายรูปโดยวางแผ่นเจลบนกล่องแสง



รูป 2.1 วิธีใส่สารละลาย separating gel หรือ stacking gel ลงในช่องว่างของกระจก เพื่อเตรียม slab gel (1=ชุด slab gel, 2=chamber บน, 3=chamber ล่าง และ 4=คลิปหนีบ)



รูป 2.2 การติดตั้งเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าจาก power supply (1) เข้าสู่แผ่นเจล (2) โดยต่อขั้วบวกเข้ากับ chamber บน (3) และขั้วลบเข้ากับ chamber ล่าง (4)

2.2.4 การเตรียมไธออลโปรติเอสในรูปยางมะละกออบแห้ง

ไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอเป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ดี ดังนั้นจึงสามารถเตรียมโดยการอบแห้งยางมะละกอ ซึ่งทำให้ได้ยางมะละกอแห้งที่มีไธออลโปรติเอสที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ และในการอบยางมะละกอให้แห้งโดยที่ยังคงมีประสิทธิภาพของ

ไธออลโปรติเอสสูงนั้นต้องเลือกอุณหภูมิควบคู่กับระยะเวลาของการอบ และพื้นที่ผิวของน้ำยางในระหว่างที่อบด้วย

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบเตรียมได้โดย ใส่ยางมะละกอ 1 กรัม ลงในถ้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (ϕ) 3 ซม. 6 ถ้วย สำหรับถ้วยที่ 1-3 ไม่ต้องเติม KMS ส่วนถ้วยที่ 4-6 เติม KMS 0.5% โดยน้ำหนัก เกลี่ยยางในแต่ละถ้วยให้หนาประมาณ 1 มม. นำถ้วยที่ 1 กับ 4, 2 กับ 5 และ 3 กับ 6 ไปอบที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80°C ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการอบทำโดย ใส่ยางมะละกอ 1 กรัม ลงในถ้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ (ϕ = 3 ซม.) 10 ถ้วย ถ้วยที่ 1-5 ไม่ต้องเติม KMS แต่เติม KMS ลงในถ้วยที่ 6-10 ปริมาณ 0.5% โดยน้ำหนัก เกลี่ยยางให้หนาประมาณ 1 มม. นำถ้วยที่ 1 กับ 6, 2 กับ 7, 3 กับ 8, 4 กับ 9 และ 5 กับ 10 ไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4, และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ

การหาปริมาณ KMS ที่เหมาะสมสำหรับการเติมลงในน้ำยางมะละกอเพื่อให้ได้ยางแห้งที่มีประสิทธิภาพสูงทำโดย ใส่ยางมะละกอลงในถ้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ (ϕ = 3 ซม.) 6 ถ้วยๆ ละ 1 กรัม และเติม KMS ปริมาณ 0, 0.05, 0.5, 5, 50, 100% โดยน้ำหนักลงไปในถ้วยใบที่ 1-6 ตามลำดับ ผสมให้สารเข้ากันดีแล้วเกลี่ยยางให้หนาประมาณ 1 มม. นำทั้งหกถ้วยไปอบที่อุณหภูมิ 60°C จนแห้ง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

ชั่งน้ำหนักยางมะละกออบแห้งที่ได้จากวิธีต่างๆ และหาแอคติวิตีของโปรติเอสในยางมะละกออบแห้งที่ได้ในสารละลายพีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 37°C โดยละลายยางอบแห้งที่ได้ทั้งหมดในสารละลายซิสเทอีน 5 mM ให้ปริมาตรครบ 10 ลบ.ซม.

2.2.5 การตรึงไธออลโปรติเอส

ไธออลโปรติเอสที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นไธออลโปรติเอสที่อยู่ในรูปของยางมะละกออบแห้ง ซึ่งเตรียมจากการอบแห้งยางมะละกอ 25 กรัม ในตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และมีแอคติวิตี 7-12 และ 20-23 ยูนิต/มก. เมื่อย่อยเคซีนที่ 37°C และ 80°C ตามลำดับ ทดสอบการตรึงไธออลโปรติเอสโดยวิธีดักจับด้วยอัลจิเนต วิธีดูดติดไว้บนทราย เบนโทไนท์และซีไลท์ และวิธีจับโดยไอออนด้วยแอมเบอร์ไลท์ XAD-7 ดูโอไลท์ A-368 ดูโอไลท์ C-280 ดูโอไลท์ C-464 CM-เซลลูโลส และDEAE-เซลลูโลส ทั้งนี้เพื่อเลือกใช้ประโยชน์ในการย่อยโปรตีนในถั่วเหลือง

2.2.5.1 วิธีตรึงบนตัวยึดชนิดต่างๆ

ก. วิธีตรึงด้วยการดักจับ[63]

ค่อยๆ เติมโซเดียมอัลจิเนต 0.2 กรัม ลงในสารละลายซิสเทอีน 5 mM 5 ลบ.ซม. เมื่ออัลจิเนตละลายหมด จึงเติมไธออลโปรติเอส 50 มก. ลงไป กวนสารผสมให้เข้ากัน ใช้กระบอกฉีดยา (syringe) ดูดสารละลายนี้หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.05 M ที่แช่เย็น และคนเบาๆ ตลอดเวลาด้วยแท่งแม่เหล็ก คนสารละลายต่อไป โดยให้เอนไซม์ตรึงอยู่ในสารละลายต่อไปอีก 3 ชั่วโมง แยกเอนไซม์ตรึงไปชั่งน้ำหนัก และหาแอคติวิตีของโปรติเอส

ข. วิธีตรึงด้วยการดูดติดและการจับด้วยแรงไอออน[12]

เตรียมตัวยึดต่างๆ โดยชั่ง ทราย เบนโทไนท์ ซีไลท์ แอมเบอร์ไลท์ XAD-7 ดูโอไลท์ A-368 ดูโอไลท์ C-280 ดูโอไลท์ C-464 CM-เซลลูโลส และDEAE-เซลลูโลส อย่างละ 1 กรัม เขย่าในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M พีเอช 7 เป็นเวลา 20 นาที ปิเปตสารละลายออกให้อยู่ในระดับปริ่มตัวยึด เติมสารละลายไธออลโปรติเอส 10 มก./ลบ.ซม. ปริมาตร 2 ลบ.ซม. เขย่าที่ 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างเอนไซม์ตรึงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดียวกับที่ใช้ในการตรึงก่อนที่จะนำไปหาแอคติวิตี

2.2.5.2 วิธีหาแอคติวิตีไธออลโปรติเอสตรึง[64]

ใส่เอนไซม์ตรึง 50 ไมโครลิตร (กรณีของอัลจิเนตใช้ 50 ไมโครกรัม) ลงในหลอดทดลองที่มีขีดบอกปริมาตร 3 หลอด เติมสารละลาย activating agent 0.1 ลบ.ซม และปรับปริมาตรเป็น 1 ลบ.ซม. ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 7 อุ่นที่ 37°C 5 นาที หลอดที่ 2 และ 3 เติมสารละลายเคซีน 2.0 ลบ.ซม. ลงไป อุ่นสารละลายทุกหลอดพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิเดิมต่อไปอีก 10 นาที ในหลอดที่ 2 และ 3 ดึงสารละลายออกมาหลอดละ 1 ลบ.ซม. ใส่ลงในสารละลาย 5% TCA ปริมาตร 1.5 ลบ.ซม. ที่แช่ในอ่างน้ำแข็ง ส่วนหลอดที่ 1 แช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วจึงเติมสารละลายเคซีน 2.0 ลบ.ซม. ลงไป เขย่าหลอดแล้วแบ่งสารละลาย 1 ลบ.ซม. ใส่ลงในสารละลาย 5% TCA ที่เย็น 1.5 ลบ.ซม. เซนตริฟิวจ์สารละลายผสมทุกหลอดที่ 6,000xg เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยให้สารละลายในหลอดที่ 1 เป็นสารละลายเปรียบเทียบ นำค่า A_{275} ที่ได้จากการทดลองไปเทียบหาแอคติวิตีจากกราฟมาตรฐานไทโรซีน

2.2.6 การปรับสภาวะการตรึงไธออลโปรติเอสด้วยดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส

ไธออลโปรติเอสในยางมะละกอที่ถูกตรึงด้วยดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส ถูกเลือกมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานเพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

2.2.6.1 วิธีเตรียมสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 3, 4 และ 5

ชั่งกรดซิตริก 5.25 กรัม ลงในบีกเกอร์ 3 ใบ ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอชของสารละลายในบีกเกอร์ใบที่ 1, 2 และ 3 ให้เป็น 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ปรับปริมาตรของสารละลายในแต่ละพีเอชให้ครบ 500 ลบ.ซม.

2.2.6.2 วิธีหาปริมาณตัวยึดที่เหมาะสม

ใส่ดูโอไลท์ A-368 ปริมาณต่างๆ (1, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 และ 30 กรัม) CM-เซลลูโลส ปริมาณ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, และ 1.0 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 7 ให้ท่วมตัวยึด เขย่าสารผสม 20 นาที ปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์ออกให้อยู่ในระดับปริ่มตัวยึด เติมสารละลายไธออลโปรติเอส 10 มก./ลบ.ซม. ปริมาตร 2 ลบ.ซม. เขย่าที่ 25°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ใช้สารละลายบัฟเฟอร์เดียวกับที่ใช้ในการตรึงล้างเอนไซม์ตรึงหาแอคติวิตีโดยใช้เอนไซม์ตรึง 40 ไมโครลิตร ไฮโดรไลส์เคซีนที่ 37°C และ 80°C ตามลำดับ และแบ่งใช้สารละลายในขั้นตอนของการหยุดปฏิกิริยาเท่ากับ 0.5 ลบ.ซม.

2.2.6.3 วิธีหาพีเอชที่เหมาะสมในการตรึง

ใส่ดูโอไลท์ A-368 ปริมาณ 10 กรัม ลงในบีกเกอร์ 8 ใบ เติมสารละลาย 0.05 M ซิเตรทบัฟเฟอร์พีเอช 3, 4, 5 และ 6 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 และ 8 บอริกบัฟเฟอร์พีเอช 9 และ 10 ปริมาตร 10 ลบ.ซม. เขย่าสารผสมทั้งหมด 20 นาที ปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์ออกให้อยู่ในระดับปริ่มตัวยึด เติมสารละลายไธออลโปรติเอส 10 มก./ลบ.ซม. ที่เตรียมในบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ ดังกล่าว ปริมาตร 2 ลบ.ซม. เขย่าที่ 25°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างเอนไซม์ตรึงด้วยน้ำกลั่นก่อนที่จะนำไปหาแอคติวิตี ซึ่งใช้ไธออลโปรติเอสตรึงด้วย ดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส ปริมาตร 50 และ 20 ไมโครลิตร ไฮโดรไลส์เคซีนที่ 37°C และ 80°C ตามลำดับ โดยแบ่งใช้สารละลายในขั้นตอนของการหยุดปฏิกิริยาเท่ากับ 1 ลบ.ซม. ในกรณีของ CM-เซลลูโลส ใช้สารตัวยึดปริมาณ 0.5 กรัม ทำการเตรียมเอนไซม์ตรึงเช่นเดียวกับดูโอไลท์ A-368

2.2.7 การศึกษาสมบัติของไธออลโปรติเอสตรึงด้วยดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส

2.2.7.1 วิธีตรึงเอนไซม์

ใส่ดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส ปริมาณ 10 และ 0.5 กรัม ตามลำดับ ลงในบีกเกอร์ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 6 และ 9 ปริมาตร 10 ลบ.ซม. เขย่าสารผสมทั้งหมด 20 นาที ปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์ออกให้อยู่ในระดับปริ่มตัวยึด เติมสารละลายไธออลโปรติเอส 10 มก./ลบ.ซม. ที่เตรียมในบัฟเฟอร์พีเอชดังกล่าว ปริมาตร 2 ลบ.ซม. เขย่าที่ 25°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างเอนไซม์ตรึงด้วยน้ำกลั่นก่อนที่จะนำไปหาแอคติวิตี

2.2.7.2 วิธีหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไธออลโปรติเอสตรึง

หาแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงบนดูโอไลท์ A-368 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่มีสารละลาย activating agent 0.10 ลบ.ซม และปรับปริมาตรเป็น 1 ลบ.ซม. ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M พีเอช 7 ในการไฮโดรไลส์เคซีน 2 ลบ.ซม. ที่อุณหภูมิต่างๆ (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90°C) เป็นเวลา 10 นาที โดยแบ่งสารละลายที่ได้จากการย่อยมา 1.0 ลบ.ซม. เพื่อหยุดปฏิกิริยาด้วย TCA โดยที่ในแต่ละอุณหภูมิทำการทดลอง 3 หลอด หลอดแรกเป็นหลอดเปรียบเทียบ และอีก 2 หลอดเป็นตัวอย่าง ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้ โดยใช้ไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลสแทนในปริมาตร 20 ไมโครลิตร และแบ่งสารละลาย 0.5 ลบ.ซม. มาเติม TCA

2.2.7.3 วิธีหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของไธออลโปรติเอสตรึง

หาแอคติวิตีในการไฮโดรไลส์เอนไซม์ตรึงบนดูโอไลท์ A-368 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีสารละลาย activating agent 0.10 ลบ.ซม และปรับปริมาตรเป็น 1 ลบ.ซม. ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอชต่างๆ (6, 7, 8, 9 และ 10) ทำการไฮโดรไลส์เคซีน 2 ลบ.ซม. ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที แบ่งสารละลายที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึง 1.0 ลบ.ซม. เพื่อหยุดปฏิกิริยาด้วย TCA โดยในแต่ละพีเอชทำการทดลอง 3 หลอด หลอดแรกเป็นหลอดเปรียบเทียบ และอีก 2 หลอดเป็นตัวอย่าง กรณีของไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้ โดยใช้เอนไซม์ตรึงปริมาตร 20 ไมโครลิตร หาแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 80 °C และแบ่งสารละลาย 0.5 ลบ.ซม. มาเติม TCA

2.2.7.4 วิธีหาประสิทธิภาพของการตรึง

หาแอคติวิตีของโปรติเอสตรึงบนดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส ปริมาตร 50 และ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ ในการไฮโดรไลส์เคซีนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M

พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 37°C และ 80°C 10 นาที ดังวิธีในข้อ 2.2.5.2 ล้างเอนไซม์ตรึงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน 1 ลบ.ซม. 2 ครั้ง ก่อนนำไปหาแอคติวิตีซ้ำต่อไปอีก 3 ครั้ง

2.2.8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการไฮโดรไลส์โปรตีนในถั่วเหลืองโดยไธออลโปรติเอสอิสระและตรึงด้วย CM-เซลลูโลส

เนื่องจากไธออลโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลสมีประสิทธิภาพสูงกว่าการตรึงบนดูโอไลท์ A-368 และสามารถใช้ในอุณหภูมิสูงได้ดีกว่า ดังนั้นจึงได้ตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานในการย่อยโปรตีนในนมถั่วเหลือง โดยใช้โปรติเอสตรึงด้วย CM-เซลลูโลส และเอนไซม์อิสระจากยางมะละกอบแห้ง โดยที่ได้ตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยและประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงเพื่อใช้ในการหาเปอร์เซ็นต์โปรตีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตรึงเทียบกับเอนไซม์อิสระ

2.2.8.1 วิธีเตรียมสารละลาย

ก. น้ำเต้าหู้

แช่ถั่วเหลือง 2 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองนั้นๆ ปริมาตร 100 ลบ.ซม. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นจนละเอียด กรองแยกส่วนที่เป็นกากทิ้ง ต้มสารละลายที่ได้จนเดือด 5 นาที จะได้น้ำเต้าหู้ เก็บไว้ในตู้เย็นใช้ได้ใน 1 สัปดาห์

ข. นมถั่วเหลืองดอยคำ

เตรียมโดยใช้นมถั่วเหลืองผงจากโครงการหลวงดอยคำ 1 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองนั้นๆ ปริมาตร 100 ลบ.ซม.

ค. สารละลายไธออลโปรติเอสอิสระ

ละลายยางอบแห้ง 0.10 กรัม ในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 10 ลบ.ซม. เซนตริฟิวจ์แยกตะกอนที่ไม่ละลายออกที่ 6,000xg 5นาที

ง. ไธออลโปรติเอสตรึง

ตรึงไธออลโปรติเอส 10 มก./ลบ.ซม. (420 ยูนิต) ปริมาตร 2 ลบ.ซม. ด้วย CM-เซลลูโลส 10 กรัม ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 9 ที่ 25°C 3 ชั่วโมง ล้างเอนไซม์ตรึงด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองนั้นๆ และเก็บไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าว

2.2.8.2 วิธีหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ในการหาอุณหภูมิที่ไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอไฮโดรไลส์โปรตีนในถั่วเหลืองได้ดีที่สุดนี้ ทำโดยหาแอคติวิตีของไธออลโปรติเอสอิสระ 50 ไมโครลิตร ตามวิธีในข้อ 2.2.1.2 โดยใช้นมถั่วเหลืองดอยคำและน้ำเต้าหู้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 6 เป็นสับสเตรทแทนสารละลายเคซีน และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90°C

ในทำนองเดียวกัน การตรวจหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส ทำโดยใช้เอนไซม์ตรึงในปริมาตร 50 ไมโครลิตร เท่ากับเอนไซม์อิสระ และหาแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึง ดังวิธีในข้อ 2.2.5.2 โดยใช้น้ำเต้าหู้เป็นสับสเตรท ทำปฏิกิริยาในช่วงอุณหภูมิ 20-80°C

2.2.8.3 **วิธีหาพีเอชที่เหมาะสม**

การตรวจหาพีเอชที่เหมาะสมของไธออลโปรติเอสอิสระและที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส นั้น ทำโดยหาแอคติวิตีของไธออลโปรติเอสทั้งสอง อย่างละ 50 ไมโครลิตร ในการไฮโดรไลส์โปรตีนในนมถั่วเหลืองดอยคำและน้ำเต้าหู้แทนเคซีน ที่อุณหภูมิ 80°C ในสารละลาย 0.05 M ซิเตรทบัฟเฟอร์พีเอช 3, 4, 5 และ 6 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 และ 8 บอริกบัฟเฟอร์พีเอช 9 และ 10 โดยวิธีในข้อ 2.2.1.2 และ 2.2.5.2 สำหรับเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึง ตามลำดับ

2.2.8.4 **วิธีไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้**

การใช้ไธออลโปรติเอสอิสระและที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส เพื่อไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้นั้น ได้เลือกทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ทั้งสองซึ่งมีค่าเดียวกัน โดยสารละลายปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์ประกอบด้วยน้ำเต้าหู้ 250 ลบ.ซม. สารละลายซิสเทอีน 5 mM 50 ลบ.ซม. และสารละลายไธออลโปรติเอสอิสระ (0.10 มก./ลบ.ซม.) 20 ลบ.ซม. หรือไธออลโปรติเอสตรึงด้วย CM-เซลลูโลส 5 ลบ.ซม. แล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 6 ให้ปริมาตรเป็น 500 ลบ.ซม. ควบคุมอุณหภูมิของการไฮโดรไลส์ที่ 80°C 10 นาที ในส่วนของสารละลายเปรียบเทียบทำการทดลองควบคู่กัน โดยเติมเอนไซม์อิสระหรือเอนไซม์ตรึงหลังจากหยุดปฏิกิริยาโดย แช่สารละลายให้เย็นอย่างรวดเร็วที่ 4°C กรองแยกตะกอนไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ไม่ถูกย่อยต่อไป

2.2.8.5 **การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl**

นำโปรตีนในน้ำเต้าหู้ที่เหลือจากการไฮโดรไลส์ด้วยไธออลโปรติเอสอิสระ และที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส มาหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้ด้วยเอนไซม์อิสระและตรึง

ก. **วิธีเตรียมสารละลาย**

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40% (w/v)

เตรียมได้โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 ลบ.ซม.

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 M

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลายไฮโดรคลอริค 0.1 M

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 8.65 ลบ.ซม. ลงในน้ำกลั่น 900 ลบ.ซม. แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลายมาตรฐาน KHP 0.1000 M

เตรียมโดยชั่ง KHP 5.1055 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 ลบ.ซม.

สารละลายฟีนอฟทาลีน 1% (w/v)

เตรียมโดยชั่งฟีนอฟทาลีน 0.1 กรัม ละลายในเอธานอล 95% 10 ลบ.ซม.

สารละลายเมทิลเรด 1% (w/v)

เตรียมโดยชั่งเมทิลเรด 0.1 กรัม ละลายในเอธานอล 95% 10 ลบ.ซม.

ข. วิธีหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน KHP 0.1000 M 20 ลบ.ซม. ลงในขวด 3 ใบ หยดเมทิลเรดลงไป 2-3 หยด จากนั้นไทเทรตด้วย NaOH 0.1 M จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง บันทึกปริมาตร NaOH ที่ใช้ และคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH

ค. วิธีหาความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริค

ปิเปตสารละลาย 0.1042 M NaOH 20 ลบ.ซม. ลงในขวด 3 ใบ หยดฟีนอล์ฟทาลีนลงไป 2-3 หยด จากนั้นไทเทรตด้วย HCl 0.1 M จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นไม่มีสี บันทึกปริมาตร HCl ที่ใช้ และคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ HCl

ง. วิธีไฮโดรไลส์โปรตีน

ใส่โปรตีนตัวอย่าง 0.5 กรัม (น้ำหนักเปียก) boiling chip 5-10 เม็ด คอปเปอร์-ซัลเฟตแอนไฮดรัส 0.5 กรัม และกรดซัลฟุริคเข้มข้น 20 ลบ.ซม. ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 ลบ.ซม. ซึ่งวางอยู่ใน heating mental ทำการ reflux สารละลายจนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวใส ปล่อยให้สารละลายเย็นตัวลงและเทลงไปผสมกับน้ำกลั่น 100 ลบ.ซม. เทกลับลงในขวดก้นกลมใบเดิม ใส่ boiling chip ลงไป 10-20 เม็ด ต่อเข้ากับเครื่องควบแน่นซึ่งปลายอีกข้างหนึ่งของเครื่องควบแน่นจุ่มลงในสารละลายไฮโดรคลอริค 0.0889 M ที่เติมเมทิลเรดลงไป 2-3 หยด เติมสารละลาย 40% NaOH 90 ลบ.ซม. ลงไปในขวดกลั่นช้าๆ เริ่มให้ความร้อน กลั่นจนก๊าซแอมโมเนียหมด (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัสชื้น) นำสารละลายไปไทเทรตด้วย 0.1042 M NaOH บันทึกปริมาตร และนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total nitrogen)

2.2.8.6 วิธีหาประสิทธิภาพของไธออลโปรติเอสตรึงด้วย CM-เซลลูโลส

หาแอคติวิตีของโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในการไฮโดรไลส์น้ำเต้าหู้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M พีเอช 6 ที่อุณหภูมิ 80°C 10 นาที ดังวิธีในข้อ 2.2.5.2 ล้างเอนไซม์ตรึงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ก่อนนำไปหาแอคติวิตีซ้ำต่อไปอีก 3 ครั้ง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University