บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

เครื่องมือ

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น GVC CINTRA 40 ของ GBC Sciencific Equipment Pty Ltd. (Australia)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Refrigerated Centrifuge) รุ่น High Speed Brushless Centrifuge MPW-350R ของ MPW MED. INSTRUMENT (Poland)
3. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) รุ่น C25KC Classic Incubator Shaker ของ New Brunswick Scientific Co., INC. (USA)
4. เครื่องวัดพีเอช (pH Meter) รุ่น DENVER BASIC ของ DENVER Instrument Company (USA)
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) รุ่น Julabo EcoTemp TW20 ของ Julabo Labolatory (Germany)
6. เตาไฟฟ้า (Hotplate) รุ่น Heat-Stir CB162 (Stuart) ของ BIBBY STERILIN LTD, STONE, STAFFORDSHIRE, STISOSA (United Kingdom)
7. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light Microscope รุ่น OLYMPUS CH30 ของ OLYMPUS OPTICAL CO., LTD. (Japan)
8. กล้องดิจิตอลถ่ายรูปสไลด์ใต้กล้องจุลทรรศน์ รุ่น Moticam (Motic Images Plus 2.0 ML) ของ MOTIC CHINA GROUP CO., LTD. (China)
9. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Electronically Controlled Incubators) รุ่น CELSIUS 2000 (Memmert) ของ (Germany)
10. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น CP3202S (Sartorius) ของ Sartorius AG. (Germany)
11. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น CP224S (Sartorius) ของ Sartorius AG. (Germany)
12. เครื่องปั่นผสม รุ่น VORTEX-GENIE 2 ของ SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC. (USA)
13. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (Digital Camera) รุ่น COOLPIX 5400 (Nikon) ของ Nikon Corporation (Japan)

วัสดุอุปกรณ์

1. Haemacytometer
2. Cork Borrer
3. กระดาษสำหรับแยกสารทางโครมาโตกราฟฟี

สารเคมี

1. NaCl
2. สารละลายไอโอดีน
3. สารละลาย DNS
4. KH_2PO_4
5. $MgSO_4.7H_2O$
6. $CaCl_2.2H_2O$
7. Sodium Acetate
8. Rose Bengal
9. Soluble Starch
10. Cassava Starch
11. HCl
12. H_2SO_4
13. $Ba(OH)_2$

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Agar
2. Potato Dextose Agar
3. Peptone

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสบนอาหารแข็ง

(ดัดแปลงจาก Hamilton, Kelly, & Fogarty, 1999)

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่าง ๆ (ภาคผนวก ก ข้อ1) แหล่งละประมาณ 50 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกที่ปลอดเชื้อ

1.2 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสบนอาหารแข็ง

1.2.1 นำตัวอย่างดินจากแหล่งต่าง ๆ แหล่งละ 25 กรัม ใส่ใน 0.1% Peptone Water ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากัน

1.2.2 นำตัวอย่างดินที่ผสมให้เข้ากันนั้น มาให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิประมาณ 80-100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเจือจางที่เหมาะสม

1.2.3 ดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา Spread Plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หรือ PDA ที่มี Soluble Starch 1% (w/v) (ภาคผนวก ก ข้อ3)

1.2.4 บ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน กรณีของแอคติโนมัยซีตีส บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน และในกรณีของราบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-4 วัน

1.2.5 คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีตีสไอโซเลตที่แตกต่างกันให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

1.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งบนอาหารแข็ง

1.3.1 เพาะเชื้อบริสุทธิ์โดยการใช้เข็มเขี่ยแตะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หรือ PDA ที่มี Soluble Starch 1% (w/v)

1.3.2 บ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน กรณีของแอคติโนมัยซีตีสบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน และในกรณีของราบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-4 วัน

1.3.3 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรีย ราและแอคติโนมัยซีตีส หลังจากนั้นเทราดสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ก ข้อ3) ลงไป สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้น และทำการวัดขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้น

1.3.4 คำนวนประสิทธิภาพของการย่อยแป้งจาก อัตราส่วนขนาดของบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนี ดังนี้

$$\text{ประสิทธิภาพของการย่อยแป้ง} = \frac{\text{ขนาดของบริเวณใส (เซนติเมตร)}}{\text{ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร)}}$$

1.3.5 คัดเลือกโคโลนีที่ย่อยแป้งได้ โดยให้อัตราส่วนขนาดของบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนีสูง เก็บเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หรือ PDA ที่มี Soluble Starch 1% (w/v)

1.3.6 เก็บรักษาจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุก 1 เดือน

2. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในอาหารเหลวของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ (ดัดแปลงจาก Hamilton et al., 1999)

2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

2.1.1 แบคทีเรีย

2.1.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก ข้อ3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

2.1.1.2 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่จะผลิตเอนไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 Loopful

2.1.1.3 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน

2.1.1.4 ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

2.1.2 รา

2.1.2.1 เพาะเลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นาน 3-4 วัน

2.1.2.2 เตรียมสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.1.3 แอคติโนมัยซีตีส

2.1.3.1 เพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีตีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นาน 2 วัน

2.1.3.2 เตรียมสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่น ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น

2.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์

2.2.1 แบคทีเรีย

2.2.1.1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์โดยแบคทีเรีย (แสดงดังภาคผนวก ก ข้อ3) พีเอช 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใส่หัวเชื้อลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.2.1.2 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน

2.2.1.3 เก็บตัวอย่างมาทำการแยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2.2.1.4 ทำการเก็บส่วนสารละลายที่ได้

2.2.2 รา

2.2.2.1 เพาะเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์โดยรา (แสดงดังภาคผนวก ก ข้อ3) พีเอช 5.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใส่หัวเชื้อลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2.2.2 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน

2.2.2.3 เก็บตัวอย่างมาทำการแยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2.2.2.4 ทำการเก็บส่วนสารละลายที่ได้

2.2.3 แอคติโนมัยซีตีส

2.2.3.1 เพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีตีสในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์โดยแอคติโนมัยซีตีส (แสดงดังภาคผนวก ก ข้อ3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใส่หัวเชื้อลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2.3.2 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน

2.2.3.3 เก็บตัวอย่างมาทำการแยกเซลล์ของออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2.2.3.4 ทำการเก็บส่วนสารละลายที่ได้

2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยวิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Dinitrosalisylic Acid (DNS Method) (ดัดแปลงจาก Hamilton et al., 1999) ดังนี้

2.3.1 ชุดทดลอง : ใช้ปิเปตดูดซับสเตรท คือ 1% Soluble Starch (ภาคผนวก ข ข้อ1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง

2.3.2 เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางเหมาะสมแล้วด้วย 0.1 M Acetate Buffer พีเอช 5.5 (ภาคผนวก ข ข้อ1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป

2.3.3 บ่มที่อ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.3.4 เติมสารละลาย DNS (ภาคผนวก ข ข้อ1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.3.5 ต้มในน้ำเดือด 5 นาที

2.3.6 แช่ในน้ำเย็นต่ออีก 5 นาที

2.3.7 เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

2.3.8 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (Blank ใช้บัฟเฟอร์แทนเอนไซม์)

2.3.9 นำค่าที่ได้ไปคำนวนหาน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ได้เป็นค่า RS (ชุดตัวอย่าง)

หมายเหตุ: ชุดควบคุมทำเช่นเดียวกับชุดทดลองแต่หลังจากเติมสารละลายเอนไซม์แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดทันที จากนั้นทำตามขั้นตอนต่อมาเหมือนกัน นำค่าที่ได้ไปคำนวนหาน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสได้เป็นค่า RS (ชุดควบคุม)

คำนวนหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส จาก

$$\underset{\text{(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส}} = \frac{(\text{RSชุดตัวอย่าง} - \text{RSชุดควบคุม}) \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

2.3.10 คำนวนหากิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)

โดยกำหนดให้

1 หน่วย (Unit) ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ในสภาวะที่กำหนด

2.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากราและแอคติโนมัยซีตีส โดยวิธีวัดการลดลงของซับสเตรท (Iodine Method) (ดัดแปลงจาก Jin, Li, Zhang, & Yu, 2001)

2.4.1 ชุดทดลอง : ใช้ปิเปตดูดซับสเตรท (1% Soluble Starch) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง

2.4.2 เติมสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป

2.4.3 บ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2.4.4 เติมสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข ข้อ1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.4.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Blank ใช้บัฟเฟอร์แทนเอนไซม์)

2.4.6 นำค่าที่ได้ไปคำนวนหาปริมาณซับสเตรทที่ลดลงในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของแป้ง

หมายเหตุ: ชุดควบคุมทำการเติมสารละลายไอโอดีนก่อนเติมเอนไซม์ เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์จากนั้นทำตามขั้นตอนต่อมาเหมือนกัน นำค่าที่ได้ไปคำนวนหาปริมาณซับสเตรทที่ลดลงในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของแป้ง

คำนวนหาปริมาณซับสเตรทที่ลดลง จาก

$$\underset{\text{(มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม)}}{\text{ปริมาณซับสเตรทที่ลดลง}} = \left(\frac{\text{ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นในชุดควบคุม} - \text{ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นในชุดตัวอย่าง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}\right) \times \text{อัตราการเจือจาง}$$

2.4.7 คำนวนหากิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)

โดยกำหนดให้

1 หน่วยของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายแป้ง 1 มิลลิกรัม ในเวลา 10 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3. การจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่คัดเลือกได้

3.1 การจัดจำแนกแบคทีเรีย

3.1.1 ทำการจัดจำแนกแบคทีเรียเบื้องต้นโดยดูการติดสีแกรมของเซลล์ รูปร่างของเซลล์ การทดสอบตะตาเลส การทดสอบออกซิเดสและการสร้างสปอร์

3.1.2 เลือกใช้ชุดทดสอบ API ของ BIOMERIEUX Industry (France) ในการจัดจำแนกแบคทีเรียแต่ละกลุ่มที่เหมาะสม (ภาคผนวก ค ภาพที่ 24)

3.1.3 จัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบ API ที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม ขั้นตอนมีดังนี้

3.1.3.1 ทำการเตรียม Inocubation Box โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไป เพื่อให้เกิดความชื้น

3.1.3.2 วางแต่ละ Strip ลงใน Inocubation Box

3.1.3.3 คัดเลือกโคโลนีที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ เขี่ยลงใน API Medium โดยเตรียมสารละลายเซลล์ให้ได้ความขุ่นเซลล์เทียบเท่ากับ McFarland ที่เหมาะสม ผสมให้เข้ากัน

3.1.3.4 เพาะเลี้ยงเชื้อลงใน Strip โดยเอียง Inocubation Box เล็กน้อย (หลีกเลี่ยงการเกิดฟองอากาศที่บริเวณด้านล่างของช่องที่ทำการทดสอบและการเพาะเลี้ยงเชื้อในช่องที่ทำการทดสอบมากเกินไป)

3.1.3.5 บ่ม Strip ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม

3.1.3.6 อ่านผลที่ได้ใน Strip

3.1.3.7 บันทึกผลของแต่ละช่องที่ทำการทดสอบ โดยให้ผลเป็นผลบวก (+), ผลลบ (-) และ ผลที่ไม่ชัดเจน (?) ลงในใบบันทึกผล แล้วแปรผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

3.2 การจัดจำแนกรา

3.2.1 ทำการจัดจำแนกราเบื้องต้นโดยดูลักษณะของเส้นใย และดูสัณฐานวิทยาของราจากการใช้เทคนิค Slide Culture (ภาคผนวก ค ข้อ1) แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.2 ทำการถ่ายรูปสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของราที่คัดเลือกได้ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับ Smith's Introduction to Industrial Mycology (Onion, Allsopp, & Eggins, 1938)

3.3 การจัดจำแนกแอคติโนมัยซีตีส

3.3.1 ทำการจัดจำแนกแอคติโนมัยซีตีสโดยดูลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็ง

3.3.2 ดูลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับ Bergey's Manual of Determination Bacteriology Vol.4 (Williams, Sharpe, & Holt, 1989)

3.3.3 ทำการวิเคราะห์หาคุณสมบัติทางเคมีของเซลล์ ได้แก่ ชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิค (Diaminopimelic Acid-DAP) ในองค์ประกอบของผนังเซลล์และชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์เซลล์ (Whole-Cell Hydrolysate) โดยใช้หลักการของ Thin Layer Chromatography ดังนี้

3.3.3.1 **กรณีวิเคราะห์หาชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิคในองค์ประกอบของผนังเซลล์** (ดัดแปลงจาก รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2541) มีขั้นตอนดังนี้

3.3.3.1.1 นำเซลล์หรือเส้นใยปริมาณ 10 มิลลิกรัม มาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.3.3.1.2 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง

3.3.3.1.3 กรองกากเซลล์ทิ้ง นำส่วนสารละลายที่กรองได้มาระเหยให้แห้ง

3.3.3.1.4 ล้างส่วนสารละลายที่ติดก้นหลอดด้วยน้ำกลั่น แล้วระเหยให้แห้งอีก 2 ครั้ง

3.3.3.1.5 นำส่วนสารละลายที่แห้งติดก้นหลอด มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร

3.3.3.1.6 นำมาจุดลงบนกระดาษโครมาโตกราฟฟี เปรียบเทียบกับจุดของ Meso-DAP โดยมีสารละลายชะประกอบด้วย เมธานอล ต่อ น้ำ ต่อ กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10 นอร์มอล ต่อ ไพริดีน ในอัตราส่วน 80 ต่อ 17.5 ต่อ 2.5 ต่อ 10 ใช้เวลาในการชะนานประมาณ 2 ชั่วโมง

3.3.3.1.7 ตรวจดูตำแหน่งของสารด้วยสารละลายนินไฮดริน (Ninhydrin) เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรในอะซิโตน

3.3.3.1.8 นำกระดาษไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีหรือจนกว่าจะเห็นสาร

3.3.3.2 **กรณีวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์เซลล์** (Whole-Cell Hydrolysate) มีขั้นตอนดังนี้

3.3.3.2.1 นำเซลล์หรือเส้นใยปริมาณ 10 มิลลิกรัม มาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟุริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.3.3.2.2 ให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

3.3.3.2.3 กรองกากเซลล์ทิ้ง

3.3.3.2.4 นำส่วนสารละลายที่กรองได้ปรับพีเอชด้วยแบเรียมไฮดรอกไซด์ให้ได้พีเอชประมาณ 5.0-5.5

3.3.3.2.5 นำมาจุดลงบนกระดาษโครมาโตกราฟฟี โดยมีน้ำตาลกาแลคโทส แมนโนส ไซโลส อะราบิโนส ไรโบส กลูโคส และแรมโนสเป็นสารละลายมาตรฐาน โดยมีสารละลายชะประกอบด้วย บิวทานอล ต่อ ไพริดีน ต่อ น้ำ ต่อ โทลูอีน ในอัตราส่วน 5 ต่อ 3 ต่อ 3 ต่อ 4 ใช้เวลาในการชะนานประมาณ 2 ชั่วโมง

3.3.3.2.6 ตรวจดูตำแหน่งของสารด้วยสารละลายกรดของ Aniline Phtalate (3.25 กรัม กรด Pthalic ใน 100 มิลลิลิตรของบิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำเติม Aniline 2 มิลลิลิตร)

3.3.3.2.7 นำกระดาษไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีหรือจนกว่าจะเห็นสาร

4. การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ (ดัดแปลงจาก Soni, Kaur, & Gupta, 2003)

4.1 เตรียมหลอดทดลองที่มี 8 มิลลิลิตร ของสารละลายแป้ง (แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M Acetate Buffer pH 5.5)

4.2 เติมสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตจากไอโซเลตที่คัดเลือกได้ในอัตราส่วน 1 หน่วย ต่อ แป้งมันสำปะหลัง 1 มิลลิกรัม

4.3 บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยทำการเขย่าทุก ๆ 5 นาที

4.4 ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยวัดการลดลงของซับสเตรทตามขั้นตอนในข้อ 2.4 ของตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้นและที่เวลาผ่านไป 30 นาที

4.5 นำค่าที่ได้ไปคำนวนหาปริมาณแป้งที่ถูกย่อยไปในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลายไอโอดีน

หมายเหตุ: ชุดควบคุมทำเช่นเดียวกับชุดทดลองแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายแป้ง และใช้บัฟเฟอร์แทนเอนไซม์

คำนวนหาปริมาณแป้งที่ถูกย่อยไป จากความสัมพันธ์ ดังนี้

ปริมาณแป้งที่ถูกย่อย = ปริมาณแป้งเริ่มต้น – ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที
(มิลลิกรัมต่อหน่วย)

5. การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอชของเอนไซม์

(ดัดแปลงจาก Stamford et al., 2001 และ Burhan et al., 2003)

ศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอชของแอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรีย ราและแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้ ดังนี้

5.1 เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย

5.1.1 **ชุดทดลองที่** 1 : นำสารละลายเอนไซม์บ่มในบัฟเฟอร์พีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ชุดทดลองที่ 2 : นำสารละลายเอนไซม์บ่มในบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ชุดทดลองที่ 3 : นำสารละลายเอนไซม์บ่มในบัฟเฟอร์พีเอช 5.5 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ชุดทดลองที่ 4 : นำสารละลายเอนไซม์บ่มในบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

5.1.2 ทำการเจือจางเอนไซม์ด้วย 0.1 M Acetate Buffer พีเอช 5.5 ให้ได้ค่าความเจือจางที่เหมาะสม

5.1.3 ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตามขั้นตอนในข้อ 2.4

5.1.4 นำค่าที่ได้ไปคำนวนหาปริมาณซับสเตรทที่ลดลงในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของแป้ง

หมายเหตุ: ชุดควบคุมทำการเติมสารละลายไอโอดีนก่อนเติมเอนไซม์เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์จากนั้นทำตามขั้นตอนต่อมาเหมือนกัน นำค่าที่ได้ไปคำนวนหาปริมาณซับสเตรทที่ลดลงในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของแป้ง

คำนวนหาปริมาณซับสเตรทที่ลดลง (mg/ml) จากความสัมพันธ์ ดังนี้

$$\underset{\text{(มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม)}}{\text{ปริมาณซับสเตรทที่ลดลง}} = \left(\frac{\underset{\text{ในชุดควบคุม}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น}} - \underset{\text{ในชุดตัวอย่าง}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น}}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}\right) \times \text{อัตราการเจือจาง}$$

5.1.5 คำนวนหากิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)

โดยกำหนดให้

1 หน่วยของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายแป้ง 1 มิลลิกรัม ในเวลา 10 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

5.1.6 คำนวนหากิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร) และคำนวนหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (%Relative Activity) จากความสัมพันธ์ ดังนี้

$$\underset{\text{(\%Relative Activity)}}{\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่}} = \left(\frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ที่เวลา 10 นาที}}{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ที่เวลาเริ่มต้น}}\right) \times 100$$

5.2 เอนไซม์ที่ผลิตจากราและแอคติโนมัยซีตีส

5.2.1 ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับแบคทีเรีย แต่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส

5.2.2 ทำการเจือจางเอนไซม์ด้วย 0.1 M Acetate Buffer พีเอช 5.5 ให้ได้ค่าความเจือจางที่เหมาะสม

5.2.3 ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตามขั้นตอนในข้อ 2.4

5.2.4 นำค่าที่ได้ไปคำนวนหาปริมาณซับสเตรทที่ลดลงในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของแป้ง

หมายเหตุ: ชุดควบคุมทำเช่นเดียวกับชุดทดลองแต่นำสารละลายเอนไซม์ไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ก่อน จากนั้นทำตามขั้นตอนต่อมาเหมือนกัน นำค่าที่ได้ไปคำนวนหาปริมาณซับสเตรทที่ลดลงในตัวอย่างจาก

กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของแป้ง

คำนวนหาปริมาณซับสเตรทที่ลดลง จากความสัมพันธ์ ดังนี้

$$\underset{\text{(มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม)}}{\text{ปริมาณซับสเตรทที่ลดลง}} = \left(\frac{\underset{\text{ในชุดควบคุม}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น}} - \underset{\text{ในชุดตัวอย่าง}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น}}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}\right) \times \text{อัตราการเจือจาง}$$

5.2.5 คำนวนหากิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)

โดยกำหนดให้

1 หน่วยของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายแป้ง 1 มิลลิกรัม ในเวลา 10 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

5.2.6. คำนวนหากิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร) และคำนวนหากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่จากความสัมพันธ์ ดังนี้

$$\underset{\text{(\%Relative Activity)}}{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่}} = \left(\frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ที่เวลา 10 นาที}}{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ที่เวลาเริ่มต้น}}\right) \times 100$$

6. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอชของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรีย ราและแอคติโนมัยซีตีสที่คัดเลือกได้ วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ของจุลินทรีย์แต่ละคู่โดยใช้การทดสอบหลังการวิเคราะห์ความแปรปรวน (*Post Hoc* Comparison) ทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อน (Multiple Comparison) แบบ Least Square Difference (LSD) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) Version 11.0

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ Bioprocess Engineering BS6201 และ BS6202 อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ โครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา