บทที่ 2
วิธีการทดลอง

2.1 ครุภัณฑ์

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์	1. Shimadzu UV-visible UV-240	Shimadzu , Japan
	2. Spectronic 2000	Bausch & Lomb, U.S.A.
	3. Spectronic 20 D	Bausch & Lomb, U.S.A.
เครื่องเซนตริฟิวจ์	1. Beckman refrigerated centrifuge J-21C	Beckman Instrument Inc., U.S.A.
	2. Beckman refrigerated centrifuge J2-21	Beckman Instrument Inc., U.S.A.
	3. Centrifuge model H-103N	Kokusan , Japan
อ่างควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า	Reciprocal water bath shaker model 02-PT-623	Heto , Denmark
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ	Incubator model B 5090 E	Heraeus , W-Germany
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	pH-meter model PHM 83	Radiometer A/S Copenhagen , Denmark
เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง	Sonicator model w-375	Heat Systems Ultrasonics , Inc., U.S.A.
เครื่องเขย่า	Vortex-Genie model K-550-GE NO. 16441	Scienctific Industries, Inc., Bohemia , N.Y. 1176 , U.S.A.
ตู้ปลอดเชื้อ	Laminar flow model 25	ISSCO., Thailand

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องนึ่งฆ่าจุลินทรีย์	Autoclave model HA-3D	Hirayama Manufacturing Corperation , Japan
ตู้อบ	Oven mode UL-80	Memmert , W-Germany
เครื่องทำให้แห้งด้วยความเย็น	Freeze dryer model 77400	Labconco Corp., U.S.A.
แก๊สโครมาโตกราฟฟี	Gas chromatography	Chromopack-Packard, U.S.A

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 (Groom และคณะ, 1988) เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (สั่งซื้อจาก American type culture collection ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (ออกซิไดส์ฟอร์ม) (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD ; oxidized form)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
2. นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (รีดิวส์ฟอร์ม) (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NADH ; reduced form)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
3. นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ ฟอสเฟต (รีดิวส์ฟอร์ม)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
4. กรดดีแอล - เบต้า - ไฮดรอกซีบิวทิริค (DL - β - Hydroxybutyric acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
5. กรดโปรปิโอนิค (Propionic acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
6. กรดบิวทิริค (Butyric acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
7. กรดวาเลอริค (Valeric acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
8. กรดเบนโซอิค (Benzoic acid)	Reidel-dehaenag Seelzehannover, Germany
9. อะซิโตอะซิติล โคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl coenzyme A)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
10. โคเอนไซม์เอ (Coenzyme A)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
11. คาร์บาโซล (Carbazole)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
12. โฟลิน-ฟีนอล (Folin & Ciocalteu's Phenol)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemicals Co., ประเทศสหรัฐอเมริกา , บริษัท BDH Chemical ltd., ประเทศอังกฤษ , บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ , บริษัท M & B (May & Baker) Ltd., ประเทศอังกฤษ เป็นต้น

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.3.1 อาหารสูตรอุดม (Nutrient broth) ประกอบด้วย Nutrient broth 0.8 เปอร์เซนต์ ถ้าเป็นอาหารชนิดแข็งเติม Bacto agar 2 เปอร์เซนต์

2.3.2 อาหารสูตรเกลือแร่ (Mineral salts) ของ Ramsay และคณะ (Ramsay และคณะ, 1989) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

- ฟรุกโตส 20 กรัม
- สารสกัดจากยีสต์ 0.1 กรัม
- สารละลายเกลือ (salt solution) ที่ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	2	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	20 มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	1.3 มิลลิกรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.2 มิลลิกรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$)	0.6 มิลลิกรัม
บอริคแอซิด (H_3BO_3)	0.6 มิลลิกรัม

ในการเตรียมอาหารสูตรเกลือแร่ จะต้องแยก autoclave องค์ประกอบทั้งสามส่วน หลังจากนั้นจึงนำผสมกันปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 โมลาร์

2.4 การเตรียมสารละลาย

2.4.1 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์สำหรับหาปริมาณโปรตีน (Alkali copper)

ก. สารละลาย ก. ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ข. สารละลาย ข. ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม ในสารละลายโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทต (โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทต 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ผสมสารละลาย ก. 50 มิลลิลิตร สารละลาย ข. 2 มิลลิลิตร ก่อนใช้ (เตรียมเสร็จใช้ทันทีเพราะสารผสมนี้สลายตัวได้ง่าย)

2.4.2 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (3 , 5-Dinitrosalicylic acid solution) สำหรับหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค 0.1 กรัม โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทต 20 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.0 นอร์มอล 40 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.4.3 สารละลายแอลกอฮอล์คาร์บาโซล (Alcoholic carbazole) สำหรับหาปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส ละลายคาร์บาโซล 0.12 กรัม ในเอธิลแอลกอฮอล์ (เกรดวิเคราะห์) 100 มิลลิลิตร

2.4.4 สารละลายสำหรับหาปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน

ก. สารละลายซิงค์ซัลเฟต ละลายซิงค์ซัลเฟต 5 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

ข. สารละลายอีดีทีเอ ละลายอีดีทีเอ 5 กรัม ในน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัม (อุ่นให้ร้อนเพื่อช่วยให้การละลายดีขึ้น) ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ค. สารละลายเนสเลอร์ (Nessler reagent) ละลายเมอร์คิวริคไอโอไดด์ 10 กรัม และโปแตสเซียมไอโอไดด์ 7 กรัมในน้ำกลั่น ค่อย ๆ ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เย็น (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.4.5 สารละลายบัฟเฟอร์ทรีส-กรดไฮโดรคลอริค 1.0 โมลาร์

ละลายทริส (Tris (hydroxymethyl) aminomethane) 12.11 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริค 1 โมลาร์ ปรับพีเอชเป็น 7.6 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2.4.6 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1.0 โมลาร์ พีเอช 5.5, 7.0 และ 7.2

ละลายไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.71 กรัม และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 6.81 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร (ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริคหรือโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์)

2.5 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

แบ่งเป็น 2 แบบคือ

2.5.1 การเก็บระยะสั้น เก็บบนอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิธีนี้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ได้นานประมาณ 1 เดือน

2.5.2 การเก็บระยะยาว

ก. เก็บในกลีเซอรอล

ผสมเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวกับกลีเซอรอลที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นเป็น 50

เปอร์เซนต์กลีเซอรอลในขวดจุกเกลียวเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส วิธีนี้สามารถเก็บเชื้อจุลินทรีย์ได้นานประมาณ 1 ปี

ข. เก็บโดยวิธี Lyophilization หรือ Freeze-drying

นำเซลล์ที่เจริญบนอาหารวุ้นมาผสมกับ skim milk 10 เปอร์เซนต์ แล้วจึงนำไปเข้าเครื่อง ทำให้เซลล์แข็งตัวในสภาพสูญญากาศ น้ำในเซลล์จะระเหิดออกมา จุลินทรีย์จะอยู่ในสภาพแห้งและแข็งและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้นานเป็นสิบปี

2.6 วิธีการเลี้ยงเชื้อและวัดการเจริญของเชื้อ

2.6.1 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็งเขี่ยเชื้อจากเชื้อตั้งต้น (Stock culture) ด้วยลวดเขี่ยเชื้อแล้วลากบนอาหารในจานเพาะเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.6.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculum) เขี่ยเชื้อ 2 ลูบ (loop) จากจานเพาะเชื้อลงในอาหารที่เหมาะสม 50 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วของการเขย่าประมาณ 100 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงปั่นแยกและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เจือจางเชื้อตั้งต้นให้ได้ความขุ่นประมาณ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร

2.6.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ ถ่ายเชื้อตั้งต้น 5 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วนปริมาตรอาหารต่อปริมาตรขวด 1 ต่อ 5 บ่ม ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เก็บเซลล์แขวนลอยที่เวลาต่าง ๆ ตามต้องการ

2.6.4 วิธีการติดตามการเจริญของเซลล์

ติดตามการเจริญ 3 วิธีคือ

ก. การวัดความขุ่น (turbidity)

เก็บเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวครั้งละ 5 มิลลิลิตร ตามเวลาที่ต้องการ ปั่นแยกและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง โดยใช้เซนตริฟิวจ์ตั้งโต๊ะความเร็ว 3,500 - 4,000

รอบต่อนาที นาน 30 นาที กระจายเซลล์ในน้ำกลั่นปริมาตรเท่าเดิม นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectronic 20 D)

ข. การวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง (dry weight)

เก็บเซลล์ (ตามวิธีข้อ ก.) หลังจากกระจายเซลล์ในน้ำกลั่นแล้วดูดสารละลายเซลล์ที่ล้างแล้วใส่ในถ้วยที่อบแห้งน้ำหนักคงที่ นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

ค. การวัดปริมาณโปรตีนสุทธิของเซลล์

ดำเนินการตามวิธีของ Lowry (Lowry และคณะ, 1951) โดยเก็บเซลล์ (ตามวิธีข้อ ก.) จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ที่ล้างแล้ว 0.5 มิลลิลิตร เติม 1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของเซลล์ ต้มในน้ำเดือดนาน 10-50 นาที ทิ้งให้เย็น เติม 2.5 มิลลิลิตร ของสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (ตามวิธีข้อ 2.4.1) อินคิวเบตที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที เพื่อให้เกิดสีอย่างชัดเจน วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานซึ่งได้จากอัลบูมินของซีรัมวัว (Bovine serum albumin)

2.7 วิธีการศึกษาการสังเคราะห์พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท และ พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอท

2.7.1 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท (PHB) (Law และ Slepecky, 1961 ; American Society for Microbiology, 1981)

บ่มเซลล์ที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ (ประมาณ 10-20 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง) กับคลอรอกซ์ปริมาตรเท่ากับปริมาตรเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ตั้งโต๊ะความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ดูดสารละลายชั้นบน (คลอรอกซ์) ทิ้ง เติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่าเดิม นำไปปั่นที่ความเร็วรอบเดิม ดูดชั้นน้ำกลั่นทิ้ง ล้างแกรนูลที่ได้ด้วยอะซิโตนและเอธานอล 5 มิลลิลิตรตามลำดับ (เขย่าด้วยเครื่องเขย่า เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีนาน 30 นาที)

หลังจากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที ทิ้งให้เย็นปั่นด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดของเหลวในชั้นคลอโรฟอร์มเก็บไว้ (สกัดซ้ำ 2 ครั้ง) ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร นำไประเหยให้แห้ง เติมกรดซัลฟุริคเข้มข้น 10 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทิ้งให้เย็น เขย่าให้เข้ากันวัดการดูดกลืนแสงเทียบกับกรดซัลฟุริคเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร แล้วคำนวณความเข้มข้นของ PHB โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้กรดดีแอล-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิริคเป็นสารมาตรฐาน

2.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHA) (Comeau และคณะ, 1988 ; Riis และ Mai, 1988)

บ่มเซลล์ที่ได้จากการทำไลโอฟิไลซ (lyophilized cell ประมาณ 40 มิลลิกรัมกับแอซิดเมธานอล (acidified methanol : 3% H_2SO_4) 1.8 มิลลิลิตร, คลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร และสารละลายกรดเบนโซอิค ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน (internal standard) 200 ไมโครลิตร (กรดเบนโซอิค 2 กรัมละลายในแอซิดเมธานอล 50 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลานาน 3.5 ชั่วโมง (ควรเขย่าเป็นครั้งคราว) จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อแยกเซลล์ทิ้ง แล้วทำให้แห้งด้วย N_2 เติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เพื่อขจัดกากของเซลล์ (particulate debris) ที่เหลือทิ้งและเป็นการช่วยลดความเป็นกรดของสารละลายลงด้วย โดยเขย่าเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดชั้นน้ำกลั่นทิ้งนำสารละลายคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ไปวิเคราะห์ปริมาณ 3HB และ 3HV ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี (ใช้กรดดีแอล-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิริคเป็นสารมาตรฐาน)

Column : Capillary (Model 438A)

Condition : - Split 50:1

- Inlet pressure 95 Kpa
- Flame Ionization Detector
- Injector temperature 200 °C
- Column temperature 120 °C
- Isothermal temperature.

โดยวิธีนี้เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของ 3HB, 3HV และกรดเบนโซอิคมีค่าดังนี้

3HB	2.92 นาที
3HV	3.81 นาที
กรดเบนโซอิค	4.48 นาที

การวิเคราะห์รายงานผลการทดลองเป็น 2 แบบคือ

แบบที่ 1 การวิเคราะห์ผลโดยการเปรียบเทียบรูปแบบของการสังเคราะห์ 3HB และ 3HV รายงานผลเป็นค่า

เปอร์เซนต์ผลิตภัณฑ์ 3HB หรือ 3HV ต่อกรดเบนโซอิคมาตรฐาน

$$\frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟ 3HB หรือ 3HV ในโครมาโตแกรม}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของกรดเบนโซอิคมาตรฐาน}} \times 100$$

แบบที่ 2 รายงานเป็นค่ามิลลิกรัมของ PHB และ PHV ซึ่งคำนวนได้จากเส้นกราฟมาตรฐานเมื่อใช้สารมาตรฐาน กรดดีแอล-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิริคที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน ฉีดเข้าเครื่อง GC ด้วยวิธีการและสภาวะเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ PHB และ PHV ในสารละลายปฏิกิริยา

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

2.8.1 ฟรุกโตส (Fructose)

การหาปริมาณของฟรุกโตสตามวิธีของ Marshall และ Kooi (Marshall และ Kooi, 1957) ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Dische และ Borenfreund (Dische และ Borenfreund, 1951)

เตรียมสารละลายของน้ำตาลฟรุกโตสที่มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ (blank)) เติม 1.5 เปอร์เซนต์ซิสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ลงไป 0.2 มิลลิลิตร 70 เปอร์เซนต์ของสารกรดซัลฟุริคเกรดวิเคราะห์ 6.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม 0.12 เปอร์เซนต์สารละลายแอลกอฮอล์คาร์บาโซล (Alcoholic carbazole) 0.2 มิลลิลิตรลงไปทันทีเขย่าแล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นย้ายไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

2.8.2 กลูโคส (Glucose)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างบรรจุในหลอดทดสอบ 1 มิลลิลิตร (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ) เติม 0.1 เปอร์เซนต์สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (3,5-Dinitrosalicylic acid solution) ลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายของน้ำตาลกลูโคส

2.9 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน (วิธีเนสเลอร์)

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายซิงค์ซัลเฟต 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้เป็น 10.5 ด้วยสารละลาย 6 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซค์ นำไปเซนตริฟิวจ์ เพื่อแยกตะกอนที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แยกสารละลายใสไม่มีสีปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอีดีทีเอ 5 ไมโครลิตร เขย่าแล้วเติมสารละลายเนสเลอร์ 200 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex) ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายแอมโมเนียมคลอไรค์

2.10 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

เมื่อเซลล์เจริญถึงระยะที่ต้องการแล้ว จึงนำมาปั่นแยกเอาอาหารเพาะเลี้ยงออกด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 15 นาที เก็บเซลล์ในรูปเซลล์เปียก (packed cell)

นำเซลล์ที่เตรียมข้างต้นประมาณ 0.5 กรัมน้ำหนักเปียก กระจายในสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์พีเอช 7.2 ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรค์ 5.0 มิลลิโมลาร์, อีดีทีเอ 1.0 มิลลิโมลาร์, ไดไธโอไธรทอล 1.0 มิลลิโมลาร์ และกลีเซอรอล 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูง (sonicator) ที่ 50% duty cycle, output 3 สารละลายที่ได้นำไปปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.11 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

2.11.1 เบต้า-คีโตไธโอเลส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Jackson และ Dawes, 1976)

ติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ในสารละลายที่ประกอบด้วยทริสบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.6 ซึ่งมีไดไธโอไธรทอล 0.2 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรค์ 24 มิลลิโมลาร์, อะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ 0.06 มิลลิโมลาร์ และโคเอนไซม์เอ 0.172 มิลลิโมลาร์ โดยวัดการลดลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 305 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ทำการทดลองซ้ำ (duplicate))

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์คือ ปริมาณไมโครโมลของอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอที่ถูกใช้ไปในสารละลายปฏิกิริยาต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.11.2 อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Jackson และ Dawes, 1976)

ติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ในสารละลายที่ประกอบด้วย โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.5 ที่มีไดไธโอไธรทอล 0.5 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรค์ 10 มิลลิโมลาร์, NADPH 0.375 มิลลิโมลาร์ และอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ 0.12 มิลลิโมลาร์ โดยวัดการลดลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ทำการทดลองซ้ำ (duplicate))

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์คือ ปริมาณไมโครโมลของ NADPH ที่ถูกใช้ไปในสารละลายปฏิกิริยาต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.11.3 ดี-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท ดีไฮโดรจีเนส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Senior และ Dawes, 1973)

ติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ในสารละลายที่ประกอบด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.13 โมลาร์ พีเอช 7.0, โปตัสเซียมไซยาไนด์ 2.0 มิลลิโมลาร์, NAD 0.2 มิลลิโมลาร์และดีแอล-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท 10 มิลลิโมลาร์ โดยวัดการเพิ่มขึ้นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ทำการทดลองซ้ำ (duplicate))

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นในสารละลายปฏิกิริยาต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.11.4 การวัดปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์

วัดปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ โดยเจือจางสารละลายโปรตีนลงให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสมแล้วใช้สารละลาย 0.5 มิลลิลิตร ดำเนินการตามวิธีข้อ 2.6.4 (ค)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย