บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็น wild type คือยีสต์ *Pachysolen tannophilus* Boidinet Adzet NRRL Y-2460 [ATCC 32691] จาก Yeast Collection ณ สถาบัน USDA Northern Regional Research Center เมือง Peoria มลรัฐ Illinoids , U.S.A.

1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นมิวแทนต์เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทธานอล คือ NO_3-NO_3 mutant เปลี่ยนแปลงสายพันธุ์มาจาก *P. tannophilus* โดย Thomas W. Jeffries แห่ง Forest Product Laboratories , Forest Service , U.S.Department of Agriculture มลรัฐ Wisconsin , U.S.A.

2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.1 หลอด UV ชนิด Germicidal radiant power 8,400 mWที่ 253-7 ขนาด 15 W รุ่น GL-15 G15T8 Sylvania , อิตาลี [2 หลอด]

2.2 ตู้เขี่ยเชื้อและฉายแสง UV แบบ Lamina flow รุ่น Biohazzard 10793 , GELAIRE , เยอรมันนี

2.3 ตู้บ่มเชื้อ [Incubator] รุ่น B221V , Termarks , นอรเวย์

2.4 ตู้เย็นขนาด 4.9 คิว รุ่น Supper Direct Cool , Toshiba , ญี่ปุ่น

2.5 ตู้เขย่าและควบคุมอุณหภูมิ [Controlled Incubator Shaker] แบบ GFL รุ่น D3006 ,Buswedel , เยอรมันนี

2.6 ตู้อบฆ่าเชื้อด้วยความร้อน [Hot-Aired Oven] รุ่น U50-790387 Memmert , เยอรมันนี

2.7 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ [Autoclave] รุ่น ST-2TC-459 , Tai Chang ,ไต้หวัน

2.8 เครื่องปั่นเหวียง [Centrifugeration] รุ่น D-7200 , Universal ,เยอรมันนี

2.9 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง [Spectrophotometer] รุ่น Nova Spce 4049 , LKB Biochrom , อังกฤษ

2.10 กล้องจุลทรรศน์แบบ 2 ตา [Binocular] รุ่น CH 869933 , Olympus , ญี่ปุ่น

2.11 กล้องจุลทรรศน์แบบ 2 ตา [Minocular] รุ่น BH-2 (BHS) , Olympus , ญี่ปุ่น

2.12 กล้องถ่ายรูป [Camera box] รุ่น Yashica Fx-3 Super 2000 , Kyocera Cor., ญี่ปุ่น

2.13 หลอดฉีดยาขนาด 10 มล., Perfektum , อินเดีย

2.14 หลอดสวมปลายหลอดฉีดยา [Millipore Holder] รุ่น SX 0001300 , Millipore Cor., อเมริกา

2.15 กระดาษกรองเชื้อจุลินทรีย์ [Millipore Paper] รุ่น HAWP 01300 , Millipore Cor., อเมริกา

3. เคมีภัณฑ์

3.1 ผงสกัดยีสต์ [Yeast Extract], Difco Laboratories

3.2 ผงสกัดมอลท์ [Malt Extract], Difco Laboratories

3.3 เปปโตน [Bacto-Peptone], Difco Laboratories

3.4 วุ้นผง [Bacto-Ager], Difco Laboratories

3.5 กลูโคส [D-Slucose], Fluka Biochemika

3.6 ไซโลส [D-Xylose], Fluka Biochemika

3.7 ยีสต์ไนโตรเจนเบสปราศจากกรดอะมิโน [Yeast Nitrogen Base W/O amino acid], Difco Laboratories

3.8 กรดอะมิโนไลซีน [L-Lysine], Sigma Chemical Company

3.9 กรดอะมิโนเมทไธโอนีน [L-Methionine], Sigma Chemical Company

3.10 เอทธานอล [Ethanol], Merck

3.11 เมทธานอล [Methanol], Merck

3.12 ยาปฏิชีวนะ ไนสเตติน [Nystatin], Sigma Chemical Company

3.13 โมโนเบสิคโซเดียมฟอสเฟต [$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$], M&B

3.14 ไดเบสิคโซเดียมฟอสเฟต [$NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$], M&B

3.15 โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH], Merck

316 เกลือรอคเชลล์ [Rochell Salt], Fluka Biochemika

3.17 ไดไนโตรซาลิซิเลต [3,5-Dinitrosalicylic acid], Merck

3.18 ฟีนอล [Phenol], Merck

4. วิธีดำเนินการทดลอง

4.1 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการฉายแสงอัลทราไวโอเลตในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

4.1.1 inoculate เชื้อที่ใช้เป็น wild type ซึ่งเลี้ยงไว้บนอาหารวุ้นเอียงสูตร YMA คงสภาพที่อุณหภูมิ 5^0C ลงในอาหารเหลวสูตร YMB นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 32^0C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.2 นำเชื้อที่บ่มไว้ในข้อ 4.1.1 มาตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วย haemcytometer(Petroff Hauser Chamber) แล้วนำไปเจือจางลำดับส่วน ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปรับ pH เป็น 5.5 เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ 30-300 เซลล์ ต่อ 0-2 มล.

4.1.3 ดูดสารละลายความเข้มข้นเหมาะสม ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1.2 มา 0-2 มล. ลงในอาหารแข็งสูตร YMA กระจายเซลล์ให้ทั่วจานแก้ว ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้สารละลายซึมลงไป ตรึงเซลล์ให้ติดกับผิวหน้าของอาหาร นำไปฉายแสงอัลทราไวโอเลต แนวตั้งฉากกับลำแสงที่ระยะ 45 ซม. เป็นเวลา 0 , 5 , 10 , 20 , 30 , 40 , 50 , 60 และ 75 วินาที ตามลำดับนำเชื้อที่ฉายแสงแล้วนี้ ไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 32^0C นาน 3 วัน นับจำนวนโคโลนียีสต์ที่ขึ้น คำนวณเป็นร้อยละการรอดชีวิต [% Survival] โดยเปรียบเทียบกับจำนวนโคโลนีเป็น control [0 วินาที] ให้เท่ากับร้อยละ 100 ของการรอดชีวิต

4.1.4 ทำเหมือนข้อ 4.1.3 อีกครั้ง โดยเลือกช่วงเวลาของการฉายแสงที่ทำให้เซลล์เหลือรอดชีวิต ไม่เกิน 10% มาเพิ่มและลดช่วงเวลาครั้งละ 5 วินาที เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมต่อการใช้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

4.1.5 นำเวลาที่ได้ในข้อ 4.1.4 ไปฉายแสง wild type ที่เตรียมตามข้อ 4.1.1-4.1.3 คัดเลือกจานแก้วที่มีโคโลนีเกิดขึ้นไม่เกิน 10% เมื่อเทียบกับ control ในแต่ละครั้ง บันทึกลักษณะและขนาดของโคโลนี เปรียบเทียบกับ wild type ตั้งชื่อสายพันธุ์ในแต่ละโคโลนี แล้วเก็บเชื้อไว้ในอาหารวุ้นเอียงสูตร YMA คงสภาพที่อุณหภูมิ 5^0C เปลี่ยนถ่ายเชื้อลงในอาหารที่เตรียมใหม่ทุกๆ สามเดือน

4.2 ศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของ wild type และมิวแทนต์โดยใช้ตำหนิ [marker] เป็นกรดอะมิโน 2 ตัว และยาปฏิชีวนะ 1 ตัว

4.2.1 inoculate เชื้อ wild type ที่คงสภาพไว้ในอาหารวุ้นเอียงสูตร YMA ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วย haemacytometer แล้วนำไปเจือจางลำดับส่วนให้ได้ความเข้มข้น เชื้อประมาณ 20-30 เซลล์ ต่อ 0.2 มล. ดูดมาครั้งละ 0-2 มล. ลงในจานแก้วที่มี

อาหารแข็งสูตร YMA เกลี่ยสารละลายให้กระจายทั่วจานแล้ว นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 32°C นาน 3 วัน

4.2.2 ใช้ผ้ากำมะหยี่ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว [Sterilization] คลุมแท่นปั๊มที่มีขนาดพอดีกับจานแก้ว ประทับลงบนจานเลี้ยงเชื้อในข้อ 4.2.1 ที่มีเชื้อยีสต์ wild type ขึ้นอยู่ ทำเครื่องหมายระหว่างจานแก้วกับแท่นปั๊มให้ตรงกันแล้วยกขึ้นนำไปประทับลงบนจานแก้วที่เตรียมอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ได้แก่ สูตร YMA สูตรไนโตรจีเนียสเบสปราศจากกรดอะมิโน สูตร YMA ผสมยาปฏิชีวนะไนสเตตินที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ มล. ตามลำดับ โดยทำเครื่องหมายตำแหน่งจุดต่อจุด บ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 32°C นาน 24 ชั่วโมง

4.2.3 ทำเหมือนข้อ 4.2.2 แต่เปลี่ยนจาก wild type เป็นมิวแทนต์ที่ถูกชักนำด้วยแสงอัลทราไวโอเลต ในข้อ 4.1.5 ทำ replica plating ลงบนอาหาร 3 ชนิด เหมือนข้อ 4.2.2 และเพิ่มอาหารแข็งอีก 2 ชนิด คือ สูตรไนโตรจีเนียสเบสปราศจากกรดอะมิโนเติมกรดอะมิโนไลซีนและเมทไธโอนีนอย่างละสูตร รวมเป็น 5 ชนิด โดยให้การเจริญของเซลล์ บนอาหารแข็งสูตร YMA เป็น control เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของมิวแทนต์แต่ละสายพันธุ์บันทึกผล

4.3 การคัดเลือกมิวแทนต์ที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลส

4.3.1 inoculate เชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่เก็บไว้ในข้อ 4.1.5 รวมทั้งเชื้อที่ใช้เป็น wild type ในข้อ 4.1.1 มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียงสูตร YMA แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอน จากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลไซโลสนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 32°C นาน 5 วัน

4.3.2 inoculate เชื้อแต่ละสายพันธุ์ ที่บ่มไว้ในข้อ 4.3.1 อย่างละ 1 ลูปเต็ม ลงในหลอดทดลองที่บรรจุหลอดเก็บกาซ [Durham tube] ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร YMB ซึ่งเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลไซโลส นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 วัน แล้วนำแต่ละหลอดทดลอง มาวัดความยาวฟองกาซที่เกิดขึ้น บันทึกผลเปรียบ เทียบกับ wild type เป็นการคัดเลือกครั้งที่ 1

4.3.3 คัดเลือกเชื้อเฉพาะสายพันธุ์ ที่มีความยาวฟองกาซมากกว่า wild type จากการคัดเลือกครั้งที่ 1 ในข้อ 4.3.2 มาทำการคัดเลือกครั้งที่ 2 โดยในครั้งนี้จะเพิ่มสายพันธุ์ NO_3-NO_3 mutant มาอีกสายพันธุ์หนึ่งเพื่อใช้เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ inoculate เชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้แล้วทั้งหมด บ่มไว้ตามข้อ 4.3.1 รวมทั้ง NO_3-NO_3 mutant อย่างละ 1 ลูปเต็ม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. แต่ละฟลาสก์บรรจุอาหารเหลวสูตร YMB ซึ่งเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเหมือน ในข้อ 4.3.2 ฟลาสก์ละ 100 มล. ปิดด้วยจุกสำลีหุ้มไว้ด้วยอลูมินัมฟรอยด์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 วัน แล้วใช้ปิเปตที่ผ่านการเชื้อแล้วดูด suspension ของเซลล์ใน

แต่ละฟลาสก์มาฟลาสก์ละ 5 มล. ลงในฟลาสก์ใหม่ที่บรรจุอาหารเหลวสูตรเดียวกันไว้ฟลาสก์ละ 25 มล. บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน แล้วปิเปต suspension แต่ละฟลาสก์ ๆ ละ 1 มล. ลงในหลอดทดลองที่บรรจุหลอดเก็บกาซที่เตรียมไว้แบบเดียวกันกับในข้อ 4.3.2 ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 วัน นำแต่ละหลอดมาวัดความยาวฟองกาซในหลอดเก็บกาซบันทึกผลเปรียบเทียบ ไปทำการคัดเลือกต่อในครั้งที่ 3

4.3.4 คัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ ที่มีความยาวฟองกาซใกล้เคียงหรือมากกว่าความยาวฟองกาซของ NO_3-NO_3 mutant พร้อมทั้งสายพันธุ์ wild type มาทำการคัดเลือกในครั้งที่ 3 ซึ่งจะใช้วิธีการแบบเดียวกันกับวิธีในข้อ 4.3.3 นำความยาวฟองกาซในหลอดเก็บกาซที่วัดได้ในขั้นตอนสุดท้ายมาเปรียบเทียบหาสายพันธุ์ที่มีค่าสูงสุดและรองลงมา หรือสายพันธุ์ที่มีค่าใกล้เคียงมากกว่า NO_3-NO_3 mutant ไปทำการหมักน้ำตาลไซโลส เพื่อหาผลผลิตเอทธานอลในขั้นตอนการหมักต่อไป

4.4การหมักน้ำตาลไซโลสในสภาวะจำกัดอากาศเพื่อตรวจวัดอัตราการผลิตเอทธานอล

4.4.1 เฉพาะสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้แล้วในข้อ 4.3.4 รวมทั้งสายพันธุ์ NO_3-NO_3 mutant และ wild type inoculate เชื้อแต่ละสายพันธุ์ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร YMB ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนไว้ 100 มล. ฟลาสก์ละ 1 ลูปเต็มเหมือนขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อสองชั่วอายุ เพื่อคัดเลือกในครั้งที่ 2 ของข้อ 4.3.3 เมื่อเลี้ยงครบ 10 วัน ในชั่วอายุที่สองแล้ว ให้ดูดมาฟลาสก์ละ 2.5 มล. ลงในฟลาสก์ขนาด 150 มล. ซึ่งบรรจุอาหารเหลวสูตร YMB โดยมีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนอยู่ 0.5% W/V [น้ำหนักไซโลสเป็นกรัมต่อปริมาตรรวมเป็นมิลลิเมตร] ฟลาสก์ละ 45 มล. อุดด้วยจุกสำลี ปิดทับด้วยอลูมินัมฟรอยด์นำไปบ่มในตู้เขย่าและควบคุมอุณหภูมิที่ 32°C เขย่า 45 รอบต่อนาที นาน 3 วัน

4.4.2 นำแต่ละฟลาสก์ที่บ่มไว้ในข้อ 4.4.1 มาเติมน้ำตาลไซโลสลงไปในฟลาสก์โดยฉีดสารละลายผ่านกระดาษ millipore filter ฟลาสก์ละ 2-5 มล. ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำตาลไซโลสเป็น 2% W/V จากปริมาตรรวม 50 มล. เอาจุกสำลีปิดปากฟลาสก์ออกแล้วใช้พลาสติก 2 ชั้น ปิดปากแทนรัดให้แน่นป้องกันอากาศเข้าออก นำไปบ่มในตู้เขย่าสภาวะเดิม

4.4.3 เมื่อครบแต่ละวันให้นำแต่ละฟลาสก์ออกมาดูดสารละลายออกมาฟลาสก์ละ 5 มล. ในสภาวะปลอดเชื้อ ปิดปากฟลาสก์แล้วนำไปบ่มในสภาวะเดิม สารละลายที่ดูดออกมาแต่ละครั้งนำไปแช่แข็งในตู้เย็น นาน 20 นาที แล้วนำไปใส่เครื่องปันเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาที นำส่วนใสแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปหา ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS-Assay และปริมาณเอทธานอลที่เซลล์ผลิตขึ้นมาโดยวิธี Gas Liquid Chromatography นำไปคำนวณหา

ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ และอัตราการผลิตเอธานอลต่อน้ำตาลไซโลส ตัวอย่างจะถูกเก็บจากแต่ละฟลาสก์ทุกวันจนครบ 5 วัน แล้วจะทิ้งช่วงไว้ในสภาะเดิม เก็บอีกครั้งในวันที่ 10 ตรวจหาปริมาณน้ำตาลไซโลสและเอทธานอลทุกตัวอย่างตามวิธีข้างต้น

4.5 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเอทธานอลจากการหมักน้ำตาลไซโลสได้สูง และสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสได้ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type

นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่จะต้องการศึกษา มาเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวสูตร YMB เป็นเวลา 1 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสองตา ที่มีแผ่น scale สำหรับวัดขนาดของเซลล์ติดอยู่ [Ocular Micrometer] ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า และเลนต์ใกล้ตา กำลังขยาย 10 เท่า ทำให้กำลังขยายสุดท้ายเป็น 1 พันเท่า นับจำนวนเซลล์ จำนวนแอสโคฟอร์ [Ascophore = ก้านชูแอสคัส] หรือสิ่งที่เซลล์สร้างขึ้นต่าง ๆ ที่ปรากฏอยู่ในขอบเขตของภาพที่เห็นแต่ละครั้ง [1 microscapic field] พร้อมทั้งวัดขนาดสิ่งเห็นด้วย ocular micrometer เลื่อนสไลด์ไปยังตำแหน่งต่าง ๆ ประมาณ 10 ตำแหน่งต่อ 1 สไลด์ โดยยึดการพบแอสโคฟอร์เป็นหลักรวม 50 ตำแหน่ง ตรวจหาในแบบเดิมทุกครั้ง บันทึกภาพไว้ด้วยกล้องถ่ายภาพประกอบกล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับ wild type สรุปความสัมพันธ์ทางสัณฐานวิทยา ที่อาจเป็นไปได้กับความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสหรือการผลิตเอทธานอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย