บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-10 แบบ Rotary บริษัท New Brunswick Scientific Co., INC., EDISON, N.J. USA

2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled Environment Incubator Shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific Co., INC., EDISON, N.J. USA

3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible Spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu Corporation, Japan

4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA

5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) รุ่น H-88L4 บริษัท Kokusan, Japan

6. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar Flow ISSCO รุ่น BV-124, USA

7. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie 2) รุ่น G-560 E บริษัท Scientific Industries INC., USA

8. หลอดแสงอุลตราไวโอเลต (Ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร TL20W/08 F20 T12 BLB บริษัท Phillips, Holland

9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Temppet T-80 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., LTD, Japan

10. เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น Franz MORAT KG บริษัท GmbH Co., Germany

11. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S บริษัท Sartorius, USA

12. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น UNILUX-12 บริษัท Kyowa, Tokyo Japan

13. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 บริษัท Whatman International Ltd., England

14. กล่องโลหะขนาด 20 x 30 เซนติเมตร

15. กระดุมปั๊ม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร

เคมีภัณฑ์

1. เดกซ์แทรนคุณภาพอุตสาหกรรม น้ำหนักโมเลกุล 3 - 50 x 10^6 Sigma Chemical Co., USA

2. เดกซ์แทรน T-2000 น้ำหนักโมเลกุล 2 x 10^6 Pharmacia , Sweden

3. ไนโตรโซกวานิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG) Sigma Chemical Co., USA

4. Tween-80 BDH Chemical Ltd., England

5. โบวีนซีรั่มอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) Sigma Chemical Co., USA

6. โปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) E. Merck, Germany

7. โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) E. Merck, Germany

8. โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) E. Merck, Germany

9. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) Difco Laboratories, USA

เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บ และการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม คัดแยกจาก ดิน โดย เอก แสงวิเชียร (2531)

2. การเก็บรักษาเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

2.1 การเก็บรักษาเชื้อในระยะสั้น

เชื้อสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) ปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ (ภาคผนวก ก) ที่มีเดกซ์แทรนความเข้มข้น 1 % บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จนสปอร์เจริญเต็มที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้

2.2 การเก็บรักษาเชื้อในระยะยาว

เก็บสปอร์ของเชื้อราโดยวิธี Lyophilization

3. การเลี้ยงเชื้อราในขวดแก้วทรงกรวย

เติม 0.1 % ของ Tween-80 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) ลงในหลอดเก็บเชื้อราจากข้อ 2.1 ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาลอยอยู่ในน้ำ นับสปอร์ให้อยู่ในช่วง $2x10^7$ สปอร์ต่อมล. โดยใช้ Haemacytometer ถ่ายสปอร์แขวนลอย 2 มล. ลงใน 100 มล.ของอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30-35 °ซ) เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างโดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวออกมา 5 มล. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนใสนำมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และปริมาณโปรตีนคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะ

<u>การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา</u>

1. การคัดเลือกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

นำเชื้อราที่ต้องการทดสอบมาจุด (spot) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเดกซ์แทรน 1 % ปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ (ภาคผนวก ก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

นำมาตรวจสอบความสามารถในการย่อยเดกซ์แทรนของเชื้อรา โดยการเทราดด้วยเอธานอล 95 % ให้ท่วมอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากเดกซ์แทรนเป็นโพลีเมอร์ ที่มีหน่วยของกลูโคสต่อกันมากกว่า 50 หน่วยขึ้นไป เมื่อทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เช่น เอธานอล จะเกิดการตกตะกอน ทำให้เห็นเป็นสีขาวขุ่น แต่หากเดกซ์แทรนถูกย่อยด้วยเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ปล่อยออกมาจากเชื้อรา กลายเป็นหน่วยย่อยลงก็จะไม่ถูกตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ทำให้เกิดเป็นบริเวณใส (clear zone) ขึ้น สามารถคัดแยกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้

2. การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสทำตามวิธีการของ Fukumoto และคณะ (1971) ดังนี้ นำสารละลาย 0.625 % เดกซ์แทรน T-2000 ใน 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 5.5 ปริมาตร 0.4 มล. ผสมกับ 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 5.5 ปริมาตร 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงเติม 0.1 มล. ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองแยกเซลล์ออกแล้ว ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 ซ เป็นเวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที นำไปตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปล่อยออกมาโดยวิธีของ Somogyi (1952)

[1 หน่วย (unit) ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 ได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ]

การเตรียมสับสเตรท โดยชั่งเดกซ์แทรน T-2000 0.625 กรัม ละลายใน 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดเตรียมสาร (Volumetric flask)

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi (1952)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มล.เติม Alkaline copper reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วเติม Nelson reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เติมน้ำปลอดประจุ (deionized water) ปริมาตร 5 มล.ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

เปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0 - 200 ไมโครกรัมต่อมล.

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry (1951)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1.0 มล. เติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5.0 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จึงเติมสารละลายผสม Lowry D (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่ใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 0 - 200 ไมโครกรัมต่อมล.

การคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะ ทำได้โดยนำค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (หน่วยต่อมล.) หารด้วยปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.) ค่าแอคติวิตีจำเพาะมีหน่วยเป็น หน่วย (unit) ของเอนไซม์ต่อ มก.โปรตีน

การตรวจวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ (Growth)

ทำโดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง (dry weight) ของเซลล์ โดยนำเซลล์ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ทราบปริมาตรแน่นอน กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ทราบน้ำหนักคงที่

อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง คำนวณหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อปริมาตร

การกลายพันธุ์เชื้อราด้วยสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

1. การกลายพันธุ์เชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต (ปรับปรุงจาก Miller, 1972 ; Hoffman and Wood, 1985)

1.1 นำสารละลายแขวนลอยของสปอร์ ใน 0.1 % Tween-80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มีความหนาแน่น $1.8x10^3$ สปอร์ต่อมล. เติมลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 10 มล. นำไปผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่างจากแสง 30 เซนติเมตร โดยมีการกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 0-10 นาที เก็บตัวอย่างสปอร์ทุก 1 นาที

1.2 กระจาย 0.2 มล. ของสปอร์ที่ผ่านการฉายแสงแล้ว ลงบนอาหารแข็ง ปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

1.3 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (สปอร์ที่รอด) และคำนวณเปอร์เซนต์การรอดของสปอร์ เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการกลายพันธุ์เชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61

1.4 เขี่ยสปอร์ของเชื้อราที่รอด ลงบนอาหารแข็งเอียง ปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำมาคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้น

2. การกลายพันธุ์เชื้อรา *Penicillium* sp. ด้วยสารเคมี NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) (ปรับปรุงจาก Brown et al., 1989)

2.1 นำสารละลายแขวนลอยของสปอร์ ใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มีความหนาแน่น $1x10^6$ สปอร์ต่อมล. เติมลงในหลอดฝาเกลียวที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 มล.

2.2 ละลายสาร NTG ใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 เติมลงในหลอดที่มีสารแขวนลอยของสปอร์อยู่ โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ NTG เท่ากับ 0.1 , 0.2 และ 0.3 มก.ต่อมล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-70 นาที เก็บตัวอย่างสปอร์ทุกๆ 10 นาที

2.3 นำสปอร์ที่เก็บมาเจือจางเป็น 100 เท่า ด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0

2.4 กระจาย 0.1 มล. ของสปอร์ที่เจือจางแล้ว ลงบนอาหารแข็งตามสูตรอาหารซึ่งปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

2.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (สปอร์ที่รอด) และคำนวณเปอร์เซนต์การรอดของสปอร์ เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการกลายพันธุ์เชื้อรา *Penicillium* sp.

2.6 เขี่ยสปอร์ของเชื้อราที่รอด ลงบนอาหารแข็งเอียง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำมาคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้น

<u>การคัดเลือกเชื้อราที่มีการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้น</u>

1. การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (Primary screening)

1.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิในกล่องโลหะ

1.1.1 เขี่ยสปอร์ของเชื้อราที่ต้องการทดสอบลงบนฝากระดุมในกล่องโลหะ (ภาคผนวก ค) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตามสูตรอาหารซึ่งปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ โดยเขี่ยสปอร์เพียง 1 เชื้อต่อ 1 ฝา ใช้เทปกาวพันฝากล่องให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

1.1.2 ถ่ายเชื้อที่บ่มแล้วลงในกล่องโลหะอีกใบหนึ่ง เพื่อทำการทดสอบในรุ่น (generation) ที่ 2 โดยถ่ายเชื้อจากกล่องที่ 1 ไปยัง กล่องที่ 2 ให้มีหมายเลขของฝากระดุมตรงกัน นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วันเช่นเดียวกัน

1.1.3 กล่องที่ถ่ายเชื้อไปแล้ว นำมาทดสอบการเกิดบริเวณใส เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยเทราดด้วยเอธานอล 95% ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าผลต่างระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส

กับเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ทำการทดสอบบริเวณใสของเชื้อราที่ปลูกถ่ายเชื้อทั้ง 2 ครั้ง

1.1.4 คัดเลือกโคโลนีที่ให้บริเวณใสมากกว่าเชื้อดั้งเดิมในการปลูกถ่ายเชื้อทั้ง 2 ครั้ง นำไปทดสอบการเกิดบริเวณใสอีกครั้งหนึ่ง โดยทดสอบในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

1.2 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 เชื้อสปอร์ของเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิในกล่องโลหะ ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารแข็งปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

1.2.2 ถ่ายเชื้อที่บ่มแล้วลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ เพื่อทดสอบเชื้อราในการปลูกถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วันเช่นเดียวกัน

1.2.3 นำเชื้อที่บ่มแล้ว มาทดสอบการเกิดบริเวณใส โดยเทราดด้วยด้วยเอธานอล 95% ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าผลต่างระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสกับเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี

1.2.4 คัดเลือกโคโลนีที่ให้บริเวณใสมากกว่าเชื้อดั้งเดิมในการปลูกถ่ายเชื้อทั้ง 2 ครั้ง นำไปเลี้ยงในขวดแก้วทรงกรวย ซึ่งมีอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มีเดกซ์แทรน 1% เป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ บ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้อง อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง และทดสอบการเกิดบริเวณใสในจานเพาะเลี้ยงเชื้ออีกครั้งหนึ่ง คัดเลือกเชื้อราที่ให้ความกว้างของบริเวณใสค่อนข้างคงที่ เก็บเชื้อราที่คัดเลือกได้เพื่อนำไปทดสอบในขั้นทุติยภูมิต่อไป

2. การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (Secondary screening)

2.1 เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้ ในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ สภาวะการเลี้ยงเชื้อตามวิธีการเลี้ยงเชื้อราในขวดแก้วทรงกรวย เก็บตัวอย่างทุกวัน นำมาวิเคราะห์การเจริญ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเพื่อนำไปคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

2.2 คัดเลือกเชื้อราที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นมากที่สุด เปรียบเทียบการเจริญ ปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และค่าแอคติวิตีจำเพาะของเชื้อราที่คัดเลือกได้กับเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น

<u>การศึกษาเปรียบเทียบเชื้อราที่ได้จากการกลายพันธุ์สปอร์ของ *Penicillium* sp.</u>

1. การทดสอบความเสถียรของเชื้อรากลายพันธุ์

1.1 เลี้ยงสปอร์ของเชื้อรากลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ บนอาหารแข็งเอียงตามสูตรอาหารซึ่งปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายสปอร์ที่ได้ลงบนอาหารแข็งเอียงหลอดใหม่ โดยถือเป็นเชื้อราที่ทำการปลูกถ่ายเชื้อครั้งที่ 2

1.2 นำสปอร์ของเชื้อราในการปลูกถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 เลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ สภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อราในขวดแก้วทรงกรวย วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเพื่อนำไปคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

1.3 เลี้ยงเชื้อราและทำการทดสอบเช่นเดียวกันนี้ ในการปลูกถ่ายเชื้อเป็นจำนวน 20 ครั้ง เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในแต่ละครั้งของการปลูกถ่ายเชื้อ เพื่อตรวจสอบความเสถียรของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

2. การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเชื้อรากลายพันธุ์และสายพันธุ์ตั้งต้น

2.1 การเปรียบเทียบลักษณะของโคโลนี

นำเชื้อราที่ต้องการศึกษา จุดลงบนอาหารแข็งปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน นำมาเปรียบเทียบลักษณะของโคโลนี สีของสปอร์ และความกว้างของบริเวณใส เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรากลายพันธุ์และสายพันธุ์ตั้งต้น

2.2 การเปรียบเทียบลักษณะของสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์

การศึกษาสปอร์ของเชื้อรา โดยทำการเลี้ยงเชื้อราบนแผ่นสไลด์ (slide culture) นำอาหารแข็งที่มีความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1x1 เซนติเมตร วางบนแผ่นสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แตะเชื้อที่ต้องการศึกษาลงบนด้านข้างของชิ้นวุ้น ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4 วัน เขี่ยชิ้นวุ้นออก นำแผ่นสไลด์มาหยดด้วยสีย้อม Lacto-phenol cotton blue นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า ศึกษาลักษณะของก้านชูสปอร์ (conidia) และลักษณะของสปอร์ เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรากลายพันธุ์และสายพันธุ์ดั้งต้น

<u>การศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพบางประการต่อการเลี้ยงเชื้อรากลายพันธุ์</u>

1. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อรากลายพันธุ์เพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

เลี้ยงเชื้อรากลายพันธุ์ ในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มี 1 % เดกซ์แทรน เป็นแหล่งคาร์บอนและสารชักนำการสร้างเอนไซม์ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อเป็น 25 °ซ 30 °ซ อุณหภูมิห้อง (30-35 °ซ) และ 40 °ซ เก็บตัวอย่างทุกวัน นำมาวิเคราะห์การเจริญ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

2. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อรากลายพันธุ์ เพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

เลี้ยงเชื้อรากลายพันธุ์ ในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มี 1 % เดกซ์แทรน เป็นแหล่งคาร์บอนและสารชักนำการสร้างเอนไซม์ ที่อุณหภูมิเหมาะสม บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยแปรผันความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3.0-8.0 เก็บตัวอย่างทุกวัน นำมาวิเคราะห์การเจริญ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

3. ปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อรากลายพันธุ์ เพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

เลี้ยงเชื้อรากลายพันธุ์และสายพันธุ์ดั้งต้นในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มีเดกซ์แทรนชนิดอุตสาหกรรม และน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และสารชักนำการสร้างเอนไซม์ โดยแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสเป็น 0:1.0 , 0.25:0.75 , 0.50:0.50 , 0.75:0.25 และ 1.0:0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน นำมาวิเคราะห์การเจริญ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรากลายพันธุ์และสายพันธุ์ดั้งต้น

4. ปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

4.1 เลี้ยงเชื้อรากลายพันธุ์และสายพันธุ์ดั้งต้น ในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ แต่ใช้น้ำตาลกลูโคส 1 % เป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้เดกซ์แทรนเลี้ยงเชื้อราในสภาวะที่เหมาะสม มีการถ่ายเลี้ยงเชื้อจำนวน 5 ครั้ง เพื่อให้เชื้อรามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่ำที่สุด เนื่องจากไม่ได้รับสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เป็นเวลานาน

4.2 นำเชื้อราที่ได้ มากระตุ้นการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยเลี้ยงในอาหารเหลวปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่มีเดกซ์แทรนเป็นสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ โดยแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนต่อน้ำตาลกลูโคสเป็น 0.25:0.75 , 0.50:0.50 , 0.75:0.25 และ 1.0:0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน นำมาวิเคราะห์การเจริญ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรากลายพันธุ์และสายพันธุ์ดั้งต้น

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ได้จากเชื้อรากลายพันธุ์

1. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

ทำการศึกษา โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เป็น 40 45 50 55 60 และ 65 องศาเซลเซียส บ่มเอนไซม์เป็นเวลา 15 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

2. ความเป็นกรดด่างและชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

ทำการศึกษา โดยแปรผันความเป็นกรดด่างของสารผสมในปฏิกิริยา ในช่วงต่างๆ กัน โดยใช้ 0.05 โมลาร์ ของบัฟเฟอร์ชนิดต่างกัน คือ

ไกลซีน-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 2.5 - 3.5

อะซีเตทบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 3.5 - 6.0

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0 - 8.0

บ่มเอนไซม์เป็นเวลา 15 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

3. ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

ทำการศึกษา โดยแปรผันความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็น 0 - 0.5 โมลาร์ บ่มเอนไซม์เป็นเวลา 15 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส คำนวณความเข้มข้นสุดท้ายของบัฟเฟอร์ในการทำปฏิกิริยา

4. ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

ทำการศึกษา โดยบ่มเอนไซม์ให้เจือจางใน 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 5.5 ที่อุณหภูมิ 40 45 50 55 60 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์

เดกซ์แทรนเนส โดยใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

5. ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่างและชนิดของบัฟเฟอร์

ทำการศึกษา โดยบ่มเอนไซม์ให้เจือจางในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่างต่างๆกัน คือ

ไกลซีน-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 2.5 - 3.5

อะซีเตทบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 3.5 - 6.0

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0 - 8.0

บ่มเอนไซม์เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

6. ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเข้มข้นของบัฟเฟอร์

ทำการศึกษา โดยบ่มเอนไซม์ให้เจือจางใน อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0 - 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 5.5 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณความเข้มข้นสุดท้ายของบัฟเฟอร์ในการทำปฏิกิริยา

7. การหาค่า K_m ของเอนไซม์

แปรผันความเข้มข้นของสับสเตรท ตั้งแต่ 0.01 - 5.0 % ของเดกซ์แทรน T-2000 บ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 15 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟในรูปของไลน์-วีเวอร์เบิร์ก ระหว่าง 1/V และ 1/[S] หาค่าจุดตัดแกน x นำไปคำนวณค่า K_m ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

การเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ได้จากเชื้อรากลายพันธุ์และสายพันธุ์ดั้งเดิม

นำคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ได้จากเชื้อรากลายพันธุ์ ซึ่งได้มีการศึกษาในการวิจัยครั้งนี้ เปรียบเทียบกับคุณสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ที่ได้จากเชื้อรา *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม และทำการศึกษาโดย เอก แสงวิเชียร (2531)