บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1 การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. 190-1

1.1 การเก็บรักษาเชื้อ

เลี้ยง Streptomyces sp.190-1 บนอาหารแข็งแมนนิทอลมังบีนฟาร์วอาการ์ (mannitol mung bean flour agar) ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petridish) (ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5-7 วัน หรือจนสปอร์แก่จัดเป็นสีเทา เติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว10 มล. ใช้ลูป (loop) เขี่ยสปอร์ให้แขวนลอยในน้ำ นำไปกรองผ่านสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อแยกเศษวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อออก แยกส่วนที่เป็นน้ำด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Top Bench Centrifuge;MSE model MINOR 35) เติม 20% กรีเซอรอล์ (glycerol) นับจำนวนสปอร์ด้วย Haemacy tometer ปิเปต 0.2 มล. ใส่ eppendorf tube นำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °ซ

1.2 การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum) ในขวดแก้วทรงกรวย

ปิเปต 0.1 มล. สารแขวนลอยของสปอร์ที่มีความเข้มข้น 1.52×10^{10} สปอร์/มล. ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มล. ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. (ภาคผนวกที่ 1.2) บ่มบนเครื่องเขย่า (incubator shaker; Psychrotherm model KF-4) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที โดยเลือกการเขย่าแบบเส้นตรง (reciprocal shaking) ประมาณ 24 ชม.

1.3 การเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทรงกรวย (Erlenmeyer Flask)

วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ ศิริลักษณ์ ธีระดากร (42) นำอาหารหัวเชื้อที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 1.2 ประมาณ 5 มล. ถ่ายลงใน 50 มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ ด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาทีเป็นเวลา 24 ชม. นำเซลที่ได้ไปตริงเอนไซม์ไว้ภายในเซลโดยใช้ความร้อนดังจะกล่าวในหัวข้อที่ 3

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองดัดแปลงมาจากวิธีของศิริลักษณ์ ธีระดากร (ภาคผนวกที่ 1.3) ต่างกันที่สารแหล่งอาหารที่เลือกใช้ คือสารแหล่งคาร์บอนได้แก่ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของรำข้าวสกัดไขมันแล้ว สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย สารแหล่งไนโตรเจนได้แก่ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง แอมโมเนียมฟอสเฟต วางแผนการทดลองแบบ Factorial Design 2^3 (44)

ปัจจัย A คือ สารแหล่งไนโตรเจน 2 ระดับคือ 0.036% และ 0.196% (โปรตีน) หรือ 0.0058% และ 0.031% (ไนโตรเจน)

ปัจจัย B คือ สารแหล่งคาร์บอน 2 ระดับคือ 0.095% และ 0.955% (น้ำตาลรีดิวส์)

ปัจจัย C คือ ยีสต์เอกซแทรก 2 ระดับคือ 0.03% และ 0.30%

ประกอบด้วย 8 สหภานการทดลอง ดังนี้

1. สารแหล่งไนโตรเจน 0.036% สารแหล่งคาร์บอน 0.095% ยีสต์เอกซแทรก 0.03%
2. สารแหล่งไนโตรเจน 0.036% สารแหล่งคาร์บอน 0.095% ยีสต์เอกซแทรก 0.30%
3. สารแหล่งไนโตรเจน 0.036% สารแหล่งคาร์บอน 0.955% ยีสต์เอกซแทรก 0.03%
4. สารแหล่งไนโตรเจน 0.036% สารแหล่งคาร์บอน 0.955% ยีสต์เอกซแทรก 0.30%
5. สารแหล่งไนโตรเจน 0.196% สารแหล่งคาร์บอน 0.095% ยีสต์เอกซแทรก 0.03%
6. สารแหล่งไนโตรเจน 0.196% สารแหล่งคาร์บอน 0.095% ยีสต์เอกซแทรก 0.30%
7. สารแหล่งไนโตรเจน 0.196% สารแหล่งคาร์บอน 0.955% ยีสต์เอกซแทรก 0.03%
8. สารแหล่งไนโตรเจน 0.196% สารแหล่งคาร์บอน 0.955% ยีสต์เอกซแทรก 0.30%

เกณฑ์ที่ใช้ประเมินผลการทดลองคือ มวลของเซล (cell mass) และเอนไซม์แอคติวิตี (enzyme activity)

1.4 การเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

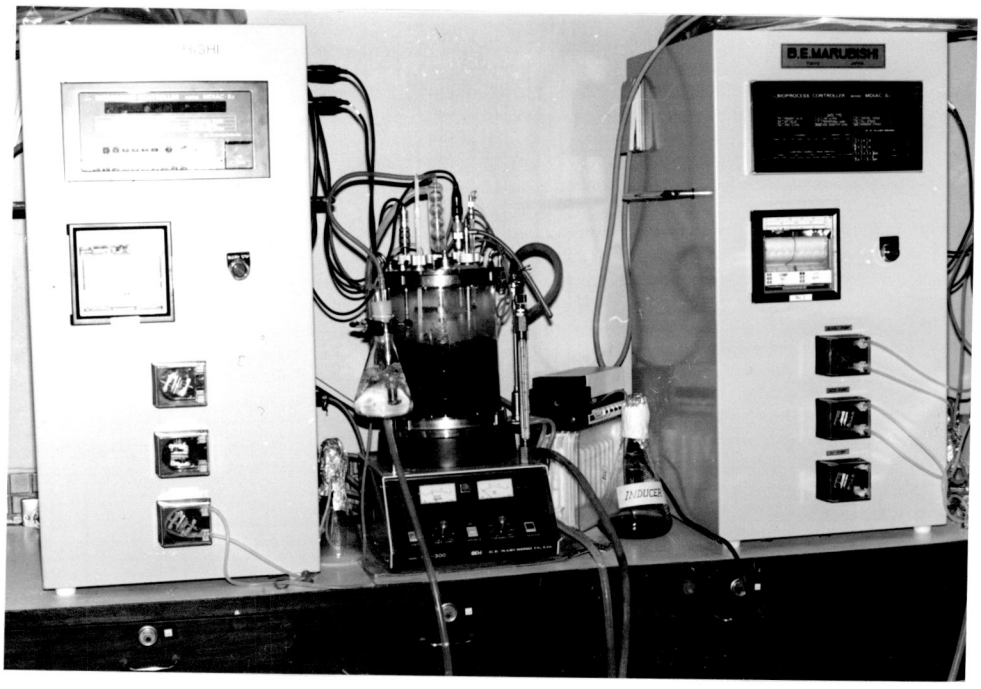
วิธีนี้ดัดแปลงจากวิธีของศิริลักษณ์ ธีระดากร (42) เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 1.2ปริมาณ 300 มล. เพื่อให้ได้ปริมาตรเป็น 10 เปอร์เซนต์ ของอาหารเหลวทั้งหมดที่บรรจุในถังหมักขนาด 5 ลิตร (5-litre fermentor and controller; Marubishi Lab. modelMD-300) ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารสำหรับผลิตกลูโคสไอโซ-เมอรเรส (ภาคผนวกที่ 1.4) ปริมาตร 3 ลิตร ซึ่งบรรจุในถังหมกขนาด 5 ลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ภายใต้ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 30 นาที ใช้อัตราการกวน (agitation speed) 400 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ (aeration rate) 1ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/ นาที (VVM) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30°ซ และอะเดคานอลเจือจางด้วยน้ำ 1:5 เท่า (adecanol) เป็นสารยับยั้งการเกิดฟอง (antifoam) เก็บตัวอย่างครั้งละ 50 มล. ที่ 6 ชม.หลังการเติมหัวเชื้อและทุก 3ชม. หลังจากนั้นเป็นเวลา 30 ชม. นำเซลที่ได้ไปตริงเอนไซม์ไว้กับเซลโดยใช้ความร้อนดังจะกล่าวในหัวข้อที่ 3 เติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้ายอย่างต่อเนื่องในระว่างการหมักโดยใช้ปั๊มแบบเพอริสแตลติก (peristaetic pump; Microperpex - model 2132)

2. การเตรียมวัตถุดิบเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 การเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย

(H_2SO_4 hydrolysate of cottonseed hulls)

โดยการดัดแปลงจากวิธีของ ศิริลักษณ์ ธีระดากร (42) โดยนำเปลือกเมล็ดฝ้ายบดละเอียดขนาด 1 มม. และอบแห้ง ปริมาณ 1 กก. ผสมกับแอมโมเนียเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ปริมาตร 4 ลิตร นึ่งที่อุณหภูมิ 121°ซ ภายใต้ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 30 นาที กรองแยกน้ำออก นำกากที่ได้ล้างด้วยน้ำอุ่นหลาย ๆ ครั้ง เพื่อล้างสิ่งปนเปื้อนออกจากเปลือกเมล็ดฝ้าย นำกากดังกล่าวมาผสมกับ 4 ลิตรของ 3 เปอร์เซนต์ กรดกำมะถัน นำไปนึ่งที่อุณหภูมิและความดันเท่าเดิมนาน 90นาที กรองแยกกากออกนำสารละลายที่ได้มาต้มด้วยไอน้ำเดือดนาน 30 นาที ปรับพีเอชของสารละลายให้ได้ค่าพีเอช 7.0 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) กรองแยกตะกอนออก นำสารละลายที่ได้ไประเหยจนมีความเข้มข้นประมาณ 32°บริกซ์ (Brix) นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกลูโคสตามวิธีการที่จะกล่าวต่อไปในหัวข้อที่ 6



รูปที่ 1. แสดงการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสในถังหมัก 5 ลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของรำข้าวที่สกัดไขมันแล้ว (H_2SO_4 hydrolsate of defatted rice bran)

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chen และ Anderson (10) นำรำข้าวสกัดไขมันและอบแห้งแล้วขนาด 40 เมช (mesh; 0.42 มม.) ปริมาณ 12 กรัม ผสมกับ 40 มล. ของกรดกำมะถันเข้มข้น 1 นอร์มอล (mormal) นึ่งที่อุณหภูมิ 121°ซ ภายใต้ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 40 นาที สกัดสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งแรก 50 มล. ครั้งที่สอง 30 มล. ปรับพีเอชสารละลายที่ได้ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 โมลาร์ กรองตะกอนที่เกิดขึ้นทิ้งไปนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกลูโคส ตามวิธีการที่จะกล่าวต่อไปในหัวข้อที่ 6

2.3 การเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง (H_2So_4 hydrolysate of soy bean meal)

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chen และ Anderson (10) นำกากถั่วเหลืองอบแห้งขนาด20 เมช (mesh; 0.84 มม.) มาย่อยด้วยกรดกำมะถันและสกัดแยกตามวิธีข้อ 2.2 นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและไนโตรเจนตามวิธีที่จะกล่าวในหัวข้อที่ 6

3. การตรึงเอไซม์ไว้ภายนเซลของ Streptomyces sp. 190-1 โดยใช้ความร้อน

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Takasaki และคณะ (45) นำเซลที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 °ซ (Portable Thermoregulators; Techn model TU-16-D) นาน 10 นาที ทำให้เย็นแล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองวอท-แมนเบอร์ 1 (What man fiter paper No.1) ล้างเซลที่กรองได้ด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง เก็บเซลที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ

4. การวิเคราะห์การเจริญของ Streptomyces sp. 190-1

นำกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ไปอบแห้งในตู้ไมโครเวฟ (Variable Power Cooking; National model NE-7670) โดยตั้งสวิทส์ที่ตำแหน่งดีฟอร์ส (defrost) นาน 15 นาที ปล่อยให้เย็นในเดซซิเคเตอร์ (dessicator) นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง จนได้น้ำหนักคงที่ ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อมา 5 มล. นำไปกรองด้วยกระดาษกรองที่กล่าวถึงในข้างต้น ล้างเซลที่กรองด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง นำกระดาษกรองไปอบแห้ง

ในตู้ไมโครเวฟวิธีการเหมือนเดิมนำมาชั่งน้ำหนัก และคำนวณหามวลของเซลตามสูตร

% มวลของเซล (Cell mass) =

$$\frac{\text{น้ำหนักแห้งของเซลและกระดาษกรอง} - \text{น้ำหนักแห้งกระดาษกรอง} \times 100}{5}$$

5. การวิเคราะห์เซลของ Streptomyces sp. 190-1

นำเซลของ Streptomyces sp. 190-1 ผ่านการตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลมาวิเคราะห์ ดังนี้

5.1 การหาน้ำหนักแห้งของเซล

นำอลูมิเนียมฟอยล์ (aluminum foil) ที่พับเป็นรูปถ้วยเล็ก ๆ ไปอบที่ 105 °ซ นาน 3 ชม. ปล่อยให้เย็นในเดซซิเคเตอร์ (dessicator) นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดถึงทศนิยม 4 ตำหน่ง ชั่งเซลที่ต้องการหาน้ำหนักแห้งในภาชนะที่กล่าวข้างต้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 105° ซ จนได้น้ำหนักคงที่ปล่อยให้เย็นในเดซซิเคเตอร์ นำมาชั่งน้ำหนักและคำนวณหาน้ำหนักแห้ง

5.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ถูกตรึงอยู่ภายในเซล

ดัดแปลงจากวิธีของศิริลักษณ์ ธีระดากร (42) โดยการวัดปริมาณฟรักโทสซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนกลูโคสโดยกลูโคสไอโซเมอรเรสมีขั้นตอนดังนี้ คือ บ่มเซลประมาณ 20-30 มก. (น้ำหนักเปียก) ที่รู้น้ำหนักแน่นอนแล้วและสามารถคำนวณหาน้ำหนักแห้งได้ บ่มเซลในส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ซึ่งประกอบด้วย

0.5	โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0	0.6 มล.
0.1	โมลาร์แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1 มล.
0.001	โมลาร์โคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	0.2 มล.
1.0	โมลาร์กลูโคส (glcose monohydrate)	1.0 มล.
	น้ำกลั่น	1.0 มล.

ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 80 °ซ เก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 10, 18 และ 24 ตัวอย่างละ20 ไมโครลิตร (µl) ทำให้เจือจาง 300 เท่าด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปหาปริมาณฟรักโทสโดยวิธีของ Marshall และ Kooi (5) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายฟรักโทสมาตรฐานจากกราฟมาตรฐานของฟรักโทส (ภาคผนวกที่ 2.1)

หน่วยแอคติวิตีของเอมไซม์ในที่นี้ 1 หน่วย (unit) ของเอนไซม์คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทส 1 ไมโครโมล (μmole) ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะของวิธีการตรวจสอบเอนไซม์ดังกล่าวมาข้างต้น

6. การวิเคราะห์น้ำหมัก (fermentation broth)

นำส่วนน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านกระดาษกรองวอทแมนบอร์ 1 มาวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

6.1 วัดค่าพีเอชของอาหาร

โดยเครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter; Radioeter model PHM 82

6.2 วิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (total soluble solid)

อบอลูมิเนียมฟอยล์ที่พับเป็นรูปถ้วยเล็ก ๆ ที่อุณหภูมิ 105 °ซ นาน 3 ชม. ปล่อยให้เย็นในเดซซิเคเตอร์นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง ปิเปตส่วนใสของน้ำหมักที่เตรียมข้างต้น 1 มล. ใส่ลงในภาชนะดังกล่าวข้างต้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 105° ซ จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณของแข็งทั้งหมด

6.3 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

โดยวิธีของ Bernfeld (46) เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวกที่ 2.2) 1 มล. ลงในสารละลายตัวอย่าง 1 มล. โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งให้เย็นและเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. เขย่าให้เข้ากันวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer;Bausch & Lomb model Spectonic 21) และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ของสารละลายตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-1.0 มก./มล.

6.4 วิเคราะห์ปริมาณไซโลส

โดยดัดแปลงจากวิธีของ Goodwin (47) เติมสารละลายแอนทรีลีน (ภาคผนวกที่ 2.3) 5 มล. ลงในสารละลายตัวอย่าง 0.1 มล. โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เขย่าให้เข้ากันแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 80 °ซ นาน 10 นาที ทำให้เย็นและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และหาปริมาณน้ำตาลไซโลสของสารละลายตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานไซโลสเข้มข้นตั้งแต่ 0-400 ไมโครกรัม/มล.

6.5 วิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส

โดยใช้เครื่องวิเคราะห์น้ำตาล (Industrial Analyzer; Yellow Springs Instrument Co., model 27)

6.6 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

โดยวิธี Lowry's Method (48) เติมสารละลายผสมลอร์รีซี (Lowry C; ภาคผนวก ที่ 2.4.3) 5 มล. ในสารละลายตัวอย่าง 1 มล. โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที แล้วเติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ (Folin Ciocalteau's phenol reagent; ภาคผนวกที่ 2.4.4) 0.5 มล. เขย่าเป็นครั้งคราว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และหาปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโบวีนเซรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ที่เข้มข้นตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัม/มล.

6.7 วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)

โดยวิธี Kjeldahl ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัมหรือปริมาตร 10 มล. ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด300 มล. เติมของผสมของเกลือ (ภาคผนวกที่ 2.5.1) 7 กรัม และเติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร15 มล. นำไปย่อยบนเตาหลุม (digestor) ด้วยเครื่องย่อย (Digestor, Buchi Labotary-Techniques model Buchi 425 Digestor) จนได้สารละลายใสในตู้ควันทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) 20 มล.แล้วนำไปเข้าเครื่องกลั่น (Distillation Unit, Buchi Labotary-Techniques model Buchi 315) กลั่นจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายกรดบอร์ลิก(H_3BO_3) เข้มข้น 4% ปริมาตร. 100 มล. ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ (indicator) อยู่ 3 หยด (ภาคผนวกที่ 2.5.2) กลั่นจนกระทั่งสารละลายกรดบอร์ริกมีปริมาตรเป็น 250 มล. นำสารละลายที่ได้ไปติเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดกำมะถัน (ภาคผนวกที่ 2.5.3) และคำนวณเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนทั้งหมดดังนี้

ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด =

$$\frac{\text{ปริมาตรติเตรทของตัวอย่าง} \times \text{ความเข้มข้นของกรดกำมะถัน} \times 1.4}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

ร้อยละของโปรตีนทั้งหมด = ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด x 6.25