หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1

1.1 การเก็บรักษาเชื้อ

เชื้อสปอร์ของเชื้อประมาณ 3 - 4 ลูป (loop) ลาก (streak) บนอาหารแข็งเอียง (agar slant) ซึ่งปรับปรุงจากสูตรอาหารของ Kasumi และคณะ (51) กับ Chen และคณะ (52) (ซึ่งอยู่ในภาคผนวกหมายเลข 1.1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 7 วัน หรือจนเชื้อสร้างสปอร์แก่จัด จึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (deep freezer)

1.2 การเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทรงกรวย (erlenmeyer flask)

วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ นฤมล คุ้มจรรยา (49) โดยนำสปอร์แขวนลอยของเชื้อถ่ายลงใน 50 มล. ของอาหารเหลวที่ใช้สำหรับเตรียมหัวเชื้อ (starter; ภาคผนวกที่ 1.2) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ (controled environment incubator shaker; model G-27, New Brunswick Scientific, Co., Inc., U.S.A) ที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำหัวเชื้อนี้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลวทั้งหมดถ่ายลงใน 50 มล.ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่า ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลโดยใช้ความร้อนดังกล่าวไว้ในหัวข้อที่ 3

1.3 การเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร (5-litre fermentor)

วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ นฤมล คุ้มจรรยา (49) โดยเตรียมหัวเชื้อด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 1.2 จำนวน 4 ขวด เพื่อให้ได้ปริมาตรเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลวทั้งหมด

ที่บรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (5-litre fermentor and controller, model MD-300, Marubishi Laboratory Co., Ltd., Japan) ถ่ายหัวเชื้อทั้งหมดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ (ภาคผนวก 1.4) ปริมาตร 2 ลิตร ซึ่งบรรจุในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสภายใต้ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 30 นาที ใช้อัตราการกวน (agitation rate) 400 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ (aeration rate) 1 ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที (VVM) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และใช้อะเดคานอลเจือจางด้วยน้ำ 1 : 5 เท่า (adecanol) เป็นสารยับยั้งการเกิดฟอง (antifoam) เก็บตัวอย่างครั้งละ 50 มล. ที่ 6 ชั่วโมงหลังจากเติมหัวเชื้อ และทุก 3 ชั่วโมงหลังจากนั้นเป็นเวลา 27 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลโดยใช้ความร้อน ดังจะกล่าวในหัวข้อที่ 3

2. <u>การเตรียมวัตถุดิบเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

2.1 <u>การเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของรำข้าวที่สกัดไขมันแล้ว</u>

(H_2SO_4 hydrolysate of defatted rice bran)

วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chen และ Anderson (52) โดยนำรำข้าวสกัดไขมันและอบแห้งแล้ว ขนาด 40 เมช (mesh; 0.42 มม.) ปริมาณ 12 กรัม มาผสมกับ 40 มล. ของกรดกำมะถันเข้มข้น 1 นอร์มอล (normal) และนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสภายใต้ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 40 นาที สกัดสารที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งแรก 50 มล. และครั้งที่สอง 30 มล. ปรับพีเอชของสารละลายที่สกัดได้ให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 โมลาร์ กรองตะกอนที่เกิดขึ้นทิ้งไป เก็บส่วนสารละลายไว้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

2.2 <u>การเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง</u>

(H_2SO_4 hydrolysate of soy bean meal)

นำกากถั่วเหลืองอบแห้งขนาด 20 เมช (0.84 มม.) มาย่อยด้วยกรดกำมะถันและสกัดแยกสารที่ได้ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 2.1

2.3 การเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย (H_2SO_4 hydrolysats of cottonseed hulls)

วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Suminoe และ Okamura (53) โดยนำเปลือกเมล็ดฝ้ายบดละเอียดและอบแห้งขนาด 1 มม. ปริมาณ 1 กิโลกรัม ผสมกับ 4 ลิตรของสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น 0.1 % และนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสภายใต้ความดันไอน้ำ 14.22 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 30 นาที กรองเอากากมาล้างด้วยน้ำอุ่นหลาย ๆ ครั้ง นำกากดังกล่าวมาผสมกับ 4 ลิตรของกรดกำมะถันเข้มข้น 3 % แล้วนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสภายใต้ความดันไอน้ำ 14.22 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 90 นาที กรองเอากากออก นำสารละลายที่ได้มาต้มด้วยไอน้ำเดือดนาน 30 นาที ปรับพีเอชของสารละลายที่ได้ให้เป็นกลางด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) กรองเอาตะกอนออกและนำสารละลายไประเหยจนมีความเข้มข้นประมาณ 32° บริกซ์ (Brix) นำสารละลายที่เตรียมได้ไปหาปริมาณน้ำตาลไซโลสตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 5.6

3. การตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 โดยใช้ความร้อน

วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Takasaki และคณะ (54) โดยนำเซลที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath, model D 3165, Hänigsen Kottermann, West Germany) ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 (Whatman filter paper No. 1) ล้างเซลที่กรองได้ด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง เก็บเซลที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การวิเคราะห์เซลของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1

นำเซลของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ที่ผ่านการตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลแล้วมาวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

4.1 วิเคราะห์การเจริญ (growth)

วิเคราะห์การเจริญของเชื้อโดยการหาน้ำหนักแห้งของเซล (dry weight) โดยนำแผ่นอะลูมินัมอบในตู้อบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักแน่นอนถึง 0.1 มก. ชั่งเซลที่ต้องการหาน้ำหนักแห้ง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสใน

ภาชนะดังกล่าวข้างต้น ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ นำมาชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักที่คงที่ คำนวณหาน้ำหนักแห้ง

4.2 วิเคราะห์การทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ถูกตรึงอยู่ภายในเซล

ทำได้โดยการวัดปริมาณฟรักโทส์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคส์ โดยเอนไซม์ดังกล่าว ขั้นตอนดำเนินการคือ บ่มเซลประมาณ 20 มก. (นน.ชื้น) ในส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ซึ่งประกอบด้วย 1.0 มล. ของ 1.0 โมลาร์กลูโคส์, 0.6 มล. ของ 0.5 โมลาร์โซเดียมฟอส์เฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0, 0.1 มล.ของ 0.1 โมลาร์มักเนเซียมซัลเฟต, 0.2 มล. ของ 0.001 โมลาร์โคบอลท์คลอไรด์ และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 2.0 มล. นำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส์ เก็บสารละลายตัวอย่างที่เวลา 1 นาที และทุก ๆ 10 นาที เป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจาง 300 เท่าด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปหาปริมาณของฟรักโทส์โดยวิธีการของ Marshall และ Kooi (5) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Dische และ Borenfreund (55) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายฟรักโทส์มาตรฐานจากกราฟมาตรฐานของฟรักโทส์ (ภาคผนวกที่ 3)

ในที่นี้ 1 หน่วยของเอนไซม์ (unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนกลูโคส์เป็นฟรักโทส์ 1 ไมโครโมล (μ mole) ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะของวิธีการตรวจสอบเอนไซม์ดังกล่าวมาข้างต้น

5. การวิเคราะห์น้ำล่า (fermented broth)

นำน้ำล่าที่ผ่านการตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลของจุลินทรีย์โดยความร้อนแล้ว โดยนำส่วนใส่ที่กรองได้มาวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

5.1 วัดค่าพีเอชของอาหาร โดยเครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter, Model Ø 70, Beckman, U.S.A)

5.2 วิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (total soluble solid)

อบถ้วยเหล็ก (stainless steel cup) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส์ ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักแน่นอนถึง 0.1 มก. ปิเปตส่วนใส่ของน้ำล่าที่เตรียมข้างต้น

10 มล. ลงในภาชนะดังกล่าวข้างต้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณของแข็งทั้งหมด

5.3 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry's Method (56)

เติมสารละลายผสมลอร์รี ซี (Lowry C.; ภาคผนวก 2.1.3) 5.0 มล. ลงในสารละลายตัวอย่าง 1.0 มล. โดยใช้น้ำกลั่น 1.0 มล. เป็นตัวเทียบ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ (Folin ciocalteau's phenol reagent; ภาคผนวก 2.1.4) 0.5 มล. เขย่าเป็นครั้งคราว และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และหาค่าปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานโบวีนเซรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 200 ไมโครกรัมต่อ มล.

5.4 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ โดยวิธีของ Bernfeld (57)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก 2.2.1) 1 มล. ลงในสารละลายตัวอย่าง 1 มล. โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งให้เย็นและเติมน้ำกลั่นอีก 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer, model spectronic 21, Busch & Lomb, U.S.A) และหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ของสารละลายตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0.1 - 1.0 มก.ต่อ มล.

5.5 วิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส โดยวิธีของ Huggett และ Nixon (58)

เติมสารละลาย พี.จี.โอ. เอนไซม์ (P.G.O. Enzyme, ภาคผนวก 2.3.1) 2.5 มล. ลงในสารละลายตัวอย่าง 0.25 มล. โดยใช้น้ำกลั่น 0.25 มล. เป็นตัวเทียบ เขย่าให้เข้ากันแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และหาค่าปริมาณกลูโคสของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0 - 200 ไมโครกรัมต่อมล.

5.6 วิเคราะห์หาปริมาณไซโลส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Goodwin (59)

เติมสารละลายแอนนิลีน (aniline reagent; ภาคผนวก 2.4.1) 5.0 มล. ลงในสารละลายตัวอย่าง 0.1 มล. โดยใช้น้ำกลั่น 0.1 มล. เป็นตัวเทียบ เขย่าให้เข้ากัน แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำให้เย็นและวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และหาค่าปริมาณไซโลสของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานไซโลส ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0 - 400 ไมโครกรัมต่อ มล.

6. การวิเคราะห์เปรียบเทียบการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 กับสวีทไซม์ไทพ์เอ (Sweetzyme type A, Novo Industri, Denmark)

วิเคราะห์การทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดภายใต้สองสภาวะ ซึ่งแต่ละสภาวะก็เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด คือ

6.1 สภาวะที่หนึ่ง เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ซึ่งมีขั้นตอนดำเนินการเช่นเกียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 4.2

6.2 สภาวะที่สอง เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรส สวีทไซม์ไทพ์ เอ ที่ผลิตโดย Bacillus coagulans NRRL B 5656 ซึ่งมีขั้นตอนดำเนินการเช่นเกียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 4.2 ยกเว้นส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 1.35 มล. ของ 3.0 โมลาร์กลูโคส, 0.40 มล. ของ 0.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์, พีเอช 8.5, 0.16 มล. ของ 0.1 โมลาร์แมกเนเซียมซัลเฟตและเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 2.0 มล. นำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที