บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และ วิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์

ตู้บ่มเชื้อ (controlled environment incubator) ของ New Brunswick - Scientific Co., Inc., Edison, NJ, U.S.A.

เครื่องเหวี่ยง (Sorvall RC-5B refrigerated superspeed centrifuge) ของ Du-Pont, Newtown, CT 06470, U.S.A.

สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic 21) ของ Bausch and Lomb, Rochester, U.S.A.

สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (double beam spectrophotometer model 200-20) ของ Hitachi, Tokyo, Japan.

เครื่องมือวัดพีเอช (๔70 pH-meter) ของ Beckman, Irvine, CA, U.S.A.

เครื่องกรองแบบอัลตรา (ultrafiltration) และ แผ่นกรองยูเอ็ม-10 ของ Amicon, Lexington, Massachusetts, U.S.A.

เครื่องเก็บลำดับส่วน (fractional collector) ของ LKB Bromma, Sweden.

เครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ของ Hoefer Scientific Instrument, San Francisco, U.S.A.

2. เคมีภัณฑ์

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ผงสกัดยีสต์ (yeast extract) ของ Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.

เปปโตน (peptone) ของ Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บีฟเอกซ์แทรก (beef extract) ของ Gibco, Madison, Wisconsin, U.S.A.
กากถั่วเหลืองหีบน้ำมัน ของ บริษัทขนากรน้ำมันพืช จำกัด ประเทศไทย

2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์

พีจีโอ เอนไซม์ (PGO enzymes) ของ Sigma, St. Louis, U.S.A.
สีไดอะนิซิดีน (O-dianisidine) ของ Sigma, St. Louis, U.S.A.
ไกลโคเจน (glycogen from oyster type II) ของ Sigma, St. Louis, U.S.A.
แป้งละลายน้ำ (starch soluble reagent grade) ของ Pfanstiehl Laboratories, Inc., Waukegan, Illinois, U.S.A.
แป้งข้าวโพด ของ บริษัทซีพีซีประเทศไทย จำกัด ประเทศไทย
แป้งสาลี ของ บริษัทยูไนเต็ดฟลาวมิลล์ จำกัด ประเทศไทย
แป้งข้าวเจ้า ของ บริษัทโรงเส้นหมี่ซอเฮง จำกัด ประเทศไทย
แป้งข้าวเหนียว ของ บริษัทโรงเส้นหมี่ซอเฮง จำกัด ประเทศไทย
แป้งมันสำปะหลัง ของ โรงงานแป้งมันไทยทำ ประเทศไทย

2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับการทำโครมาโตกราฟี

เซฟาเดกซ์ จี-150, ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 และ ซีเอ็ม-เซฟาเดกซ์ ซี-50 ขนาด 40 - 120 μ ของ Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden.
อะคริลาไมด์ (acrylamide) ของ Sigma, St. Louis, U.S.A.
เมธิลีน บีส อะคริลาไมด์ (N,N'-methylene bis acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.
เตตราเมธิลีนไดอะมีน (N,N,N',N'-tetramethylene-diamine) ของ Sigma, U.S.A.
ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ของ BDH Laboratory Chemicals Ltd., Pools, England.
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) ของ BDH Laboratory Chemicals.
สีเมธิลกรีน (methyl green) ของ BDH Laboratory Chemicals Ltd., England.
สีย้อมโคแมสซีบริลเลียนท์บลู (coomassie brilliant blue G250) ของ Fluka AG Buchs, Switzerland.
เบตา-อะลานีน (β-alanine) ของ Fluka AG Buchs, Switzerland.

กระดาษโครมาโตกราฟี (chromatographic paper) ของ Whatman Ltd., England.
บิวทานอล (n-butanol) ของ May and Baker Ltd., Dagenham, England.
ไพริดีน (pyridine) ของ May and Baker Ltd., Dagenham, England.

โปรตีนมาตรฐาน: เซรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, fraction V powder, 96-99% albumin) ของ Sigma, St. Louis, U.S.A.
ไคโมทริปซิโนเจน (α-chymotrypsinogen-A from bovine pancreas, salt free type I) ของ Sigma, St. Louis, U.S.A.
ไซโตโครม ซี (cytochrome C, 60-70% purity) ของ BDH Laboratory Chemicals Ltd., Pools, England.

2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ฟีนอล (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) ของ E. Merck, Darmstadt, Germany.
คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate 5-hydrate) ของ E. Merck, Germany.
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ของ E. Merck, Germany.
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรท (sodium potassium tartrate) ของ Fluka AG Buchs, Switzerland.
อัลบูมิน (fraction V, 96-99% albumin, bovine) ของ Sigma, U.S.A.

2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์กลูโคซามีน

กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (glucosamine hydrochloride) ของ Sigma, U.S.A.
อะเซทิลอะซีโตน (acetyl acetone) ของ Fluka AG Buchs, Switzerland.
ไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (4-dimethylamino-benzaldehyde) ของ Fluka AG Buchs, Switzerland.
เอธานอล (absolute ethanol) ของ E. Merck, Darmstadt, Germany.
โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) ของ E. Merck, Germany.
กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ของ BDH Laboratory Chemicals Ltd., Pools, England.

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 อาหารวุ้นพีดีเอ (potato dextrose agar) สำหรับใช้แยกเชื้ออะไมโลไมซีสจากลูกแป้ง ซึ่งในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

3.2 อาหารวุ้นแป้ง (starch agar) สำหรับใช้เก็บรักษาเชื้ออะไมโลไมซีส (Pichyangkura และ Pornsilapatip,1984) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งข้าวเจ้า	10	กรัม
บีฟเอกซ์แทรก	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้น	20	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

3.3 อาหารสังเคราะห์เหลว (screening synthetic broth) สำหรับการคัดเลือกเชื้ออะไมโลไมซีสที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบได้สูง ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

ผงสกัดยีสต์	2.0	กรัม
บีฟเอกซ์แทรก	3.0	กรัม
เปปโตน	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ทิ้งไว้จนเย็น จึงนำมาผสมกับแป้งข้าวเจ้า 2.5 กรัม ซึ่งอบแห้ง ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 150 °ซ นาน 30 นาที

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (solid cultural medium) ซึ่งได้ดัดแปลงจากสูตรของ Hayashida และ Flor (1981) ในขวดทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

009316

ประกอบด้วย

รำข้าวเจ้าหยาบ	10.00	กรัม
แกลบ	0.02	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

4. การแยกเชื้ออะไมโลไมซีสจากลูกแป้ง

เชื้ออะไมโลไมซีสที่ใช้ในการศึกษานี้ แยกจากลูกแป้งสุราและลูกแป้งข้าวหมากจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย โดยมีวิธีดำเนินงานดังนี้ นำลูกแป้งมาละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เขย่าให้เชื้อกระจาย แล้วนำมาลาก (streak) บนอาหารวุ้นพีดีเอ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ จนมีการเจริญของเชื้อปรากฏขึ้น แยกเอาเชื้ออะไมโลไมซีสมาทำให้บริสุทธิ์โดยการลากเชื้อบนอาหารแข็งให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ แล้วแยกเอาโคโลนีเดี่ยวไปเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียงแป้ง (starch agar slant)

5. การคัดเลือกเชื้ออะไมโลไมซีสที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบได้สูง

5.1 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น ใช้วิธีการดิสค์ คัลเจอร์ (disc culture technique) โดยเลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เจาะก้อนเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. จำนวน 3 ชิ้น ไปเพาะในจานเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสังเคราะห์เหลวที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วดูดเอาอาหารเหลวไปตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์กับแป้งดิบ

5.2 นำเชื้อที่คัดได้ในข้อ 5.1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ได้ปรับความชื้นของอาหารด้วยน้ำกลั่นเป็น 40% โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อปลูกก้อนเชื้อจำนวน 3 ชิ้น และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ ครบ 48 ชั่วโมง แล้ว นำมาสกัดเอนไซม์ออกด้วยน้ำกลั่น 50 มล. นาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10°ซ กรองเอาส่วนใสไปตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์กับแป้งดิบ

6. การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์

6.1 การตรวจสอบแอคติวิตีกับแป้งดิบ ได้ปรับปรุงจากวิธีการของ Hayashida (1975) ตรวจสอบแอคติวิตีกับแป้งดิบโดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นพอเหมาะ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารแขวนลอยของแป้งมันสำปะหลัง (แป้งมันสำปะหลัง 3% ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.0) จำนวน 4.5 มิลลิลิตร ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 40 °ซ นาน 30 นาที เขย่าแป้งให้กระจายออกทุกๆ 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่หลอดทดลองในน้ำเดือด 5 นาที และ ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณกลูโคส ตามวิธีการของ Sigma (1980)

กำหนดให้ ความสามารถในการย่อยแป้งดิบ 1 หน่วย หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังดิบให้ได้กลูโคส 1 มิลลิกรัม ในเวลา 100 นาที ภายใต้สภาวะการตรวจสอบข้างต้น

6.2 การตรวจสอบกลูโคอะไมเลสแอคติวิตี ได้ตรวจสอบกลูโคอะไมเลส - แอคติวิตีโดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นพอเหมาะ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายน้ำแป้งสุก (แป้งละลายน้ำ 1% ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.0) จำนวน 4.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 40 °ซ นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่หลอดทดลองลงในน้ำเดือด 5 นาที และ ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณกลูโคส ตามวิธีการของ Sigma (1980)

กำหนดให้ 1 หน่วยของกลูโคอะไมเลสแอคติวิตี หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายแป้งให้ได้กลูโคส 1 มิลลิกรัม ภายใต้สภาวะตรวจสอบข้างต้น

6.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส วัดปริมาณกลูโคสโดยใช้พีจีโอเอนไซม์ (PGO enzymes) หรือ ระบบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสกับกลูโคออกซิเดส (Sigma, 1980) โดยการนำสารละลายกลูโคส (10-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายพีจีโอเอนไซม์ (พีจีโอเอนไซม์ 1 แคปซูล ละลายในน้ำ 99.5 มิลลิลิตร ผสมกับสีโอ-ไดอะนิซิดีน 1% ซึ่งละลายในเอธานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร) จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เมื่อนำไปแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 37 °ซ นาน 30 นาที แล้ว

นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ด้วยเครื่องเสปคโตรนิค 21 นำค่าที่ได้มาหาปริมาณกลูโคสโดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

7. <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ</u>

7.1 <u>ขนาดของรำข้าวเจ้า</u> เลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็งรำหยาบที่มีสูตรอาหารปรากฏอยู่ในข้อ 3.4 และบนอาหารแข็งที่ใช้รำละเอียดแทนรำหยาบ ปรับความชื้นของอาหารให้เป็น 40 % ด้วยน้ำ ให้ได้พีเอช 3.5 และ ปลูกเชื้อขนาด 1×10^6 สปอร์ เมื่อบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ครบ 48 ชั่วโมง แล้วนำนำมาสกัดและตรวจหาแอคติวิตีกับแป้งดิบ

7.2 <u>อัตราส่วนของรำหยาบและแป้งข้าวเจ้าในอาหารแข็ง</u> ได้ทดลองผันแปรอัตราส่วนน้ำหนักของรำหยาบ แป้งข้าวเจ้า และ แกลบ เป็น 50:0:1, 40:10:1, 30:20:1, 20:30:1, 10:40:1 และ 0:50:1 โดยมีอาหารแข็ง 10 กรัม บรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. ซึ่งมีวิธีดำเนินงานดังนี้

ชั่งรำหยาบและแกลบใส่ขวดทรงกรวย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ส่วนแป้งข้าวเจ้าเมื่อชั่งแล้ว นำไปแยกอบฆ่าเชื้อต่างหากที่อุณหภูมิ 150 °ซ นาน 30 นาที จึงนำมาคลุกกับรำและแกลบในขวด ปลูกเชื้อขนาด 1×10^6 สปอร์ และ ปรับความชื้นของอาหารให้เป็น 40% ด้วยน้ำ ค่าพีเอชของอาหารเป็น 3.5 ภายหลังจากการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ จนครบ 48 ชั่วโมง แล้ว นำมาสกัดและตรวจสอบแอคติวิตีกับแป้งดิบ

7.3 <u>ความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ</u> เลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็งที่เตรียมตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ข้อ 3.4 โดยผันแปรความชื้นของอาหารด้วยน้ำ 30, 40, 50 และ 60 % โดยน้ำหนักแห้ง ที่มีพีเอชเท่ากับ 3.5 เมื่อปลูกเชื้อขนาด 1×10^6 สปอร์ แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 30 °ซ เก็บตัวอย่างมาสกัดและตรวจหาแอคติวิตีกับแป้งดิบทุกๆ 12 ชั่วโมง ตลอดเวลาการบ่มเชื้อจนครบ 72 ชั่วโมง

7.4 <u>อัตราส่วนของแกลบในอาหารแข็ง</u> มีวิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 7.3 โดยให้อัตราส่วนของรำและแป้งคงที่ แต่ผันแปรอัตราส่วนน้ำหนักของแกลบดังนี้ คือ รำ แป้ง แกลบ เป็น 30:20:0, 30:20:1, 30:20:5, 30:20:10, 30:20:15,

30:20:20, 30:20:25 และ 30:20:30

7.5 <u>พีเอชเริ่มต้นของอาหารแข็ง</u> เลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยรำและแป้ง อัตราส่วน 3:2 ปรับความชื้นของอาหารแข็งให้ได้ 50 % ด้วยน้ำให้ค่าพีเอชของอาหารต่างกัน 0.5 ตั้งแต่พีเอช 2.5 ถึง 7.0

7.6 <u>ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารแข็ง</u> เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่เตรียมขึ้นเช่นเดียวกับข้อ 7.5 โดยใช้น้ำปรับความชื้นให้อาหารมีค่าพีเอช 3.5 และปลูกเชื้ออะไมโลไมซีสขนาดต่างๆ กัน คือ 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7 และ 1×10^8 สปอร์

7.7 <u>อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับบ่มเชื้อ</u> เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งตามวิธีในข้อ 7.6 โดยปลูกเชื้อขนาด 5×10^6 สปอร์ แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 °ซ เก็บตัวอย่างมาทดสอบแอคติวิตีกับแป้งดิบทุกๆ 6 ชั่วโมง ตลอดเวลาการบ่มเชื้อ 60 ชั่วโมง

7.8 <u>ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน</u> เลี้ยงเชื้ออะไมโลไมซีสบนอาหารแข็งซึ่งมีองค์ประกอบและวิธีการตามข้อ 7.7 ผสมแหล่งไนโตรเจนต่างๆ กันโดยน้ำหนักแห้งดังต่อไปนี้

7.8.1 ผงสกัดจากยีสต์ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 3.0 %

7.8.2 เปปโตน 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 3.0 %

7.8.3 กากถั่วเหลือง 0, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10.0 และ 15.0 %

7.8.4 แอมโมเนียมซิเตรท 0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 %

7.8.5 แอมโมเนียมทาร์เตรท 0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 %

7.8.6 กากถั่วเหลือง 4.0, 5.0 และ 6.0 % ผสมกับ แอมโมเนียมซิเตรท 0.5, 1.0 และ 1.5 % โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (factorial design) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดและทดสอบแอคติวิตีกับแป้งดิบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.9 ปริมาณของเกลือแร่

7.9.1 แมกนีเซียมซัลเฟต ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 7.7 เติมกากถั่วเหลือง 5% และ แอมโมเนียมซิเตรท 0.5% ลงในอาหารแข็งพร้อมกับผันแปรปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เติมลงไปเป็น 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 % โดยน้ำหนักแห้ง

7.9.2 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 7.9.1 เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1% ลงในอาหารแข็ง พร้อมกับผันแปรปริมาณของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เติมลงไปเป็น 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 % โดยน้ำหนักแห้ง

8. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างเอนไซม์และการเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็ง

เลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งซึ่งมีองค์ประกอบตามข้อ 7.9.2 และ เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.15% เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง มาตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้ออะไมโลไมซีส การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ ความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ การเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

9. การตรวจวัดความเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารแข็ง

ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารแข็ง โดยอาศัยปริมาณกลูโคซามีน (glucosamine) ในผนังเซลเป็นดัชนี ตามวิธีการของ Cochran และ Vercellotti (1978)

9.1 การสกัดกลูโคซามีนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 54 ชั่วโมง มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้ว 0.2 กรัม ไปย่อยเพื่อสกัดกลูโคซามีนด้วยกรดเกลือเข้มข้น จำนวน 5 มิลลิลิตร เมื่อบ่มในน้ำเดือดครบ 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงปั่นทิ้งตะกอนที่ 10,100x g นาน 15 นาที แล้วนำส่วนใส (supernatant) ไปปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 30% นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงปั่นทิ้งตะกอนอีกครั้งที่ 10,100x g นาน 15 นาที นำส่วนใสมาปรับให้ได้ปริมาตรครบ

10 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน

กำหนดให้ การเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารแข็งเป็น มิลลิกรัมของกลูโคซามีน ต่อ น้ำหนักแห้งอาหารแข็ง

9.2 <u>การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน</u> วิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนโดยวิธีการของ Morgan-Elson ที่ปรับปรุงแล้ว (Johnson, 1971) กระทำโดยดูดสารละลายกลูโคซามีน (25-200 ไมโครกรัม) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายของอะเซทิลอะซิโตน (ประกอบด้วยอะเซทิลอะซิโตนเข้มข้น 4% ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้น 1.25 โมลาร์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในน้ำเดือดนาน 20 นาที เมื่อทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว เติมเอชานอล 10 มิลลิลิตร และ เออร์ลิกรีเอเจนท์ (Erhlich's reagent, ประกอบด้วย พาราไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.67% ในสารละลายกรดเกลือเข้มข้นและเอชานอลอัตราส่วน 1:1) อีก 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 30 นาที ก่อนที่จะนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่มีความยาวช่วงคลื่น 530 นาโนเมตร ค่าที่วัดได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์

10. <u>การตรวจสอบความสามารถในการดูดซับแป้งดิบ</u>

ศึกษาอัตราการดูดซับแป้งดิบ โดยดัดแปลงวิธีการของ Hayashida (Hayashida, 1975) เตรียมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 6.5 หน่วย/มิลลิลิตร ในอะซิเตท - บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0-5.5 และ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าพีเอช 5.5-8.0 ผสมแป้งดิบ 1 กรัม กับสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 °ซ แล้วปั่นทิ้งตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ 10,100x g นาน 15 นาที นำส่วนใสไปหาแอคติวิตีกับแป้งดิบเปรียบเทียบกับแอคติวิตีของสารละลายเอนไซม์ก่อนการทดสอบ กำหนดให้อัตราการดูดซับกับแป้งดิบ เป็นไปตามสมการต่อไปนี้

$$\text{อัตราการดูดซับกับแป้งดิบ (\%)} = \frac{(\text{ข}) - (\text{ก})}{(\text{ข})} \times 100$$

เมื่อกำหนดให้ (ก) คือ แอคติวิตีกับแป้งดิบที่เหลืออยู่ภายหลังการทดสอบ

(ข) คือ แอคติวิตีกับแป้งดิบของสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมไว้ก่อนการทดสอบ

11. การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ

ได้ใช้วิธีการของ Andrews (Andrews, 1965) โดยกรองเอนไซม์ผ่านคอลัมน์ (column) ที่บรรจุด้วยเซฟาเดกซ์ จี-150 เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งมีวิธีการทดลองดังต่อไปนี้ คือ บรรจุเซฟาเดกซ์ จี-150 ซึ่งได้ปล่อยให้เม็ดเจล (gel - bead) พองตัวเต็มที่ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 4.5 ลงในคอลัมน์แก้วขนาด 2.4x70 ซม. ผ่านอะซิเตทบัฟเฟอร์ดังกล่าวหลายๆ ครั้งจนเจลในคอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุล ที่อัตราการไหล 10 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ภายใต้ความดันน้ำ 25 ซม. ผ่านสารละลายเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว และ ชะเอนไซม์ออกด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ เก็บสารละลายโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาใส่หลอดทดลอง หลอดละ 3 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เจลอยู่ในสมดุล ด้วยเครื่องเก็บลำดับส่วน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟเพื่อหาปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะเอนไซม์ สำหรับปริมาตรช่องว่างระหว่างเม็ดเจล (void volume) หาได้จากการผ่านบลูเดกซ์แตรน 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ และ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า K_{av} (partition coefficient) ตามสมการต่อไปนี้

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

เมื่อ V_e คือ ปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะเอนไซม์ หรือ โปรตีนมาตรฐาน

V_o คือ ปริมาตรช่องว่างระหว่างเม็ดเจล

V_t คือ ปริมาตรภายในคอลัมน์ทั้งหมด

นำค่า K_{av} นี้ไปเปรียบเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐานเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล สำหรับวิธีสร้างกราฟของโปรตีนมาตรฐานนั้น กระทำด้วยการผ่านโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ ไซโตโครม ซี ไคโมทริปซิโนเจน และ เซรัมอัลบูมิน อย่างละ 20 มิลลิกรัม ลงในคอลัมน์ตามวิธีข้างต้น แล้วนำค่า K_{av} และ ค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนมาตรฐาน ไปวาดกราฟมาตรฐาน

12. การทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์บนเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

กระทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีการของ Reisfeld และคณะ (1962) โดยเตรียมแสตกกิงเจล และ เซฟาเรติงเจล ให้มีอะคริลาไมด์ 2.5 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ 7.5 % ตามลำดับ หยอดเจลลงในหลอดแก้วขนาด 0.5x7.0 ซม. เซพาเรติงเจลเตรียมได้จากการผสม 1 ส่วนของอะคริลาไมด์ 15% และ เมธิลีนบีสอะคริลาไมด์ 0.2% ซึ่งละลายในกรดอะซิติก 0.287 โมลาร์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.056 โมลาร์ และ เตตราเมธิลีนไดอะมีน 0.5 % ที่มีค่าพีเอช 4.3 กับอีก 1 ส่วนของสารละลายแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 0.28% หยอดเซพาเรติงเจลลงในหลอดแก้วสูง 6 ซม. เมื่อเจลแข็งแล้ว หยอดทับด้วยแสตกกิงเจลซึ่งมีอะคริลาไมด์ 2.5% เมธิลีนบีสอะคริลาไมด์ 0.625% และไรโบฟลาวิน 0.5 มิลลิกรัม ละลายอยู่ในสารละลายกรดอะซิติก 0.048 โมลาร์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.056 โมลาร์ และ เตตราเมธิลีนไดอะมีน 0.058% ที่พีเอช 6.8 ใช้แสงฟลูออเรสเซนต์ส่องให้เจลแข็งตัวเร็วขึ้น หยอดสารละลายโปรตีนขนาด 150-200 ไมโครกรัม ผสมกับ กลีเซอรอล รวมกัน 80 ไมโครลิตร แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ให้แต่ละแท่งเจลได้รับกระแสคงที่ขนาด 4 มิลลิแอมแปร์ ในบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย กรดอะซิติก เข้มข้น 0.134 โมลาร์ และ เบตา-อะลานีน 0.350 โมลาร์ ที่พีเอช 4.5 หยอดสีย้อมเมธิลกรีน (0.005%) 2-3 หยด เมื่อสีย้อมวิ่งจนสุดแท่งเจลจึงหยุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิส นำแท่งเจลออกจากหลอดแก้ว นำไปย้อมสีโปรตีนด้วยสีโคแมสซีบลู 1% ละลายในกรดอะซิติก 7% นาน 30 นาที แล้วล้างสีออกจากแท่งเจล และ เก็บรักษาไว้ในกรดอะซิติก 7%

13. <u>การตรวจสอบผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง ด้วยโครมาโตกราฟีกระดาษ</u>

กระทำโครมาโตกราฟกระดาษของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน โดยจุด (spot) สารละลายน้ำตาลบนกระดาษโครมาโตกราฟ ทำโครมาโตกราฟในถังที่อิ่มตัวด้วยด้วยบรรยากาศของตัวทำละลาย บิวทานอล ไพริดีน และ น้ำ ในอัตราส่วน 6:4:3 (โดยปริมาตร) ตามวิธีการของ Hough, L., 1954 และ ตรวจสอบน้ำตาลบนกระดาษด้วยการแช่ลงในสารละลายของเกลือเงินไนเตรทในด่าง (Mayer, F.C. and Larner, J., 1959)

สำหรับวิธีการตรวจสอบน้ำตาลบนกระดาษด้วยสารละลายเกลือเงินไนเตรทในด่างมีวิธีดำเนินงาน คือ จุ่มกระดาษลงในสารละลายเงินไนเตรทและอะซิโตน (ละลายเกลือเงินไนเตรท 2.5 กรัมในน้ำ 6 มิลลิลิตร ผสมกับ อะซิโตน 200 มิลลิลิตร) จนเปียกทั่วแล้ว นำออกมาผึ่งจนแห้ง จากนั้นนำไปจุ่มลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์-เมธานอล (โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10% 1 ส่วน ผสมกับ เมธานอล 5 ส่วน) จนมีจุดสีดำปรากฏขึ้น จึง

นำไปล้างน้ำประปา แล้วนำมาจุ่มลงในสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เพื่อขจัดคราบสีส่วนเกินออก ล้างน้ำประปา และ ผึ่งจนกระดาษแห้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย