บทที่ 2
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์

- เครื่องเขย่า (rotary shaker) รุ่น G-10 บริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc, USA.
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น G-27 , G-25R บริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc, USA.
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Novaspec II บริษัท Pharmacia, Sweden.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K บริษัท Kontron instruments, Thailand.
- ตู้ปลอดเชื้อ (lamina flow) รุ่น H1 ห้างหุ้นส่วนจำกัด แลบ เซอร์วิส, ประเทศไทย.
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 บริษัท Eutech Cyberscan, Singapore
- เครื่องชั่งน้ำหนักรุ่น A2005 บริษัท Sartorius, Germany
- อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Kottermann, Germany
- เครื่องโครมาโทกราฟี (Low Pressure Liquid chromatography) รุ่น Econo บริษัท Bio-Rad, USA.
- เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแผ่น (Slab gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-Protein II Dual บริษัท Bio-Rad, USA.

2.2 เคมีภัณฑ์

2.2.1 เคมีภัณฑ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- แบคโตเปปโตน (Bacto peptone) จากบริษัท Difco Labaratories, USA.
- สารสกัดมอลท์ (Malt extract) จากบริษัท Difco Labaratories, USA
- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) จากสถาบันวิจัยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- กลูโคส (glucose) จากบริษัท ประเสริฐชัย สมุทรปราการ, ประเทศไทย.

2.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

- ไคโตซาน (Chitosan) จากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (Asian Institute of Technology, AIT)
- โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) จากบริษัท Merck, Germany
- โปตัสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต ($KHSO_4$) จากบริษัท Fluka AG. Buchs, Switzerland
- แอมโมเนียมซัลฟาเมต ($H_6N_2O_3S$) จากบริษัท Fluka AG. Buchs, Switzerland
- 3-เมทิล-2-เบนโซไทอะโซลิโนน ไฮดราโซน ($C_8H_9N_3S.HCl$) จากบริษัท Sigma Chemical, USA.
- เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) จากบริษัท Carlo ERBA reagenti, Italy.

2.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวัดปริมาณโปรตีน (Lowry, 1951)

- โซเดียมคาร์บอเนต จากบริษัท Merck, Germany
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากบริษัท BDH Chemicals, England
- โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต จากบริษัท APS Ajax Finechem, Australia
- คอปเปอร์ซัลเฟต จากบริษัท Merck, Germany
- โฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ จากบริษัท Merck, Germany

2.2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับทำโครมาโทกราฟีและอิเล็กโทรโฟริซิส

- แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ จากบริษัท Merck, Germany
- ดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) จากบริษัท Sigma Chemical, USA.
- เซฟาเด็กซ์ จี-75 (Sephadex G-75) จากบริษัท Sigma Chemical, USA.
- อะคริลาไมด์ (Acrylamide) จากบริษัท Sigma Chemical, USA.
- บิส (N,N'- methylene-bis-acrylamide) จากบริษัท Sigma Chemical, USA.
- ทริส (Tris (hydroxymethyl) aminomethane) จากบริษัท Sigma Chemical, USA.
- TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine) จากบริษัท Sigma Chemical, USA.

- แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) จากบริษัท Sigma Chemical, USA.
- ไกลซีน (Glycine) จากบริษัท Sigma Chemical, USA.
- เมทานอล (methanol) จากบริษัท Sigma Chemical, USA.
- กลีเซอรอล (Glycerol) จากบริษัท Sigma Chemical, USA.
- กรดอะเซติก (Acetic acid) จากบริษัท Merck, Germany
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จากบริษัท Merck, Germany
- โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodesyl sulfate) จากบริษัท BDH Chemicals, England
- สีโครแมสซีบริลเลียน บลู จี-250 (Coomassie brillant blue G-250) จากบริษัท Fluka AG. Buchs, Switzerland
- 2-เมอร์แคปโตเอธานอล (2-mercaptoethanol) จากบริษัท Sigma Chemical, USA.

2.3 วิธีการทดลอง

1. การแยก และคัดเลือกยีสต์

1.1 การแยกยีสต์

แยกยีสต์จาก ตัวอย่างผลไม้ที่มีรอยช้ำชนิดต่างๆ ได้แก่ ชมพู่ , องุ่น, มังคุด , ฝรั่ง , เงาะ , ลำไย และดินจากแหล่งต่างๆ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะบริเวณที่ขึ้นของรอยช้ำผลไม้โดยตรง แล้วนำไปขีดบนอาหารแข็งวายเอ็ม (YM agar ภาคผนวก ก) อีกวิธีคือ นำเนื้อผลไม้ หรือ ดิน ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ แช่ไว้ประมาณ 10 นาที แล้วนำน้ำไปขีด (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งวายเอ็ม เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว แยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บแต่ละโคโลนีที่แยกออกมา เก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียงวายเอ็ม เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การคัดเลือกยีสต์

คัดเลือกยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 1.1 มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส โดยมีการตรวจสอบ 2 วิธี คือ การทดสอบแบบรวดเร็ว (Rapid test) และ โดยวิธีการตรวจสอบโดยวัดปฏิกิริยาเคมีของสีที่เกิดขึ้น แล้วเทียบสี (Colorimetric method)

1.2.1 การทดสอบแบบรวดเร็ว (Rapid test) ตามวิธีของ Prakasam และ Azariah (1975) มีลำดับขั้นตอนดังนี้

นำยีสต์ที่เจริญบนอาหารวุ้นเอียงวายเอ็ม อายุ 1 - 2 วัน ที่แยกได้จากข้อ 1.1 ผสมกับสารละลาย Lugol's iodine ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ ไอโอดีน : โปตัสเซียมไอโอไดด์ : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 2 : 300 w : w : v นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 1 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที อ่านผลจากสีของปฏิกิริยา โดยผลบวกจะให้สีม่วงแดงถึงน้ำตาลเข้ม และถ้าไม่เกิดปฏิกิริยาจะให้สีเหลือง

1.2.2 การตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการเทียบสี (Colorimetric method) ตามวิธี ของ Ride และ Drysdale (1972)

โดยใช้ไคโตซานจากเปลือกกุ้ง ที่มีระดับการกำจัดหมู่อะเซทิลเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์เป็นสับสเตรท โดยนำสับสเตรท 0.75 มิลลิลิตร บ่มกับสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เขย่าทุก ๆ 15 นาที จากนั้นเติม 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของสารละลายโซเดียมไนไตรท์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของสารละลายโปตัสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต อย่างละ 0.75 มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเขย่าติดต่อกันนาน 15 นาที ด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที แล้วเติม 0.75 มิลลิลิตรของ 12.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของสารละลายแอมโมเนียมซัลฟาเมต และเติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของสารละลาย 3-เมทิล-2-เบนโซไทอะโซลิโนน ไฮดราโซน 0.75 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 0.75 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร และเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การอะเซทิเลชั่น จากกราฟมาตรฐานของสารละลายไคโตซาน (ภาคผนวก ค) และนำไปคำนวณยูนิตของเอนไซม์ ดังแสดงในภาคผนวก ง

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ในการทดลองนี้ คือ ปริมาณของเอนไซม์ ที่ทำให้เกิดกรดอะซิติก 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที โดยมีไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะเซทิลเท่ากับ 80 เป็นสับสเตรท ภายใต้ภาวะที่ทดสอบแอคติวิตี ดังกล่าวข้างต้น

1.2.3 แหล่งของเอนไซม์และระยะเวลาในการผลิตไคตินดีอะเซทิ-ทิเลสของยีสต์

นำยีสต์ที่ผ่านการทดสอบ ที่ให้ผลบวกจากข้อ 1.2.1 และ 1.2.2 มาศึกษาแหล่งที่ผลิตของไคตินดีอะเซทิลเลส และหาระยะเวลาในการผลิตที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลววายพีจี (YPG liquid medium ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 2 องศา-เซลเซียส) เป็นเวลา 14 , 24 , 48 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแยกเซลล์ยีสต์ออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนน้ำใส ซึ่งเป็นแหล่งเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) จากนั้นนำเซลล์ที่แยกได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำมาบดด้วยโกร่งแช่เย็นที่มีผงอะลูมินา 1 กรัม ใน 1 มิลลิลิตร ของ 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 บนอ่างน้ำแข็ง บดนานประมาณ 10 นาที จากนั้นนำไปแยกกากเซลล์และผงอะลูมินา ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จะได้ส่วนน้ำใส ซึ่งเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) นำส่วนน้ำใสซึ่งเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ และเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ที่แยกได้ นำมาวิเคราะห์หาแอคติวิตี โดยปฏิกิริยาเคมีและเปรียบเทียบสีของ Ride และ Drysdale (1972)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. **การจำแนกยีสต์ทางอนุกรมวิธาน** (Taxonomy)

จากวิธีการคัดเลือกยีสต์ตามข้อ 1.2 ได้เลือกยีสต์ 2 สายพันธุ์ที่ให้ไคตินดีอะเซทิเลสแอคติวิตีสูง คือ ยีสต์สายพันธุ์ MS_1 และ MS_8 นำยีสต์ทั้งสองมาจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน โดยการศึกษาลักษณะเฉพาะตัวทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) และสรีรวิทยา (Physiological characteristics) ตามหลักการของ Lodder (1970) และ Beneke (1970)

2.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา

2.1.1 เลี้ยงยีสต์ MS_1 และ MS_8 1 ลูปในอาหารเหลววาย-เอ็ม (ภาคผนวก ก) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญเติบโตเห็นเป็นฝ้าที่ผิวอาหาร (pellicle) แล้วนำยีสต์มาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะรูปร่างเซลล์ , ลักษณะการแตกหน่อ และ วัดขนาดเซลล์ แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.1.2 ทดสอบการขยายพันธุ์แบบใช้เพศ (sexual reproduction) โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารวุ้นเอียง โปตัสเซียมอะซิเตท และ โกรอดคาวา (Lodder,1970) (ภาคผนวก ก ข้อ 3.1 และ 3.2) บ่มเป็นเวลา 7 – 14 วัน นำมาตรวจการสร้างแอสคัส และแอสโคสปอร์ของยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2 การทดสอบทางสรีรวิทยา

เตรียมยีสต์ตั้งต้นทั้งสองสายพันธุ์ โดยแตะยีสต์ MS_1 และ MS_8 แต่ละสายพันธุ์จากอาหารวุ้นเอียงวายเอ็ม อายุ 24 ชั่วโมง ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร ให้มีจำนวนเซลล์ยีสต์ประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์ (Haemacytometer) เพื่อนำยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ไปทดสอบในอาหารต่างๆ ตามวิธีของ Lodder และ Beneke (1970) โดยจะเติม 0.05 มิลลิลิตรของยีสต์ตั้งต้นนี้ ลงอาหารเหลวที่จะทดสอบทุกชนิด

2.2.1 ทดสอบการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส , กาแลคโตส , ซูโครส , มอลโตส , แลคโตส , เทฮาโลส และ ราฟฟิโนส โดยเติม 0.05 มิลลิลิตรยีสต์ตั้งต้น ลงในอาหารน้ำตาลที่เตรียมไว้ทดสอบ (Lodder , 1970) (Fermentation medium ภาคผนวก ก ข้อ 3.3) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจดูการเกิดแก๊สในหลอดดูแรห์ม ในวันที่ 1 , 2 , 7 , 14 และ 21 ของการเลี้ยงเชื้อ

2.2.2 ตรวจดูความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เพื่อการเจริญเติบโตในสภาพที่มีอากาศ โดยเติมยีสต์ตั้งต้น 0.05 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เหมือนข้อ 2.2.1 (Lodder , 1970) (Carbon

assimilation medium ภาคผนวก ก ข้อ 3.4) นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจผลการเจริญของยีสต์ในวันที่ 1 , 2 , 7 , 14 และ 21 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยสังเกตจากการขุ่นที่เพิ่มขึ้น

2.2.3 ทดสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน โดยเติม 0.05 มิลลิลิตร ของยีสต์ตั้งต้นลงในอาหารทดสอบ (Lodder , 1970) (Nitrogen assimilation medium ภาคผนวก ก ข้อ 3.5) นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจผลการเจริญของยีสต์ในวันที่ 1 , 2 , 7 , 14 และ 21 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยสังเกตจากการขุ่นของจำนวนเซลล์ยีสต์ที่เพิ่มขึ้น

3. การปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงยีสต์

ในการทดลองได้ปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรวายพีจีของ Bartinicki Garcia และ Nickerson (1962) ซึ่งประกอบด้วย 2.0 เปอร์เซ็นต์กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน , 1.0 เปอร์เซ็นต์แบคโตเปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งวิตามินรวม ความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับ 4.5

3.1 แหล่งคาร์บอน

ศึกษาแหล่งคาร์บอน หรือแหล่งน้ำตาลที่เหมาะสม โดยเลี้ยงยีสต์ที่ได้คัดเลือกจากการทดลองข้างต้น 2 สายพันธุ์ คือ MS_1 และ MS_8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลววายพีจีที่มี 1.0 เปอร์เซ็นต์แบคโตเปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน และ 0.3 เปอร์เซ็นต์สารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งวิตามินรวม ความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับ 4.5 โดยแปรปริมาณแหล่งคาร์บอนอยู่ในช่วง 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$2 องศา-เซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงไปแยกเซลล์ออก โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใสที่แยกได้มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ ได้แก่ กลูโคส สำหรับยีสต์ MS_1 และ กลูโคส กับราฟฟิโนส สำหรับยีสต์ MS_8 เนื่องจากในการตรวจสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญของยีสต์ จากการทดลองที่ 2.2.2 พบว่า MS_1 ใช้แหล่งคาร์บอนได้เพียงชนิดเดียว คือ กลูโคสเท่านั้น ส่วน MS_8 ใช้น้ำตาล 2 ชนิดในการเจริญได้ดี คือ กลูโคส และราฟฟิโนส

3.2 ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

3.2.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงยีสต์ MS_1 และ MS_8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลววายพีจีที่มี 1 เปอร์เซ็นต์กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจากข้อ 3.1 วัดค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 แล้วแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยมีแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน 5 ชนิด คือ แอมโมเนียมไนเตรท, แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียมซิเตรท ส่วนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน 2 ชนิด คือ แบคโตเปปโตนและพอลิเปป-โตน ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแต่ละชนิด 1 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว เลี้ยงยีสต์ในภาวะเดียวกับข้อ 3.1 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่แยกเซลล์ออกแล้ว

3.2.2 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

เลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ที่ผลิตไคตินดีอะเซ-ทิเลสได้สูงสุด จากการทดลอง 3.2.1 แล้วแปรปริมาณแหล่งไนโตรเจนชนิดนั้นในช่วง 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงที่แยกเซลล์ออกแล้ว

3.3 แหล่งวิตามินรวม

เลี้ยงยีสต์ MS_1 และ MS_8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแหล่งคาร์บอน ตามข้อ 3.1 และแหล่งไนโตรเจนตามข้อ 3.2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 โดยแปรปริมาณแหล่งวิตามินรวมคือ สารสกัดจากยีสต์ ในช่วง 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว เลี้ยงยีสต์ในภาวะเดียวกับข้อ 3.1 แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงที่แยกเซลล์ออกแล้ว

3.4 ชนิดและปริมาณของเกลือแร่

เลี้ยงยีสต์ MS_1 และ MS_8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแหล่งคาร์บอน ตามข้อ 3.1 แหล่งไนโตรเจน ตามข้อ 3.2 และแหล่งวิตามินรวม ตามข้อ 3.3 เติมเกลือแร่ คือ $FeSO_4$ ความเข้มข้น 0.001 และ 0.005 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว , $MgSO_4$ ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว K_2HPO_4 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว และ KCl ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว (ชัญญา, พ.ศ. 2533) เปรียบเทียบกับเมื่อไม่เติมแหล่งเกลือแร่ เลี้ยงยีสต์ในภาวะเดียวกับข้อ 3.1 และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์จากน้ำเลี้ยง ที่แยกเซลล์ออกแล้ว

จากการแปรปริมาณแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน แหล่งวิตามินรวม และเกลือแร่ ได้สูตรอาหารเลี้ยงยีสต์ ที่ปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารสำหรับ MS_1 และ MS_8 ที่เหมาะสมสำหรับผลิตไคตินดีอะเซทิเลส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4. ภาวะการเลี้ยงยีสต์ที่เหมาะสม

4.1 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น

เลี้ยงยีสต์ MS_1 และ MS_8 ในอาหารที่ปรับปรุงสูตรแล้วจากข้อ 3 โดยมี 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน , 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แบคโต-เปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งวิตามินรวม โดยมี 0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl เป็นแหล่งเกลือแร่สำหรับ MS_8 แล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 4.5 , 5.0 , 5.5 , 6.0 , 6.5 , 7.0 และ 7.5 เลี้ยงในภาวะเดียวกับข้อ 3.1 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงที่แยกเซลล์ออกแล้ว

4.2 อุณหภูมิ

นำยีสต์ MS_1 และ MS_8 มาเลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุงที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 4.5 สำหรับ MS_8 และ 6.0 สำหรับ MS_1 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 , 30 , อุณหภูมิห้อง (30 ±2 องศาเซลเซียส) , 35 และ 40 องศาเซลเซียส แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์จากน้ำเลี้ยง ที่แยกเซลล์ออกแล้ว

4.3 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า

เลี้ยงยีสต์ MS_1 และ MS_8 ในอาหารเลี้ยงยีสต์สูตรปรับปรุงที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 50 , 100 , 150 และ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดแอคติวิตีของเอนไซม์จากน้ำเลี้ยง ที่แยกเซลล์ออกแล้ว

5. **แยกไคตินดีอะเซทิเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน**

เลี้ยงยีสต์ MS_8 ในอาหารที่ปรับปรุงสูตรและภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ จากนั้นปั่นแยกเอาเซลล์ออก นำส่วนน้ำใสมาผ่านขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

5.1 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว

นำส่วนน้ำใสที่ปั่นแยกได้มาวัดปริมาตรทั้งหมด จากนั้นคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องใช้ โดยใช้ความเข้มข้น เริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด จากนั้นนำผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่คำนวณได้ ค่อยๆ โรยลงในส่วนน้ำใสที่มีเอนไซม์ละลายอยู่ อย่างช้าๆ พร้อมทั้งคนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกตะกอนทิ้ง จากนั้นนำส่วนใสมาตกตะกอนต่อด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด กวนจนอิ่มตัว ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วนำส่วนตะกอนที่ได้มาละลายด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ในปริมาตรที่น้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนได้หมด นำสารละลายโปรตีนที่ได้จากการละลายตะกอนทั้งหมดบรรจุลงในถุงเซลโลเฟน แล้วนำไปไดอะไลส์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดแอมโมเนียม-ซัลเฟต จากนั้นทำให้สารละลายโปรตีนเข้มข้นขึ้นโดยนำถุงเซลโลเฟน ที่ผ่านการไดอะไลส์แล้วใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ที่มีกลีเซอรอล ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 กวนที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายโปรตีนออกจากถุง วัดปริมาตร, ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (ภาคผนวก จ) และแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยปฏิกิริยาเคมีแล้วเทียบสีของ Ride และ Drysdale (1972) เก็บสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ดังกล่าว เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

5.2 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน (Ion exchange chromatography)

แยกไคตินดีอะเซทิเลสออกจากโปรตีนชนิดอื่น โดยอาศัยหลักการ การแลกเปลี่ยนประจุ ทำโดยผ่านสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตออกแล้ว ลงในคอลัมน์ ที่มี DEAE-cellulose เป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบ การบรรจุตัวกลาง DEAE-cellulose ลงคอลัมน์ขนาด 1.5 x 30 เซนติเมตร ทำโดยค่อย ๆ เทสารละลาย DEAE-cellulose ลงในคอลัมน์

ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ รอให้เนื้อเจล DEAE - cellulose เรียงตัวกันแน่น และมีความสูงเจลเท่ากับ 25.5 เซนติเมตร จากนั้นจึงผ่านอะซิเตทบัฟเฟอร์ข้ามคืนเพื่อให้เข้าสู่สมดุล (equilibrate) ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ ใส่สารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 5.1 ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ด้วยพาสเจอร์ปิเปต แล้วชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยอิออนของเม็ดเจลออก ด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 เก็บสารละลายด้วยเครื่องเก็บลำดับส่วน หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร เพื่อติดตามโปรตีนที่ถูกชะออกมา จนกระทั่งหลอดสุดท้ายมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ จึงทำการชะโปรตีนส่วนที่ถูกจับด้วยประจุอยู่กับเจลออก ด้วย 0 - 1.0 โมลาร์ สารละลายโซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร นำสารละลายแต่ละหลอดมา วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เมื่อได้จำนวนหลอดที่ให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลสแล้ว จากนั้นจึงรวมสารละลายโปรตีนในหลอดที่มีแอคติวิตีสูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตรทั้งหมด พร้อมทั้งหาแอคติวิตีทั้งหมดด้วยวิธีของ Ride และ Drysdale (1972) แล้วหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์มาทำให้เข้มข้น โดยบรรจุในถุงเซลโลเฟน ใส่ลงในบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอลผสมอยู่ ตามข้อ 5.1 เก็บสารละลายไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในทดลองต่อไป

5.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี –75

วิธีการนี้อาศัยหลักการแยกโปรตีนจากความแตกต่างของขนาด โดยใช้เซฟาเด็กซ์ จี-75 (sephadex G-75) เป็นตัวกลาง ค่อยๆ เทสารละลาย เซฟาเด็กซ์ จี-75 ลงในคอลัมน์ขนาด 1 x 50 เซนติเมตร ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ รอจนเจลเรียงตัวกันแน่น และได้เนื้อเจลสูง 48 เซนติเมตร จากนั้นจึงผ่านอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ข้ามคืนจนเข้าสู่สมดุล ที่อัตราการไหล 9 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นค่อย ๆ ใส่สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองข้อ 5.2 ลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ แล้วเก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บลำดับส่วน นำแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ จากนั้นรวมหลอดที่มีแอคติวิตีสูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตรทั้งหมด พร้อมทั้งแอคติวิตีด้วยวิธีของ Ride และ Drysdale (1972) และปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

5.4 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยพอลิอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟริซิสชนิดแผ่น (Davis, 1964)

เป็นวิธีที่แยกแถบโปรตีนของเอนไซม์ โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่มีประจุในสนามไฟฟ้า รวมทั้งการแยกขนาดโมเลกุลที่ต่างกัน โดยมีวิธีการดังนี้

ประกบแผ่นแก้วขนาด 7.3 x 10.3 เซนติเมตร และ 8.3 x 10.3 เซนติเมตร เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร ที่ขอบด้านข้างของกระจกทั้งสองแผ่น ประกอบเข้ากับชุดหล่อเจล จากนั้นเทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ที่มีความเข้มข้นของเจลเท่ากับ 12 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข ข้อ 3) ลงในแผ่นกระจก ให้เจลมีความสูง 5.0 เซนติเมตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้เต็มช่องว่างของกระจกที่เหลืออยู่ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเซพาเรติงเจลแข็งตัว แล้วจึงซับน้ำออก แล้วเทสารผสมสแตกกิงเจล (stacking gel) (ภาคผนวก ข ข้อ 3) ให้เต็มช่องว่างบนเซพาเรติงเจล และใส่แผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว จากนั้นดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 3)

นำแผ่นเจลที่เตรียมได้นี้ ไปประกอบกับชุดอิเล็กโตรโฟริซิส เติมอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์จนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์ละลายในบัฟเฟอร์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 3) หยอดตัวอย่างโปรตีนที่เตรียมได้ 20 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า 200 โวล์ต สังเกตุจนกระทั่งสีตามรอยเคลื่อนที่ไปจนเกือบถึงปลายด้านล่างของแผ่นเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า ถ่ายเจลทั้ง 2 แผ่นออก โดยนำ 1 แผ่นมาย้อมโปรตีนด้วยสีย้อม (ภาคผนวก ข ข้อ 3) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อม (ภาคผนวก ข ข้อ 4) ล้างเจลจนกระทั่งเจลใส และจะเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่ นำแผ่นเจลอีกแผ่นที่ไม่ได้ผ่านการย้อมสี มาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยเทียบระยะ Rf ให้เท่ากับเจลที่ผ่านการย้อมสี โดยตัดแผ่นเจลบริเวณที่มีโปรตีนเป็นชิ้น ๆ ใส่ลงใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 เขย่าช้าๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เพื่อตรวจสอบว่าแถบโปรตีนที่ติดสีย้อม ให้แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส

6. การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

6.1 หาน้ำหนักโมเลกุลของไคตินดีอะเซทิเลส ด้วยวิธี เจลฟิลเตรชัน โดยผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (66,000 ดาลตัน) , โอวัลบูมิน (45,000 ดาลตัน) และ ไลโซไซม์ (14,300 ดาลตัน) ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี – 75 ในภาวะเดียวกันกับที่ทำไคตินดีอะเซทิเลสให้บริสุทธิ์ นำแต่ละลำดับส่วนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์ แล้วนำเอนไซม์ที่สกัดได้ผ่านคอลัมน์เดียวกัน และเปรียบเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐาน

6.2 หาน้ำหนักโมเลกุลของไคตินดีอะเซทิเลสโดยวิธี โซเดียม โดเดซิล พอลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิสชนิดแผ่น ตามวิธีของ Laemmli (1970)

ประกบแผ่นแก้ว เข้ากับชุดหล่อเจล เช่นเดียวกับข้อ 5.4 แล้วเทสารผสมของเซพาเรติงเจล ที่มีความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข ข้อ 4) ลงในช่องว่างให้ได้เจลสูง 5.0 เซนติเมตร เติมน้ำลงบนผิวเจลให้เต็มช่องว่างที่เหลือ ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว เทน้ำออก จากนั้นเทสารผสมของสแตกกิงเจล (ภาคผนวก ข ข้อ 4) แล้วใส่แผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง เมื่อเจลแข็งตัวดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 4) 2 - 3 ครั้ง แล้วเติมอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์จนเต็ม จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้จากข้อ 5.3 และโปรตีนมาตรฐาน ละลายในบัฟเฟอร์ ที่มีส่วนประกอบดังภาคผนวก ข ข้อ 4 แล้วนำโปรตีนที่จะวิเคราะห์ที่ละลายบัฟเฟอร์นี้ มาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปหยอดลงในช่องแต่ละช่องปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากนั้นจึงผ่านกระแสไฟฟ้า 200 โวล์ต จนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลู เคลื่อนที่จนถึงปลายสุดของแผ่นเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจากแผ่นแก้วนำไปย้อมสี (ภาคผนวก ข ข้อ 4) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี (ภาคผนวก ข ข้อ 4) จนเห็นแถบโปรตีน เปรียบเทียบตำแหน่งแถบโปรตีนของเอนไซม์กับโปรตีนมาตรฐาน แล้วบันทึกภาพ

7. ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว

7.1 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นพอเหมาะ ทำปฏิกิริยากับสารละลายไคโตซาน ที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิเลชั่น 80 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่มีช่วงความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 และ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้ได้แก่ 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 - 6.5 , 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 - 8.0 และ 0.05 โมลาร์ บอเรตบัฟเฟอร์ pH 8.0 - 10.0

7.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ความเข้มข้นพอเหมาะ ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30 , 40 , 50 , 60 และ 70 องศาเซลเซียส กับสารละลายไคโตซาน ที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิเลชั่น 80 เปอร์เซ็นต์ แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์

7.3 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

นำสารละลายเอนไซม์ บ่มด้วย 0.05 โมลาร์ของบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ตั้งแต่ 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 และ 10 เป็นเวลา 60 นาที ทำให้เจือจาง 5 เท่าด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0 แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายไคโตซาน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เปรียบเทียบกับเอนไซม์เริ่มต้นก่อนนำไปบ่ม โดยใช้บัฟเฟอร์เช่นเดียวกับข้อ 7.1

7.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

นำสารละลายเอนไซม์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30, 40 , 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเอนไซม์แต่ละหลอดในแต่ละอุณหภูมิมาวัดแอคติวิตีที่เหลือ โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายไคโตซาน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ตามวิธีของ Ride และ Drysdale (1972) เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม ซึ่งเป็นหลอดที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ