บทที่ 3

การทดลอง

ตัวอย่างในการทดลอง

1. กุ้งกุลาดำวัตถุดิบหน้าโรงงานจาก 3 แหล่งคือ

- กุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากจังหวัดนครศรีธรรมราช โดยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเอเชี่ยนซีฟูดส์ (มหาชน) จำกัด
- กุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเอเชี่ยนซีฟูดส์ (มหาชน) จำกัด
- กุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากจังหวัดระยอง โดยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทแกลงจำกัด

2. เอนไซม์คะตะเลสที่สกัดจากเชื้อ Micrococcus lysosideikticus มีชื่อทางการค้าว่า Microcatalase ® มีแอคติวิตีเท่ากับ 240,000 International Units (IU/ml) ผลิตโดยบริษัท Solvay Enzymes โดยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทซินนามอนจำกัด

3. เชื้อแบคทีเรียชนิด Pseudomonas fluorescens K. Komata TISTR 358 จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ภาคพื้นเอเชียอาคเนย์ (Bangkok MIRCEN) สถาบันวิจัยแห่งชาติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบ pH profile catalase activity

- Sodium acetate trihydrate (A.R.)
- Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (A.R.)
- Sodium tetraborate decahydrate (A.R.)
- Di-sodium hydrogen phosphate dodecahydrate (A.R.)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (A.R.)
- Hydrogenperoxide (A.R.)
- Acetic acid (A.R.)
- Hydrochloric acid (A.R.)

2. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

- Crystal violet (A.R.)
- Safranin O (A.R.)
- Acetone (A.R.)
- Iodine (A.R.)
- Absolute ethanol (A.R.)
- Sodium chloride (A.R.)
- Tetramethyl-p-phenyllenediamine dihydrochloride (A.R.)
- Bacitracine (A.R.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Nutrient broth
- Nutrient agar
- Blood agar

อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบ pH profile catalase activity

- pH meter (Hanna,8417)
- เครื่องปั่นที่มีโถปั่นเป็นโลหะ (Waring, 32BL79)
- เครื่องชั่งหยาบ (Sartorius,B3100S)

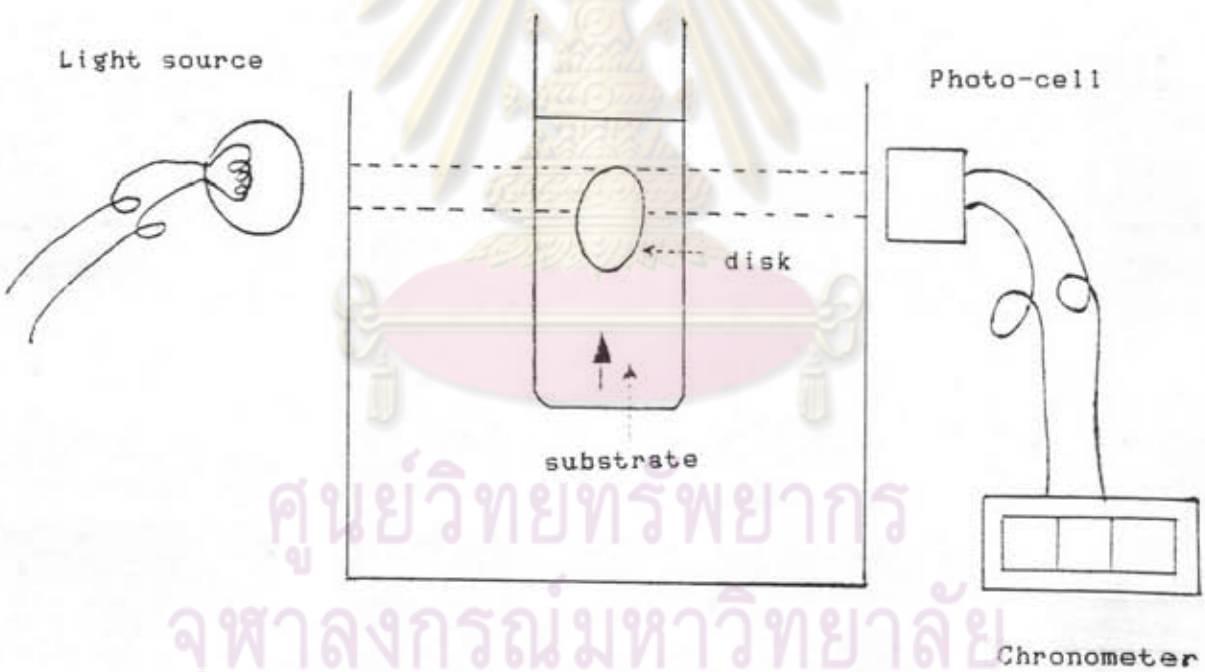
อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบด้านจุลชีววิทยา

- หม้อนึ่งความดัน (Tomy, SS-320)
- ตู้อบลมร้อน (BTL, CT161)
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Darkfield Quebac ®, 14G108)
- เครื่องไมโครเวฟ (Litton, H15610-A)
- ตู้บ่มเชื้อ (Quilenhamo, IH-100)
- ตู้เขี่ยเชื้อที่มีหลอดอุลตราไวโอเลต
- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, 471148)
- Spectrophotometer (Milton Roy, 601)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์และลักษณะของเครื่องมือสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส

Catalasemeter เป็นเครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้นเพื่อใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสดัดแปลงจากหลักการของ Gagnon และคณะ (1959) เป็นการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสโดยการวัดปริมาณก๊าซออกซิเจนที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา โดยใช้แผ่น disk ในการดักก๊าซออกซิเจนทำให้เกิดแรงพยุงดันให้แผ่น disk ซึ่งจมอยู่ก้นหลอดลอยกลับขึ้นสู่ด้านบนและตัดสัญญาณแสงซึ่ง Photo-cell จะส่งสัญญาณให้ Chronometer ทำหน้าที่บันทึกเวลา ส่วนประกอบของเครื่องมือแสดงในรูปที่ 2



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 รูปแบบของ Catalasemeter (Gagnon et al, 1959)

Catalasemeter ที่ประดิษฐ์ขึ้นประกอบด้วยอุปกรณ์ 3 ส่วนคือ

1. Start-Stop Timer Circuit

2. หลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 16 มิลลิเมตร

3. แผ่น disk สำหรับใช้ในการดักก๊าซออกซิเจนแบ่งออกเป็น 2 ระบบคือ

1 Paper disk คือกระดาษกรอง Whatman No.2 เส้นผ่านศูนย์กลาง13 มิลลิเมตร

2 Filter membrane ชนิด Regenerated cellulose (RC 55) pore size เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ผลิตโดยบริษัท Schleicher & Schuell ประเทศเยอรมัน

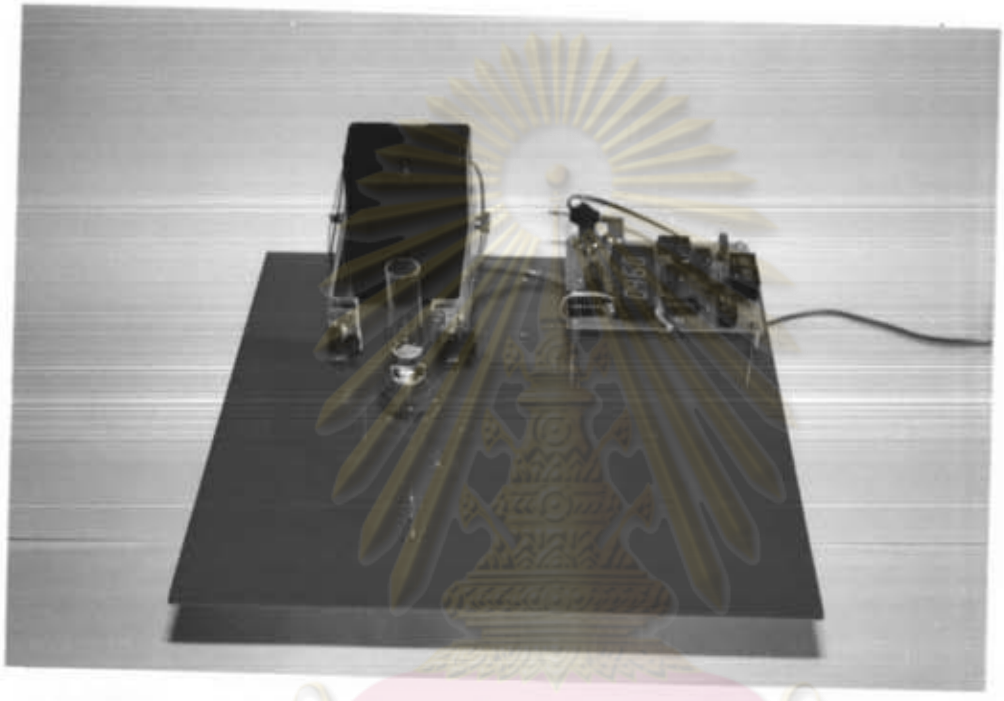
Start-Stop Timer Curcuit เป็นวงจรไฟฟ้าซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์ดังนี้

- ตัวต้านทานขนาด 1/4 $\pm$ 5 วัตต์ ชนิด 4.7 และ 3.3 โอมห์ 10,100 และ 1 กิโลโอมห์
- ตัวเก็บประจุ ค่า 0.33 ไมโครฟาเรด (334), 0.1 ไมโครฟาเรด (104)
- IC พร้อม socket เบอร์ LM 555, CD4017 และ CD4026
- Photo cell และ Accessory ซึ่งประกอบเป็นวงจรทางไฟฟ้า (แสดงในภาคผนวก ช.1)
- Relay DC 9 โวลต์
- Diode 1 N 4001
- Adaptor

นำอุปกรณ์ทั้งหมดประกอบเป็นวงจรไฟฟ้า (แสดงในภาคผนวก ช.2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์ข้อ 1, 2 และ 3 ประกอบเข้าเป็นชุดเครื่องมือ Catalasemeter ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงชุดเครื่องมือ Catalasemeter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Gas column method เป็นวิธีที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส โดย Fung(1985) ประกอบด้วยอุปกรณ์ดังนี้

1. Pasteur pipette ที่มีปลายยาวมากกว่า 3 นิ้ว และปิดปลายด้วยความร้อน

2. Vernier

3. Micropipetter ขนาด 10-50 ไมโครลิตร

รูปแบบของ Gas column method แสดงในรูปที่ 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 อุปกรณ์และการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสด้วย Gas column method (Fung, 1985)

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสด้วยเครื่องมือชนิดต่างๆ

Catalasemeter

เตรียมเครื่องมือในรูปที่ 3 โดยตั้งตัวเลขที่หน้าปัดให้เริ่มต้นที่ศูนย์ และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสโดยนำแผ่น disk ที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารละลายที่ต้องการทดสอบเอนไซม์คะตะเลสเป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นหย่อนแผ่น disk ลงในหลอดทดลองที่บรรจุสับเสตรทของเอนไซม์คะตะเลสจำนวน 5 มิลลิลิตร (วางหลอดทดลองดังแสดงในรูปที่ 3) อ่านเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการจมและลอยกลับขึ้นสู่ด้านบนของแผ่น disk โดยบันทึกในค่าของ Floatation Time (FT) ซึ่งค่า FT คือค่าที่แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส

Gas column method

ทดสอบเอนไซม์คะตะเลสโดยดูดสารละลายที่ต้องการด้วยไมโครไปเปต จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Pasteur pipette ตามด้วยสารละลายที่เป็นสับเสตรทของเอนไซม์คะตะเลสจำนวน 50 ไมโครลิตร ลงใน Pasteur pipette แล้วสะบัด Pasteur pipette ให้สารละลายทั้งสองไหลไปรวมกันที่ส่วนปลายหลอดทั้งหมด กลับด้านปลายยาวให้ตั้งขึ้น ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที วัดค่า Gas column และ Total column ด้วย Vernier ตามรูปที่ 4 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ คือ %Gas column (%G.C) โดยคำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ G.C} = (\text{Gas column}/\text{Total column}) \times 100$$

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่ pH ต่าง ๆ

นำสารละลายบัฟเฟอร์ ได้แก่ โซเดียมอะซิเตต-กรดอะซิติกบัฟเฟอร์ ที่ pH 5.0, 5.5 และ 6.0 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 6.0,6.5,7.0,7.5 และ 8.0 และบอเรตบัฟเฟอร์ ที่ pH 8.0,8.5 และ 9.0 (วิธีเตรียม ภาคผนวก ก 1.) ผสมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (วิธีเตรียม ภาคผนวก ก 2.) อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ได้เป็นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3 สำหรับใช้เป็นสับเสตรทของเอนไซม์คะตะเลส ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรีย (วิธีเตรียม ภาคผนวก ข.1) และเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้ง (วิธีเตรียม ภาคผนวก ข.2) ด้วย Catalasemeter ที่ทุก pH วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ

เลือก pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียสำหรับใช้ในการเตรียมสับเสตรทของเอนไซม์คะตะเลสในการทดลองขั้นต่อไป

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรีย

2.1 ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่อุณหภูมิต่างๆ

นำเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียและจากเนื้อเยื่อกุ้งที่เตรียมได้จากวิธีในภาคผนวก ข.1 และ ข.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงใน water bath ให้มีอุณภูมิภายในตัวอย่าง 60,62,64,66,68,70,72 และ 74 °C เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำให้เย็นทันที (Ang et.al, 1994) ส่วนตัวอย่างที่เป็น control เป็นตัวอย่างที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน นำทุกตัวอย่างมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสด้วย Catalasemeter

โดยการสังเกตปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นบนแผ่น disk จากมากไปน้อยอ่านผลเป็น +++,++, + ตามลำดับ และผล - คือไม่มีก๊าซออกซิเจนเกิดขึ้น

2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของการแยกแบคทีเรียออกจากตัวกุ้งโดยวิธี Rinse method

ศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งหมดในตัวกุ้งโดยเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนบนเปลือกและในเนื้อเยื่อกุ้งโดยวิธี Blend method (แสดงวิธีในภาคผนวก ข.4) และศึกษาปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกออกจากกุ้งทั้งเปลือกโดยวิธี Rinse method (แสดงวิธีในภาคผนวก ข.5) และตรวจสอบปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดที่เหลือในตัวกุ้งที่ผ่านการ rinse โดยวิธี Blend method

เปรียบเทียบการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียโดยนำกุ้งทั้งตัวมาแยกแบคทีเรียจากตัวกุ้งโดยวิธี Rinse method และ Blend method แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสโดย Catalasemeter

3. ศึกษาความไวของเครื่องมือต่อเอนไซม์คะตะเลส

3.1 การทดสอบความไวของเครื่องมือต่อเอนไซม์คะตะเลส

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (Microcatalase ®) ในช่วงความเข้มข้น 10^{-2} ถึง 10^{4} ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดย Catalasemeter ทั้ง 2 ระบบ และ Gas column method

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การทดสอบความไวของเครื่องมือต่อเอนไซม์คะตะเลสจากเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

นำ culture ของ Pseudomonas fluorescens ที่ระดับความเจือจางต่างๆ (วิธีเตรียม ภาคผนวก ข.3) มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสด้วย Catalasemeter ทั้ง 2 ระบบ และ Gas column method แต่ละตัวอย่างที่ทดสอบนั้นนำมาหาจำนวนเซลล์โดยทำ Total plate count (วิธีทำ ภาคผนวก ค)

จากข้อ 3.1 และ 3.2 วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธี Regression Analysis ทดลอง 4 ซ้ำ ซึ่งผลการวิเคราะห์จะใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินเพื่อเลือกเครื่องมือที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไปโดยมีหลักเกณฑ์ คือ เครื่องมือหรือวิธีนั้นสามารถให้ค่า Correlation coefficient มากกว่า 0.8 และสามารถตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียที่มีจำนวนเซลล์น้อยไปถึงจำนวนเซลล์มากในช่วงกว้าง

4. ศึกษาการประมาณจำนวนแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจาก 3 แหล่ง

นำกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจาก 3 แหล่ง คือ จังหวัดระยอง นครศรีธรรมราช และสุราษฎร์ธานี แยกจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่เปลือกกุ้งโดยวิธี Rinse method (แสดงวิธีในภาคผนวก ข.4) นำ suspension ของแบคทีเรียที่แยกได้มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสด้วยวิธีที่เลือกจากข้อ 3 และใน suspension เดียวกันนำมาทำ Total plate count เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสกับจำนวนเซลล์โดยตัวอย่างกุ้งวัตถุดิบจากแหล่งต่างกันทำการทดลองเช่นเดียวกันทั้งหมด

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธี Regression Analysis และเปรียบเทียบผลการทดลองของกุ้งจากทั้ง 3 แหล่งโดยวิธี Analysis of Covariance ใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 18201971

แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ

5. ศึกษาชนิดและปริมาณของ predominant bacteria ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบ

นำ suspension ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำวัตถุดิบในข้อ 4. ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร เจือจางให้เท่ากันแล้วนำมาเพาะเชื้อ spread plate บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างโคโลนีจากจานเพาะเชื้อ 50 โคโลนี (แสดงวิธีใน ภาคผนวก ง.1) ทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) โดยการ streak plate นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้เก็บในหลอดอาหารเอียง โดยอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อทุกขั้นตอนคือ Nutrient agar จัดกลุ่มของแบคทีเรียโดยการย้อมแกรม (ภาคผนวก ง.2) และทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (ภาคผนวก ง.3) โดยตัวอย่างกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากทั้ง 3 แหล่งทดลองเช่นเดียวกันทั้งหมด

6. ศึกษาผลของชนิดและปริมาณแบคทีเรียต่อความสามารถในการวัดแอคติวิตีของเครื่องมือ

6.1 ศึกษาระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 5 มาทดสอบระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยวิธี Capillary tube catalase test ตามวิธีของ Fung (1971) ซึ่งอ่านผลการทดลองโดยการสังเกตจากปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่เกิดขึ้นในหลอด capillary รายงานผลของระดับการสร้างก๊าซออกซิเจนของแบคทีเรียเป็น 0, +, ++, +++ (แสดงวิธีใน ภาคผนวก จ)

6.2 ศึกษาผลของสัดส่วนของแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสแตกต่างกันต่อการวัดแอคติวิตีของเครื่องมือที่ใช้ในข้อ 4

นำแบคทีเรียที่มีการสร้างคะตะเลสในระดับ +, ++ และ +++ มาเลี้ยงใน Nutrient broth ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำ culture ของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เตรียมได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร เพื่อเทียบหาจำนวนเซลล์จากกราฟมาตรฐาน (แสดงใน ภาคผนวก ฉ) และปรับให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำ culture ของแบคทีเรียแต่ละชนิดมาผสมกันในอัตราส่วนตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การผสม culture ของแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสต่างกัน ในอัตราส่วนต่างๆ

ระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลส	อัตราส่วนของแบคทีเรีย
+++ : ++	1:0, 2:1, 1:1, 1:2, 0:1
+++ : +	1:0, 2:1, 1:1, 1:2, 0:1
++ : +	1:0, 2:1, 1:1, 1:2, 0:1
+++ : ++ : +	1:1:1, 2:1:1, 2:2:1, 2:1:2, 1:2:2, 1:2:1, 1:1:2, 1:0:0, 0:1:0, 0:0:1

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสในแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่องมือที่ใช้ในข้อ 4 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 4 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย