บทที่ 4
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

4.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

4.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) รุ่น G-FS บริษัท Gasells Chaftfur Labortechnik, Germany.
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น 7820 KUBOTA CORPORATION, Japan.
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Instruments, USA
4. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar Flow) รุ่น VS-124 บริษัท ISSCO, USA.
5. หม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HL24ADY บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.
6. ถังหมัก ขนาด 3 ลิตร (Fermenter) รุ่น MINI-JAR-FERMENTER KMJ ของบริษัท Laborterchnik GMBH, Germany
7. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น BH-2 บริษัท OLYMPUS MICROSCOPE, Japan.
8. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Mettler Toledo , Switzerland
9. ปั๊มรีด (Peristatic pump) รุ่น EYELA Micro tube pump MP-3 ของบริษัท Tokyo rikakikai Co., LTD, Japan
10. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Hot air oven) รุ่น ULM 500 ของ บริษัท Memmert, Germeny.
11. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น HC-2/8 ของบริษัท JULABO LABORATECHNIK GMBH, Germany

4.1.2 สารเคมี

1. แป้งมันสำปะหลัง ตรา ซิ้น เฮง หลี หงอคง
2. corn steep liquor ของบริษัท SIGMA CHEMICAL, USA. [LB]
3. แคลเซียมคาร์บอเนต [$CaCO_3$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL Australia. [LB]
4. แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL Australia. [AL]
5. กรดซัลฟูริก [H_2SO_4] ของบริษัท Merck, Germany. [AL]
6. กรดไฮโดรคลอริค [HCl] ของบริษัท Merck, Germany. [AL]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] ของบริษัท Merck, Germany. [LB]
8. โซเดียมคาร์บอเนต [Na_2CO_3] ของบริษัท AJAX CHEMICAL Australia. [AL]
9. โปแตสเซียมไฮโดรเจนออโทฟอสเฟต [KH_2PO_4] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia. [AL]
10. ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [K_2HPO_4] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia. [AL]
11. ฟีนอล [Phenol] ของบริษัท Carloerba, Italy. [AL]
12. เอทานอล 99.8% [C_2H_6O] ของบริษัท Merck, Germany. [AL]
13. soluble starch ของบริษัท Merck, Germany. [AL]
14. Phenolphthalein [$(HCO_6\ H_4)_2CC_6H_4COO$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia. [LB]
15. สารลดการเกิดฟอง (antifoam silicone 10%) ของบริษัท U&V โฮลดิ้ง(ไทยแลนด์).[CM]
16. นิวเทรียนบรอท (Nutrient broth, NB) ของบริษัท LIFE TECHNOLOGIES, Scotland.[LB]
17. นิวเทรียนเอการ์ (Nutrient agar, NB) ของบริษัท LIFE TECHNOLOGIES, Scotland.[LB]
18. น้ำที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำกรองผ่านไส้กรองเรซิน และเยื่อแผ่นเซรามิก 0.2 ไมครอน

หมายเหตุ : ความบริสุทธิ์ของสารเคมี [AL] ระดับ Analytical grade [LB] ระดับ Lab grade และ [CM] ระดับ Commercial grade

4.2 เชื้อจุลินทรีย์

ในการทดลองใช้เชื้อ *Bacillus circulans* ATCC 9995 สั่งซื้อจาก สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.)

4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.3.1 อาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ใช้อาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียง (nutrient agar slant)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2 อาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

ใช้สูตรอาหารจากงานวิจัยของ อรุณี ตรีศิริโรจน์, 2537 ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง	10	กรัม
corn steep liquor (CSL)	50	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	5	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต [$CaCO_3$]	5	กรัม

4.3.3 อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ใช้สัดส่วนเดียวกับอาหารสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อแต่จะมีการเติมแป้งมันสำปะหลังตามความเหมาะสม

4.4 วิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

4.4.1 วิธีเก็บรักษาระยะยาว

จุลินทรีย์ซื้อมาในรูปผงจากการแช่เยือกแข็ง (lyophilization) แล้วนำมาถ่ายเชื้อลงในอาหารนิวเทรียนเอการ์ (nutrient agar, NA) ในจานเพาะเชื้อ จากโคโลนีเดี่ยวในจานเพาะเชื้อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียง ปริมาตร 5 มล. ในหลอดฝาเกลียวขนาด 15มล. ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำส่วนผสมของกลีเซอรัล (glycerol) 15% ในอาหารนิวเทรียนบรอท (nutrient broth, NB) 5 มล. ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปละลายเซลล์ออกจากอาหารแข็งและเก็บไว้ใน micro tube ที่อุณหภูมิ –10°C

4.4.2 วิธีเก็บรักษาระยะสั้น

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บในกลีเซอรัลลงในอาหารนิวเทรียนบรอท ปริมาตร 2.5 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มล. นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียง ปริมาตร 5 มล ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 15 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C วิธีนี้เก็บรักษาเชื้อได้นานประมาณ 1 เดือน

4.5 ขั้นตอนการทดลอง

4.5.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น

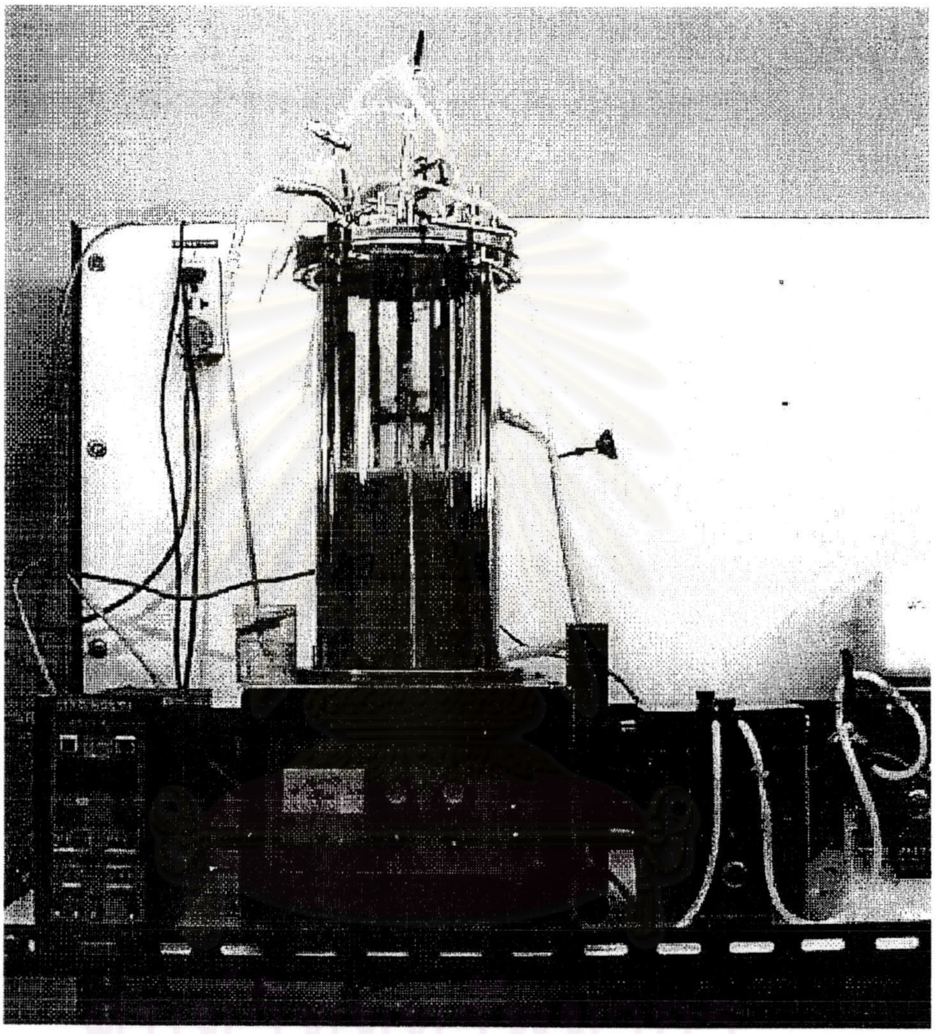
นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงบนอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียงในหัวข้อ 4.4.2 มาเขี่ยลงบนอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบเข็งเอียง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นล้างเซลล์ออกจากอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียงด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อในหัวข้อ 4.3.2 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 15 ชม.

4.5.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

ในงายวิจัยนี้ทำการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าเพื่อหาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธีเพาะเลี้ยงเหมือนในหัวข้อ 4.5.1 โดยนำไปบ่มในเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 ชม. ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มล. ทุก 3 ชม. นำไปหาปริมาณเซลล์และนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ปั่นแยกเซลล์ออก ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 30 นาที อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำส่วนที่ไม่ตกตะกอน (supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณแป้งและกิจกรรมของเอนไซม์

4.5.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 3 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง (ดังรูปที่ 4.1) โดยถ่ายเชื้อตั้งต้นจากข้อ 4.5.1 ปริมาณ 200 มล. ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลว 2,500 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33°C โดยเปลี่ยนแปลงภาวะในการเลี้ยงเชื้อ และ ปริมาณของแป้งมันสำปะหลังตามความเหมาะสม เป็นเวลา 30 ชม. สำหรับในการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชจะทำการควบคุมโดยใช้ กรดไฮโดรคลอริค ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ และทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มล.ทุก 2 ชม. นำไปหาปริมาณเซลล์และนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ปั่นแยกเซลล์ออก ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 30 นาที อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำส่วนที่ไม่ตกตะกอน (supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณแป้งและกิจกรรมของเอนไซม์



รูปที่ 4.1 ถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องปริมาตรการทำงาน 3 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 การวัดการเจริญของเชื้อ

4.6.1 การนับเซลล์ [Singleton และ Sainsbury, 1978]

ในงานวิจัยนี้ทำการวัดปริมาณเซลล์ด้วยวิธีนับเซลล์ ใน counting chamber โดยนับจำนวนเซลล์ในช่องเล็กทั้งหมด 400 ช่องภายใน counting chamber จากนั้นนำจำนวนเซลล์ที่นับได้หารด้วย 400 แล้วนำมาหารด้วยปริมาตรของช่องเล็กใน chamber โดยปริมาตรในหนึ่งช่องเล็กเท่ากับ พื้นที่ผิวช่องเล็ก คูณ ความลึก มีค่าเท่ากับ $\frac{1}{400}mm^2 \times \frac{1}{10}mm$ หรือ $\frac{1}{4,000,000}ml$ ถ้าตัวอย่างต้องมีการเจือจางก่อนทำการนับ จำนวนเซลล์ที่วัดได้จะต้องคูณด้วยอัตราที่การเจือจางนั้น ค่าที่แสดงในผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการนับเซลล์ในตัวอย่างเดียวกันซ้ำกัน 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย โดยมีค่าความผิดพลาดจากการวัด $\pm$ 9.11%

4.6.2 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ในการหาน้ำหนักเซลล์แห้งจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย soluble starch 1% , CSL (นำไปเหวี่ยงแยกนำมาใช้แต่ส่วนที่ไม่ตกตะกอน) 5% และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.5% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เนื่องจากสูตรอาหารที่ใช้ในงานวิจัยตามหัวข้อ 4.5.1 มีองค์ประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ $CaCO_3$ และ CSL ซึ่งจะตกตะกอนเมื่อนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรดังกล่าวเก็บตัวอย่างน้ำหมัก 20 มล. มาทำการปั่นแยกและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 30 นาที ถ่ายเซลล์ลงในถ้วยอะลูเนียมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำไปอบที่ 80°C จนเซลล์แห้งแล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง ทำซ้ำจนกระทั่งได้น้ำหนักเซลล์คงที่ ค่าที่แสดงในผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดผลในตัวอย่างเดียวกันซ้ำกัน 3 ครั้ง โดยมีค่าความผิดพลาดจากการวัด $\pm$ 1.72%

4.7 การหาปริมาณแป้งมันสำปะหลัง [Dubois และ คณะ ,1956]

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี ฟีนอล-ซัลฟูริก ซึ่งเป็นการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในสารตัวอย่าง แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลทั้งหมดกับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง โดยมีขั้นตอนการวัด คือ ปิเปตน้ำหมักปริมาตร 1 มล. ที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์ออกและทำการเจือจางสารตัวอย่าง 1:100 เท่า แล้ว ลงในหลอดทดลอง ขนาด 15 มล. เติมสารละลายฟีนอล 5 %น้ำหนักโดยปริมาตร ลงไป 1 มล. จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (98%) 5 มล.ตามลงไปทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุม

อุณหภูมิ ประมาณ 25-30°C เป็นเวลา 20 ถึง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร แล้วนำไปเทียบหาปริมาณแป้งจากกราฟมาตรฐาน ค่าที่แสดงในผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดผลในตัวอย่างเดียวกันซ้ำกัน 2 ครั้ง โดยมีค่าความผิดพลาดจากการวัด ±3.21%

4.8 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ [Goel และ Nene, 1995]

วัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้วิธี phenolphthalein โดยปิเปตสารละลายเอนไซม์ (น้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออก) 10 ไมโครลิตร (μl) ลงในน้ำแป้ง (soluble starch 0.2 %น้ำหนักโดยปริมาตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7) ปริมาตร 1 มล. นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปหยุดปฏิกิริยาในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว และเติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 4 มล. ที่เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ (working phenolphthalein solution) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำมาหักลบกับหลอดควบคุมซึ่งใส่ทุกอย่างเช่นเดียวกันยกเว้นเอนไซม์ แล้วนำไปเทียบหาปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐาน ค่าที่แสดงในผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดผลในตัวอย่างเดียวกันซ้ำกัน 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย โดยมีค่าความผิดพลาดจากการวัด ±6.1%

นิยามของเอนไซม์ CGTase ปริมาณหนึ่งยูนิต คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตหนึ่งไมโครโมล (μmol) ของ β-CD ต่อนาที

<u>หมายเหตุ</u> วิธีเตรียมสารละลายฟีนอฟทาลีน และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สารละลายฟีนอฟทาลีนที่ใช้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งในการวิเคราะห์ เตรียมโดยเติมสารละลายฟีนอฟทาลีนเข้มข้น (phenolphthalein stock 4 mM ในเอทานอล) 0.5 มล. ลงใน 100 มล. ของสารละลายโซเดียมคาร์บอนเนต 125 mM. ซึ่งประกอบด้วย 4% ของเอทานอลความเข้มข้น 99.8% โดยปริมาตร

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 M pH 7) ประกอบด้วย โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 9.1 กรัม และ ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 23.2 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร