บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (rotary shaker) รุ่น Gyrotory G10 บริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.

2. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated Centrifuge) รุ่น 2-21 ของบริษัท Beckman, U.S.A.

3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนลำแสงคู่ (Double Beam Spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu Corporation, Japan

4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton roy

5. เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan

6. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH Meter) รุ่น Cyberscan 1000 บริษัท Eutech Cyberscan, Singapore

7. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany

8. เครื่องโครมาโตรกราฟี (Low Pressure Liquid chromatography) รุ่น Econo ของบริษัท Bio-Rad, U.S.A.

9. เครื่องอิเลกโตรโฟริซิสแบบแผ่น (Slab gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-Protein II Dual ของบริษัท Bio-Rad, U.S.A.

10. ตู้ถ่ายเชื้อ (lamina flow) บริษัท International Scientific supply Co. Ltd., Thailand

เคมีภัณฑ์

1. เคมีภัณฑ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

กลูโคส (glucose) ของ E. Merck Darmstadt, Germany.

แบคโตเปปโตน (bactopeptone) ของ Difco Laboratories, U.S.A.

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

2. เคมีภัณฑ์สำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน

ไคโตแซน (chitosan)

โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ของ Fluka AG. Buchs, Switzerland

โปแตสเซียมซัลเฟต ($KHSO_4$) ของ Fluka AG. Buchs, Switzerland

แอมโมเนียมซัลฟาเมต (ammonium sulfamate) ของ Fluka

3- เมทิล -2- เบนโซไทอะโซลิโนน ไฮดราโซน (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ของ BDH chemicals, Ehgland

ฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) ของ E. Merck, Darmstadt, Germany

อัลบูมิน (Fraction V, 96-99% albumin, bovine) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

3. เคมีภัณฑ์สำหรับการทำโครมาโตรกราฟี และอิเลคโตรโฟริซิส

ดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE - cellulose) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

เซฟาเด็กซ์ จี-75 (Sephadex G-75) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2\ SO_4$) ของ E. Merck, Germany.

อะคริลาไมด์ (acrylamide) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

บิส (N, N-methylene bis acrylamide) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

ทริส (Tris (hydroxymethyl) aminomethane) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

TEMED (N,N,N',N' - Tetramethythylenediamine) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

ไกลซีน (glycine) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

กรดอะซิติก (acetic acid) ของ E. Merck, Germany

เมธานอล (methanol) ของ E. Merck, Germany

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodesyl sulfate) ของ BDH Chemicals, England

สีโคแมสซีบูล จี-250 (Coomossie Brilliant Blue G-250) ของ Fluka AG. Buchs, Switzerland

วิธีการทดลอง

1. **การแยกรา** (Isolation)

นำผลไม้ที่มีเชื้อราขึ้นฟู ลูกแป้งข้าวหมาก 10 ตัวอย่าง และลูกแป้งเหล้า 7 ตัวอย่าง มาแยกเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยนำผลไม้ที่มีราเจริญมาแยกภายใต้กล้องสองตา (stereomicroscope) และนำลูกแป้งแต่ละตัวอย่าง มาบดให้ละเอียด ชั่ง 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร และนำ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารวุ้นพีดีเอ (potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน เมื่อเชื้อราขึ้นฟูแล้ว แยกราที่ขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ภายใต้กล้องสองตา แยกแต่ละชนิดเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียงพีดีเอ เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2. **การคัดเทียบรา** (Screening)

นำราที่แยกได้ จากข้อ 1 มาคัดเทียบความสามารถในการสร้างไดคีน-ดีอะเซทิลเลส โดยมีขั้นตอนและวิธีทำดังนี้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1 การตรวจสอบแบบรวดเร็ว (Rapid test)

วิธีนี้เป็นวิธีตรวจสอบที่ให้ผลรวดเร็ว เป็นวิธีของ Prakasam และ Azariah (1975) โดยเขี่ยเส้นใยรา แต่ละชนิดจากสต๊อค (stock) ที่แยกได้จาก ข้อ 1 ซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ลงในสารละลาย Lugol's iodine ซึ่งประกอบด้วย ไอโอดีน และไปตัสเซียมไอโอไดด์ ในน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วน 1 : 2 : 300 (w :w :v) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 นาที แล้วเติม 1% กรดซัลฟุริก เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยทิ้งไว้ 30 นาที อ่านผลจากสีของปฏิกิริยา โดยให้ผลบวกจะเกิดสีม่วงแดง และไม่เกิดปฏิกิริยาจะให้สีเหลือง

2.2 การตรวจสอบโดยการเทียบสี

ได้ทำตามวิธีของ Ride และ Drysdale (1972) โดยนำราแต่ละชนิดที่แยกได้ทั้งหมด มาทดสอบเพื่อให้ได้ผลที่แน่นอนว่า ราที่แยกได้ มีความสามารถในการสร้างไคติน - ดีอะเซทิลเลส เลี้ยงราแต่ละชนิดในอาหารเหลววายพีจี (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบหาปฏิกิริยาที่เกิด โดยใช้แท่งเจาะอาหารวุ้นด้วยเครื่องเจาะ (cock borrer) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะอาหารวุ้นพีดีเอที่มีราเจริญอยู่ จำนวน 5 ชิ้น ของทุก ๆ สายพันธุ์ ใส่ลงในอาหารเหลววายพีจี ที่ปรับ pH 4.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาส (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นกรองเส้นใยออก นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองได้ ซึ่งใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ มาวัดแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส ตามขั้นตอนต่อไปนี้

การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์

การตรวจแอคติวิตีของเอนไซม์ ได้ใช้วิธีของ Ride และ Drysdale ดังนี้

ใช้สารละลายไดโตแซน ที่มีเปอร์เซ็นต์การอะเซทิลเลชั่น 75.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของสารละลายโซเดียมไนไตรท์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของสารละลาย

โปแตสเซียมซัลเฟต อย่างละ 0.75 มิลลิลิตร ตามลำดับ เขย่าให้ผสมกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และเขย่าติดต่อกัน 15 นาที เติม 0.75 มิลลิลิตร ของ 12.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของสารละลายเอมโมเนียมซัลฟาเมต และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของสารละลาย 3 - เมธิล - 2 - เบนโซไทอะโซลิโนน ไฮดราโซน ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เพื่อหยุดปฏิกิริยา นาน 3 นาที ทิ้งให้เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วเติม 0.75 มิลลิลิตรของ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของสารละลายเฟอริกคลอไรด์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร และเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การอะเซทิลเลชั่น จากกราฟมาตรฐานของสารละลายไคโตแซน และนำไปคำนวณยูนิตของเอนไซม์ ดังแสดงในภาคผนวก ค ในการทดลองจะใช้วิธีการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีของ Ride และ Drysdale (1972) ตลอดการทดลอง การเตรียมสารละลายสำหรับตรวจสอบแอคติวิตี ได้แสดงในภาคผนวก ข หมายเลข 2

การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายไคโตแซน

นำไคโตแซนที่ทราบค่าเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น (% DD) ที่แน่นอนจากแหล่งการค้าถือเป็นมาตรฐานไคโตแซน มาอย่างละ 0.2 กรัม ละลายใน 100 มิลลิลิตร ของ 0.5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก แล้วทำให้เจือจาง 100 เท่า ใช้ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ของสารละลายไคโตแซนที่เตรียมได้ ไปตรวจสอบโดยวิธีการเปรียบเทียบสี ตามที่ได้กล่าวข้างต้น จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 650 นาโนเมตร และ % DD ที่ทราบแน่นอนของไคโตแซน

1 unit ของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกรดอะซิติก 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบแอคติวิตี ดังกล่าวข้างต้น

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) นำสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายลอรี ซี (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำส่วนผสมนี้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เทียบค่าปริมาณโปรตีน จากกราฟมาตรฐานของโบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การจำแนกรา (Identification)

นำราที่คัดเทียบ ได้แอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสสูงที่สุด จากข้อ 2 มาทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะเฉพาะตัวทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) โดยส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์ เพื่อจำแนกชนิดราตามวิธีของ Inui และ Takeda (1965)

5. การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เลี้ยงเชื้อในอาหารวายพีจี เป็นเวลา 7 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อดูว่าการเจริญของเชื้อ (growth curve) โดยเชื้อเจริญและผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลสได้สูงสุด ในเวลาที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

เชื้อตั้งต้นใช้กล้าเชื้อที่เป็นสปอร์ เตรียมสปอร์แขวนลอยในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ อายุของสปอร์ 2 3 และ 4 วัน โดยใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ของน้ำเกลือ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารวุ้นเอียงพีดีเอ ที่เลี้ยงเชื้อ *Rhizopus oligosporus* NS_1 ซึ่งคัดเทียบแล้วว่ามีแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสสูงสุด จากนั้นใช้เข็มปลายงอเขี่ยสปอร์หลุดออกจากเส้นใย ให้ละลายแขวนลอยในน้ำ แล้วนับสปอร์เริ่มต้นด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ประมาณ 10^5 10^6 10^7 และ 10^8

สปอร์ ต่อมิลลิลิตร นำเชื้อไปเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เพื่อหาอายุสปอร์และจำนวนสปอร์ของเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส

6. การปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้สูตรอาหารวายพีจีของ Bartinicki –Garcia และNickerson (1962) ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ 2 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ของแบคโตเปปโตน และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดจากยีสต์ แล้วปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 4.5 ได้แปรผันแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และวิตามิน ให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ดังนี้

6.1 แหล่งคาร์บอน

แปรผันแหล่งคาร์บอนโดยใช้ กลูโคสและซูโครส เป็นแหล่งโมโนแซคคาไรด์ และไดแซคคาไรด์ ตามลำดับ และใช้แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวจ้าว เป็นแหล่งโพลีแซคคาไรด์ ด้วยความเข้มข้นชนิดละ 2 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลววายพีจี ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อโดยใช้สปอร์เริ่มต้นซึ่งมีอายุ 2 วัน จำนวนประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นกรองเส้นใย นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส และวัดน้ำหนักเซลล์แห้งเพื่อเปรียบเทียบ และแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส ในช่วง 1 1.5 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเลี้ยงเชื้อวายพีจี แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์

6.2 แหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลววายพีจี ที่มีกลูโคส ความเข้มข้น1.5 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันชนิดของสารอินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งได้แก่ แบคโตเปปโตน โพลีเปปโตน

และกรดคาซามิโน ส่วนชนิดของสารอินทรีย์ไนโตรเจน ที่ใช้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และ โซเดียมไนเตรต ด้วยความเข้มข้นชนิดละ 1 เปอร์เซ็นต์ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบ และแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส ในช่วง 0.5 1 1.5 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

6.3 แหล่งวิตามิน

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่ได้รับการปรับปรุงแหล่งคาร์บอนจากข้อ 6.1 และแหล่งไนโตรเจนมาแล้วในข้อ 6.2 แปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ ตั้งแต่ 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ นำสูตรอาหารที่ได้รับปรับปรุงแล้วจากข้อ 6.1 - 6.3 ไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

7. ภาวะการเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาผลของอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเร็วของเครื่องเขย่าที่เหมาะสม เพื่อผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส ดังต่อไปนี้

7.1 ค่าความเป็นกรดด่าง

เตรียมอาหารเหลวสูตรที่ได้ปรับปรุงแล้วดังกล่าวข้างต้น แล้วปรับ pH ตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3 3.5 4 4.5 5 5.5 6 6.5 7 และ 8 นำไปเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน แล้วบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองเส้นใยออก นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เพื่อเปรียบเทียบ

7.2 อุณหภูมิ

ใส่สปอร์แขวนลอยของ *R. oligosporus* NS_1 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว ที่ pH 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ ต่อนาที

โดยแปรผันช่วงอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 25 30 35 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส และเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

7.3 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ที่ได้รับการปรับ pH ตั้งต้นเป็น 5.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง และปรับความเร็วของเครื่องเขย่าต่าง ๆ กัน ได้แก่ 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที เพื่อศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

8. การใช้สารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์

ได้เลือกสารเพื่อกระตุ้นการสร้างไคติน-ดีอะเซทิลเลส สองชนิด ได้แก่ผงไคติน และผงไคโตแซน โดยเติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ของผงไคติน และผงไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นต่าง ๆ กัน คือ 65 75.9 และ 85.4 เพิ่มลงในสูตรอาหารที่ได้ปรับปรุงแล้ว และเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสม ตามข้อ 7 เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นวัดและเปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส

9. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งไคติน-ดีอะเซทิลเลส และการเจริญของเชื้อ

ใช้สปอร์แขวนลอย ซึ่งมีอายุ 2 วัน จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารเหลวที่มีการปรับปรุงแล้วเพื่อให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม วัดการเจริญของราในแต่ละวัน โดยการหาน้ำหนักแห้ง และวัดแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากแหล่งเอนไซม์ 3 แหล่ง ดังนี้ จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองเส้นใยออก ใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ส่วนเส้นใยนำมาบดในโกร่งที่มี zercon ช่วยในการทำให้เซลล์แตก และเติม

อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บดที่อุณหภูมิต่ำ (0-4 องศาเซลเซียส) จากนั้นกรองผ่านผ้ากรองไนลอน แล้วนำส่วนของเหลวที่ได้จากการกรองไปปั่นตะกอนด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใสมาเป็นแหล่งเอนไซม์ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) และส่วนกากเซลล์ที่ติดอยู่บนผ้าไนลอนละลายด้วย อะซิเตทบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร และใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ที่เกาะอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane bound enzyme)

10. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

10.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation)

การตกตะกอนโปรตีนใช้การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว โดยเลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 ในอาหารสูตรปรับปรุง ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 13 ฟลาส เลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 4 วัน ในภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส แยกเส้นใยออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองวัตแมนหมายเลข 1 จากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งหมด มาวัดปริมาตร แล้วคำนวณหาปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ในการตกตะกอนไคติน-ดีอะเซทิลเลส ซึ่งใช้ความเข้มข้น 55 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด แล้วโรยผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดลงในสารละลายเอนไซม์อย่างช้า ๆ พร้อมทั้งคนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นกวนต่อไปอีกประมาณ 3 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนโปรตีน ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนน้ำใสที่ได้ มาตกตะกอนต่อโดยเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปจนมีความเข้มข้นอิ่มตัวที่ 85% ของปริมาตรทั้งหมดของสารละลายเอนไซม์ และกวนอย่างช้าๆ ค้างคืน ที่ 4°C หลังจากนั้น นำไปปั่นตกตะกอนโปรตีนที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์

pH 6.0 ในปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ตะกอนละลายได้หมด ไดอะไลซ์ในถุงเซลโลเฟน ข้ามคืนด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนออก ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสมาวัดปริมาตรของสารละลายทั้งหมด หาความเข้มข้นของโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์ เก็บโปรตีนที่ได้ในบัฟเฟอร์ เพื่อการทดลองต่อไป

10.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ DEAE - cellulose

ได้ใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ที่มี DEAE - cellulose บรรจุอยู่ การเตรียม DEAE cellulose นั้น เตรียมโดยนำ DEAE cellulose ประมาณ 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกส่วน ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง และเติม 1 โมลาร์ของ NaCl 500 มิลลิลิตร ลงไป กวนเป็นครั้งคราวประมาณ 30 นาที เพื่อกำจัดอิออนบางชนิดที่ปนเปื้อนอยู่ในเจล เทส่วนน้ำใสทิ้ง พร้อมเจลละเอียดบนผิวหน้าทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ถึง 3 ครั้ง จนไม่มีโซเดียมคลอไรด์เหลืออยู่ ตรวจสอบโดยนำน้ำที่ล้างมาทำปฏิกิริยากับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ล้างจนไม่เห็นตะกอนขุ่นขาวของซิลเวอร์คลอไรด์ (AgCl) จากนั้นเติม 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในเจลที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้สมดุลย์ด้วยการอิ่มตัว (equilibrate) ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ แล้วนำไปบรรจุในคอลัมน์แก้วขนาด 2.5x45 ให้ได้เจลสูง 40 เซนติเมตร ผ่านอะซิเตทบัฟเฟอร์ข้ามคืนจนเจลอยู่ในสภาพสมดุลย์ ที่อัตราการไหล 24 มิลลิลิตร ต่อชั่วโมง หลังจากเจลอิ่มตัวแล้ว ค่อย ๆ ใส่เอนไซม์ที่เตรียมไว้ด้วยพาสเจอร์ปิเปต ลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ แล้วชะโปรตีน ส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยอิออนของเม็ดเจลออกให้หมดด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 เก็บสารละลายโปรตีนหลอดละ 3 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีน โดยนำแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าเข้าใกล้ 0 จากนั้นจึงชะโปรตีนที่ถูกจับอยู่กับเจล ออกด้วย 0-1.0 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ นำแต่ละหลอดไปวัดปริมาณโปรตีนที่ค่าการดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของไดคิน- ดีอะเซทิลเลส แต่ละหลอด จากนั้นรวมสารละลายโปรตีนในหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงเข้าด้วย

กัน วัดปริมาตรของสารละลายทั้งหมดที่รวมได้ พร้อมทั้งแอคติวิตี แล้วไปหาปริมาณโปรตีน

10.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-75

อาศัยหลักการแยกโปรตีนด้วยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล การเตรียมเจล โดยนำ Sephadex G-75 ประมาณ 10 กรัม แช่ในน้ำกลั่น แล้วนำไปต้มจนเดือดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติม 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงไป นำเจลไปดูดอากาศออก 20-30 นาที แล้วนำไปบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1.6x60 เซนติเมตร แล้วผ่านอะซิเตทบัฟเฟอร์ดังกล่าวข้ามคืน จนเจลอยู่ในสภาพสมดุลย์อิ่มตัว ที่อัตราการไหล 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แล้วนำเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ DEAE cellulose และทำให้เข้มข้นโดยการทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (lyophilizer) ละลายตะกอนในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 แล้วผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-75 เก็บสารละลายโปรตีนลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร นำแต่ละหลอดไป วัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากนั้นรวมหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตร พร้อมทั้งแอคติวิตี และปริมาณโปรตีน

10.4 การตรวจความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟริซิส ชนิดแผ่น (plate polycrylamide gel electrophoresis) (Davis, 1964)

เป็นวิธีการแยกโปรตีนโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่มีประจุในสนามไฟฟ้า รวมทั้งการแยกโมเลกุลที่มีขนาดต่างกัน โดยวิธีเตรียมมีดังนี้

ประกบแผ่นแก้วขนาด 7.3x10.3 เซนติเมตร และ 8.3x10.3 เซนติเมตร เข้าด้วยกันโดยให้มีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิลิตร ที่ขอบด้านข้างทั้ง 2 ข้าง ประกอบเข้ากับชุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซฟาเรติงเจล (separating gel) มีความเข้มข้นของเจล 8 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลย 3) ลงในแผ่นแก้วให้มีความสูง 5.5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงเต็มช่องว่างของกระจกที่เหลืออยู่ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว ซับน้ำออกแล้ววางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียม

ช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว เทสารผสมสแตกกิงเจล (stacking gel) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว ด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ แล้วดึงเอาแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดอิเลคโตรโฟริซิส เติมอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดอิเลคโตโฟริซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์ละลายในบัฟเฟอร์สำหรับที่จะใช้วิเคราะห์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) แล้วหยอดตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างในแผ่นเจล และทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 60 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งสีตามรอยเคลื่อนไปจนเกือบถึงปลายด้านล่างของแผ่นเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า ถ่ายเจลออกจากกระจก โดยขณะทำต้องให้เจลอยู่ที่อุณหภูมิ 4°C จากการทำอิเลคโตโฟริซิสแต่ละครั้ง จะได้ 2 แผ่น นำแต่ละแผ่นมาตัดเจล 1 แถว เพื่อนำไปย้อมสีโปรตีน ส่วนแผ่นเจลที่เหลือนำไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิต่ำก่อน แล้วนำเจลที่ถูกตัด มาย้อมสีโปรตีน (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ล้างจนกระทั่งเจลใส และได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่ชัดเจน แผ่นเจลส่วนที่เหลือ ซึ่งยังไม่ได้ผ่านการย้อมสี นำมาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยเทียบระยะ Rf ให้เท่ากับเจลที่ผ่านการย้อมสี ซึ่งเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีน แล้วตัดแผ่นเจลบริเวณที่มีโปรตีนเป็นชิ้นๆ ใส่ลงใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 เขย่าช้า ๆ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เพื่อตรวจว่า แถบโปรตีนที่ติดสีย้อม ให้แอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส

11. การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

11.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของไคติน ดีอะเซทิลเลส โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิส บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์ชนิดแผ่น ตามวิธีของ Laemmli (1970)

ประกบแผ่นแก้ว โดยมีช่องว่างสำหรับใส่เจล เช่นเดียวกับข้อ 10.4 และเทสารละลายผสมของเซฟาเรติงเจล ที่มีเจลเข้มข้น 10% (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) ลงไปในช่องระหว่างแผ่นแก้วให้ได้สูง 5.5 เซนติเมตร หยอดน้ำลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงเต็มช่องว่างที่เหลือ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45-60 นาที จนกระทั่งเจลแข็งตัว เทน้ำออก แล้ววางแผ่นหวีเสียบ (comb) ลงระหว่างแผ่นแก้วทั้งสอง สำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นเทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล ซึ่งมีองค์ประกอบแสดงในภาคผนวก ข หมายเลข 4 เมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) 2-3 ครั้ง แล้วเติมอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงในช่องใส่ตัวอย่างจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐานละลายในบัฟเฟอร์ ซึ่งมีส่วนประกอบแสดงใน ภาคผนวก ข หมายเลข 4 ต้มให้เดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยอดตัวอย่างใส่ช่องตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ในแผ่นเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้า 60 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลู ที่ใช้เป็นตัวติดตามส่วนหน้าของการเคลื่อนที่ลงมาถึงปลายสุดของแผ่นเจล หยุดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจากแผ่นแก้ว นำไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำแผ่นเจล ไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี(ภาคผนวก ข หมายเลข 4) จนเห็นแถบสีโปรตีนชัดเจน เปรียบเทียบตำแหน่งแถบโปรตีนที่เคลื่อนที่ของเอนไซม์กับโปรตีนมาตรฐาน

11.2 การทำเจลฟิลเตรชั่นผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กจี-75

ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (68,000 Da) โอวัลบูมิน(43,000 Da) และไซโตโครม ซี (12,000 Da) ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 ในภาวะเดียวกันกับที่ทำไดติน-ดีอะเซทิลเลสให้บริสุทธิ์ นำแต่ละลำดับส่วนมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 นาโนเมตร สำหรับไซโตโครม ซี วัดที่ 410 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเขียน กราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์ แล้วนำตัวอย่างโปรตีนผ่านคอลัมน์เดียวกัน และเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐาน

12. ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์

12.1 การหาค่า Km ของเอนไซม์ต่อไคโตแซน

นำสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นพอเหมาะ ทำปฏิกิริยากับสารละลายไคโตแซน ที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น 75.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นต่างกัน ตั้งแต่ 1 - 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างกันตั้งแต่ 10-60 นาที นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟในรูปของไลน์ -วีเวอร์เบริ์ก ระหว่าง 1/v และ 1/[s] แล้วหาค่า Km

12.2 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นพอเหมาะ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายไคโตแซน ที่มีเปอร์เซ็นต์ของการดีอะเซทิลเลชั่น เท่ากับ 75.9 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่มีช่วงของ pH ต่างกัน ตั้งแต่ 4 4.5 5 5.5 6 6.5 7 7.5 8 8.5 9 และ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้ได้แก่ 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0-6.5 0.05 โมลาร์ บาบิทอลบัฟเฟอร์ pH 6.5-8.0 และ 0.05 โมลาร์บอเรตบัฟเฟอร์ pH 8.0-10.0

12.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์เข้มข้นพอเหมาะ ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30 35 40 45 50 55 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส กับสารละลายไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น 75.9 เปอร์เซ็นต์ ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.5 แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เปรียบเทียบอุณหภูมิที่ให้แอคติวิตีสูงสุด

12.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อ pH

นำสารละลายเอนไซม์ มาบ่มด้วย 0.05 โมลาร์ของบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ตั้งแต่ 3 3.5 4 4.5 5 5.5 6 6.5 7 7.5 8 8.5 9 และ 10 เป็นเวลา 60 นาที ทำให้เจือจาง 5 เท่าด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 แล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายไคโตแซน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ เทียบกับเอนไซม์เริ่มต้นก่อนนำไปบ่ม

โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้ได้แก่ 0.05 โมลาร์ ของอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 3.0-6.5 0.05 โมลาร์ บาบิทอลบัฟเฟอร์ pH 6.5-8.0 และ 0.05 โมลาร์ บอเรตบัฟเฟอร์ pH 8.0-10.0

12.5 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

บ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเอนไซม์ในแต่ละอุณหภูมิมาทำปฏิกิริยาย่อยสลายสารละลายไคโตแซน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ

13. การทำงานของเอนไซม์ที่สกัดได้ต่อไคโตแซน

13.1 การทำงานของเอนไซม์ต่อผงไคโตแซน

นำผงไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น ต่าง ๆ กัน คือที่ 75.9 85.4 และ 93.8 บ่มกับสารละลายเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ จากการทดลองข้อที่ 10.3 เป็นเวลาต่างกัน 30 นาที จนครบ 6 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นนำมาละลายใน 0.5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก แล้วนำไปหาเปอร์เซ็นต์ของการดีอะเซทิลเลชั่นที่เพิ่มขึ้น โดยวิธีการเปรียบเทียบสี ตามวิธีการในข้อที่ 2.2 และวิธีคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค

13.2 หาเวลาการไฮโดรไลส์ให้สมบูรณ์ของเอนไซม์

นำสารละลายไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น ต่าง ๆ กัน คือที่ 75.9 85.4 และ 93.8 บ่มกับสารละลายเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ แล้วตรวจปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์เป็นระยะ จนกระทั่งการปรากฏสีของปฏิกิริยา ในการหาแอคติวิตีเอนไซม์ไม่เปลี่ยน เพื่อติดตามระยะเวลาการทำงานของเอนไซม์ย่อยสับสเตรทได้หมด ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ได้ไฮโดรไลส์กลุ่มอะเซทิลออกหมดจากสับสเตรท และได้ไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำผลมาเปรียบเทียบกันระหว่างสับสเตรทไคโตแซนทั้ง 3 ชนิด