บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

1. ชนิดและวิธีการแยกจุลินทรีย์จากแป้งเชื้อ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ Rhizopus oryzae ซึ่งแยกได้จากแป้งเชื้อในโรงงานสุราบางยี่ขัน โดยนำแป้งเชื้อใส่ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้แป้งเชื้อกระจาย แล้วนำมาฉาก (streak) บนอาหารวุ้นสูตรที่ 1 (ภาคผนวกข้อ 1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. แยกเอาเชื้อบริสุทธิ์เก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป เชื้อราที่ใช้ในการทดลองทุกครั้งมีอายุ 7 วัน ซึ่งเจริญบนอาหารวุ้นสูตรนี้

2. ศึกษาสภาพอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ R. oryzae

2.1 การหาสารตั้งต้นและปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์

ใช้ปลายข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอน รำข้าวสาลี กากถั่วเหลืองและรำหยาบ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเป็นที่ 4:1 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ 20 กรัมลงในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้วนาน 15 นาที เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปให้ได้ 15 17 20 23 26 29 และ 32 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตร/น้ำหนัก ตามลำดับ แล้วผสมกับ 1 มล.ของสารแขวนลอยของสปอร์ของ R. oryzae ในน้ำซึ่งมีความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์/มล. ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าขวด บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนสปอร์โดยเติมน้ำที่มีทวีน-80 (tween-80) 0.1 % ปริมาตร 100 มล. เขย่าให้สปอร์กระจาย แล้วนับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ดังแสดงในภาคผนวกข้อ 2

2.2 การหาอัตราส่วนอย่างละเอียดของปลายข้าวเจ้าต่อรำหยาบในการสร้างสปอร์ของ R. oryzae

ใช้วิธีการเหมือนข้อ 1.1 แต่แปรผันอัตราส่วนของปลายข้าวเจ้าต่อรำหยาบให้ละเอียดขึ้น และใส่น้ำ 29 % โดยปริมาตร/น้ำหนัก

2.3 การเตรียมสปอร์ของ R. oryzae เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

โดยใช้ปลายข้าวเจ้าผสมรำหยาบอัตราส่วน 9:1 ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 2.2 ปริมาณ 20 กรัมใส่ลงในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้วนาน 15 นาที ใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 29 %โดยปริมาตร/น้ำหนัก ผสมกับสารแขวนลอยของสปอร์ในน้ำเข้มข้น $5x10^7$ สปอร์/มล. 1 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน จึงนำสปอร์ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. การตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคอมิเลส

การตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคอมิเลสโดยหาปริมาณกลูโคสที่เกิดจากการเร่งปฏิกริยาของกลูโคอมิเลส ใช้วิธีเปอร์ออกซิเดสและกลูโคสออกซิเดส เอนไซม์ (Sigma, 1980) หรือเรียกว่า พี.จี.โอ. เอนไซม์ (Peroxidase and Glucose Oxidase enzymes or P.G.O. enzymes) โดยนำสารละลายของเอนไซม์ที่จะทดสอบกลูโคอมิเลสแอคติวิตี ซึ่งผ่านการเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่พอเหมาะมา 0.5 มล. ผสมกับ 4.5 มล.ของสารละลายแป้ง (soluble starch) ที่มีความเข้มข้น 0.2 % (ซึ่งเตรียมได้โดยละลายแป้งในอซิเตตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 แล้วแช่ในน้ำเดือดนาน 2-3 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง) ซึ่งแช่อยู่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 40°ซ. นาน 5 นาที แล้วปล่อยให้เอนไซม์ทำปฏิกริยานาน 30 นาที หยุดปฏิกริยาโดยแช่หลอดลงในน้ำต้มเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (Alazand and Rainboult, 1981) แล้วนำสารละลายนี้มา 0.25 มล. ผสมกับสารละลายพี.จี.โอ เอนไซม์ (ซึ่งมีวิธีเตรียมดังแสดงในภาคผนวกข้อ 4) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที วัดค่าความดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

กลูโคอมิเลสแอคติวิตี 1 หน่วยหมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายแป้ง (soluble starch) ได้กลูโคส 1 มก.ในเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 40°ซ. และที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5

4. การหาสารอาหารและเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae บนอาหารวุ้น

4.1 การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ R. oryzae

ใช้อาหารวุ้นสูตรที่ 2 (ภาคผนวกข้อ 3) 20 มล.ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) นำกระดาษกรองซึ่งอบที่อุณหภูมิ 80°ซ. นาน 24 ชม. ชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว มาวางบนอาหารวุ้นนั้น ใส่เชื้อเริ่มต้นโดยใช้คอร์ค บอร์เลอร์ (cork borler) เจาะอาหารวุ้นในจานเลี้ยงเชื้ออีกจานหนึ่ง ซึ่งมี R. oryzae เจริญอยู่เต็มจาน มาวางไว้ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองเตรียมไว้ (ดังแสดงในภาคผนวกข้อ 3) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 3 วัน ลอกแผ่นกระดาษกรองที่มีราเจริญอยู่เต็มจานออกมาอบที่อุณหภูมิ 80°ซ. นาน 24 ชม. ชั่งน้ำหนักแห้งของเชื้อราบนกระดาษกรองดังแสดงในภาคผนวกข้อ 3

4.2 ชนิดของเกลือแร่ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae

เลี้ยงราบนอาหารวุ้นสูตรที่ 2 (ภาคผนวกข้อ 3) แต่แปรผันปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตตั้งแต่ 0 ถึง 5.0 กรัม/ลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 ถึง 0.5 กรัม/ลิตร คอปเปอร์ซัลเฟตตั้งแต่ 0 ถึง 20 ไมโครกรัม/ลิตร และเฟอร์รัสซัลเฟตตั้งแต่ 0 ถึง 0.5 กรัม/ลิตร ซึ่งมีวิธีการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 4.1 แต่ทำการทดลอง 2 ชุด ชุดที่หนึ่งใช้ในการหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีโดยลอกเอาแผ่นกระดาษกรองที่มีราเจริญอยู่เต็มออกมาอบที่อุณหภูมิ 45°ซ. นาน 12 ชม. แล้วบดด้วยโกร่งบดยาโดยผสมกับทรายละเอียดที่ล้างด้วยกรด (acid wash sand) สกัดเอนไซม์ด้วยอซิเตตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ปริมาตร 20 มล. นาน 3 ชม. กรองเอาสารละลายมาหาแอคติวิตีดังวิธีการในข้อ 3 อีกชุดหนึ่งใช้ในการหาการเจริญของเชื้อราโดยหาจากการชั่งน้ำหนักแห้งของเส้นใยของเชื้อราตามวิธีการข้อ 4.1

5. การหาสภาพของอาหาร ปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็ง

5.1 การหาปริมาณน้ำที่ใส่ลงในอาหารแข็งเพื่อผลิตกลูโคอมิเลสจาก R. oryzae

ใช้อาหารแข็งที่ประกอบด้วยส่วนผสมของปลายข้าวเจ้า ปลายข้าวเหนียวและรำหยาบอัตราส่วน 5:5:2 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่โรงงานสุราบางยี่ขันใช้อยู่ ใส่อาหารแข็งดังกล่าว 12 กรัม ลงในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปให้ได้ 30 40 50 และ 60 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตร/น้ำหนัก ตามลำดับ เติมสารแขวนลอยของสปอร์ของ R. oryzae ที่มีความเข้มข้น $5x10^7$ สปอร์/มล. ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 72 ชม. โดยเก็บตัวอย่างมาหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีที่ช่วงเวลา 6 36 48 60 และ 72 ชม.ตามลำดับ

การหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีในแป้งเชื้อจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าในน้ำที่สกัดเอนไซม์จากเซลที่ไม่แตกจะให้แอคติวิตีต่ำกว่าเซลที่นำไปบดจนแตก ดังนั้นการทดลองจึงต้องนำแป้งเชื้อไปบดก่อนสกัดเอนไซม์ทุกครั้ง แล้วนำมาแช่ในแช่เคตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 นาน 3 ชม.ที่อุณหภูมิ 25°ซ. กรองเอาสารละลายมาไดอะไลซ์ (dialyse) ด้วยถุงไดอะไลซ์ (dialysing bag) ในบัฟเฟอร์เดิมนาน 12 ชม. เพื่อขจัดเอากลูโคอมิเลสออกจากสารละลายของเอนไซม์แล้วจึงนำมาหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีตามวิธีการข้อ 3

5.2 การหาสภาพของอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae

5.2.1 การหาปริมาณรำหยาบที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae บนอาหารแข็ง

ใช้วิธีการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 5.1 และแปรผันปริมาณรำหยาบตั้งแต่ 0 ถึง 10 ส่วน โดยมีปลายข้าวเจ้าบดผสมปลายข้าวเหนียวบดอัตราส่วน 5:5 และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารแข็งให้ได้ 40 % โดยปริมาตร/น้ำหนัก บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 38°ซ. เป็นเวลา 48 ชม. แล้วนำมาตรวจสอบหากลูโคอมิเลสแอคติวิตี

5.2.2 การหาอัตราส่วนของปลายข้าวเจ้าบดต่อปลายข้าวเหนียวบดที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae บนอาหารแข็ง

ใช้วิธีการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 5.2.1 ยกเว้นใช้รำหยาบ 2 ส่วนซึ่งได้จากการทดลองข้อ 5.2.1 แต่แปรผันอัตราส่วนของปลายข้าวเจ้าบดต่อปลายข้าวเหนียวบดเป็น 0:10 1:9 2:8 3:7 4:6 5:5 6:4 7:3 8:2 9:1 และ 10:0 ตามลำดับ แล้วนำมาตรวจหากลูโคอมิเลสแอคติวิตี

5.3 การหาความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae

เลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยปลายข้าวเจ้าบดและรำหยาบอัตราส่วน 5:1 ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 5.2.2 แต่ใส่น้ำที่ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ ลงในอาหารแข็งให้ได้ 40 % โดยปริมาตร/น้ำหนัก

5.4 การหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae

เลี้ยงราบนอาหารแข็งที่มีองค์ประกอบและวิธีการเหมือนข้อ 5.3 แต่ใส่น้ำที่ปรับความเป็น

กรดเป็นด่าง 4.0 ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 5.3 และแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยใช้สปอร์ของ R. oryzae จำนวน $1x10^6$ $5x10^6$ $1x10^7$ $5x10^7$ $1x10^8$ และ $5x10^8$ สปอร์/มล. 1 มล. ตามลำดับ

5.5 การหาอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อซึ่งเหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae

เลี้ยงราบนอาหารแข็งที่มีองค์ประกอบและวิธีการเหมือนข้อ 5.4 แต่ใส่สปอร์เริ่มต้น $5x10^6$ สปอร์/มล. 1 มล. และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 35 37 และ 40°ซ ตามลำดับนาน 60 ชม. เก็บตัวอย่างมาตรวจสอบหากลูโคอมิเลสแอกติวิตีทุก ๆ 6 ชม.

5.6 การหาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนและเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ R. oryzae บนอาหารแข็ง

5.6.1 แอมโมเนียมทาร์เทรต

เลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่มีองค์ประกอบและวิธีการเหมือนข้อ 5.5 แต่แปรผันปริมาณแอมโมเนียมทาร์เทรต 0 0.1 0.3 0.5 1.0 และ 3.0 % โดยน้ำหนักตามลำดับ และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ. นาน 36 ชม.

5.6.2 โพลีเปปโตน

เลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่มีองค์ประกอบและวิธีการเหมือนข้อ 5.5 แต่แปรผันปริมาณโพลีเปปโตน 0 0.2 0.5 0.7 และ 1.0 % โดยน้ำหนักตามลำดับ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ. นาน 36 ชม.

5.6.3 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

เลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่มีองค์ประกอบและวิธีการเหมือนข้อ 5.5 แต่มีแอมโมเนียมทาร์เทรต 0.3 % โดยน้ำหนักแล้วแปรผันปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0 0.1 0.2 0.3 และ 0.5 % โดยน้ำหนัก

5.6.4 แมกนีเซียมซัลเฟต

เลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่มีองค์ประกอบและวิธีการเหมือนข้อ 5.6.3 แต่มีโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 % โดยน้ำหนัก แล้วแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต 0 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 % โดยน้ำหนักตามลำดับ

6. การขยายสเกล (scale up) การผลิตกลูโคอมิเลส

ใช้ปลายข้าวเจ้าผสมรำหยาบอัตราส่วน 5:1 ปริมาณ 1.2 กก. ใส่น้ำที่ปรับความเป็นกรดเป็นด่างให้ได้ 4.0 ซึ่งมีโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 % แอมโมเนียมทาร์เทรต 0.3 % และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 % โดยน้ำหนักของอาหารแข็งละลายอยู่ นึ่งด้วยไอน้ำนาน 30 นาที แล้วผสมกับสารแขวนลอยของสปอร์ของ R. oryzae ($5x10^6$ สปอร์/มล.) ปริมาตร 100 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. นาน 36ชม. เป่าอากาศผ่านลงในน้ำเพื่อให้อากาศอิ่มตัวด้วยความชื้นตลอดเวลา วัดความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศในตู้บ่มเชื้อด้วยเทอร์โมมิเตอร์แบบกระเปาะแห้งกระเปาะเปียก (wet and dry bulb thermometer) อุณหภูมิในตู้บ่มเชื้อและในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทอร์โมมิเตอร์ทุก ๆ 3 ชม. และหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีทุก ๆ 6 ชม.

7. การทำให้แป้งเชื้อแห้งโดยใช้ความร้อน

นำแป้งเชื้อที่ได้จากการเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็ง (จากข้อ 6) มาอบที่อุณหภูมิ 40 45 50 และ 55°ซ ตามลำดับนาน 12 ชม. โดยเก็บตัวอย่างมาหาความชื้นและตรวจสอบหากลูโคอมิเลสแอคติวิตีทุก ๆ 3 ชม.

8. การหาปริมาณโปรตีน

โดยการวัดค่าความดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

9. การทำดิสซ์ เจล อิเลกโตรโฟรีซิส (disc gel electrophoresis)

บรรจุโพลีอคริลาไมด์ (polyacrylamide) 7.5 % ที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 (องค์ประกอบและวิธีการดังแสดงในภาคผนวกข้อ 6) ลงในหลอดแก้ว (0.5 x 7.0 ซม.) ใช้โปรตีนตัวอย่างละ 200 ไมโครกรัมผ่านกระแสไฟฟ้าหลอดละ 5 มิลลิแอมแปร์ นานประมาณ 2 ชม. นำแท่งเจลออกจากหลอดแก้ว ตัดแท่งเจลแท่งหนึ่งออกเป็นท่อน ๆ ละ 1 มม. ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลายแป้ง (soluble starch) 0.2 % ปริมาตร 1 มล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 ชม. เพื่อหากลูโคอมิเลสแอคติวิตี ส่วนแท่งเจลอีกแท่งหนึ่งนำมาย้อมสี อมิโด แบลค (amido black) 1 % นาน 30 นาที แล้วล้างสีออกด้วยสารละลายกรดอซิติก 7 %นำแท่งเจลมาวัดหาค่าอาร์ เอฟ. (Rf)

10. การแซคคาริฟิเคชั่นข้าวเหนียว

นำแป้งเชื้อที่เตรียมได้ (734 หน่วย/กรัมแป้งเชื้อ) มาย่อยข้าวเหนียว 20 กรัม ที่แช่น้ำนาน 6 ชม. นึ่งด้วยไอน้ำนาน 30 นาที ทิ้งให้เย็น นำมาใส่ขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. แล้วใส่แป้งเชื้อและน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตามต้องการ วัดปริมาณกลูโคสที่ได้โดยวิธี พี.จี.โอ เอนไซม์

11. การขยายสเกลการแซคคาริฟิคาชั่นข้าวเหนียว

นำแป้งเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 6 มาย่อยข้าวเหนียว 500 กรัม ซึ่งมีวิธีการเตรียมเหมือนข้อ 10 ใส่ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 ซม. ใส่แป้งเชื้อ 5 % โดยน้ำหนักและเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50 % บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 ชม. เก็บตัวอย่างมาหาปริมาณกลูโคสที่ได้ทุก ๆ 12 ชม.

011298