สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

# บทที่ 3

# ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 <u>แหล่งของจุลินทรีย์</u>

*Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบโรงงานเพาะเห็ด จังหวัดนครปฐม เจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและอุณหภูมิสูง ซึ่งเก็บรักษาในอาหาร Basal medium ที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยห้องปฏิบัติการเอนไซม์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

3.2 <u>การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์</u>

ในการวิจัยครั้งนี้เอนไซม์ถูกผลิตขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์นั้นใช้ Basal medium ที่ประกอบด้วย $K_2HPO_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร; urea 2.0 กรัมต่อลิตร; $NaHCO_3$ 7.0 กรัมต่อลิตร; $Na_2CO_3$ 1.0 กรัมต่อลิตร; mineral solution 200 ไมโครลิตร; yeast extract 2.0 กรัมต่อลิตร; cysteine-HCl 0.5 กรัมต่อลิตร; resazurin 0.001 กรัมต่อลิตร และใช้แป้ง 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่ง mineral solution ประกอบด้วย $MgCl_2.6H_20$ 10 กรัมต่อลิตร; $CaCl_2.2H_20$ 1.5 กรัมต่อลิตร; $FeSO_4.6H_20$ 0.0125 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นอาหารถูกปรับเป็นพีเอช 7.0 ด้วย HCl เมื่อปรับพีเอชเรียบร้อยแล้ว จึงแบ่งอาหารปริมาตร 80 มิลลิลิตร ลงในขวดเลี้ยงเชื้อ (serum bottle; 100 มิลลิลิตร) และนำไปทำให้ไม่มีออกซิเจนโดยการพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนและปิดขวดด้วยฝาอลูมิเนียม จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3 <u>การผลิตเอนไซม์</u>

จุลินทรีย์ตั้งต้น (starter culture) ถูกถ่ายลงในอาหารที่เตรียมในขวดเลี้ยงเชื้อที่กล่าวมาข้างต้นภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน นำไปบ่มอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งจุลินทรีย์เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง ส่วนใสของน้ำเลี้ยงที่ได้ (supernatant) ใช้เป็น crude enzyme ส่วนตะกอนเซลล์ทำการชะด้วยสาร ละลาย sucrose (ร้อยละ 1, v/v) ส่วนที่ได้ใช้เป็น bound pellet enzyme เก็บไว้ตรวจสอบกิจกรรมและคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ต่อไป

3.4 <u>การศึกษาระยะเวลาในการผลิตอะไมเลส</u>

ทำการผลิตอะไมเลสโดยเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้น โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปตรวจสอบกิจกรรมของอะไมเลส ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน และค่าพีเอช

3.5 <u>การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์</u>

ตรวจสอบกิจกรรมของอะไมเลสโดยการเติม crude enzyme 0.1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย soluble starch หรือแป้งมันสำปะหลังดิบ ร้อยละ 0.2 ใน 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยวิธีของ Somogyi (1952) โดยใช้ D-glucose ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

1 หน่วย (U) ของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรท โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกูลโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

3.6 <u>การตรวจสอบปริมาณโปรตีน</u>

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์โดยใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) และใช้สารละลาย bovine serum albumin ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน ส่วนปริมาณโปรตีนที่ได้จากการชะคอลัมน์ต่างๆ ใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

3.7 <u>ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์</u>

ก. ผลของพีเอชต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของอะไมเลส

วัดกิจกรรมอะไมเลสในสารละลาย soluble starch ร้อยละ 0.5 ของปริมาตร ในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5-11 ซึ่งประกอบด้วยซิตริกบัฟเฟอร์ (พีเอช 5.0-6.0) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0-7.0) Tris-HCl บัฟเฟอร์ (พีเอช 7.0-9.0) และคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (พีเอช 9.0-11.0) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ส่วนเสถียรภาพของอะไมเลส ทำได้โดยบ่มอะไมเลส ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5-11 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วตรวจหากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ โดยใช้ soluble starch ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะไมเลส

ข. ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของอะไมเลส

วัดกิจกรรมอะไมเลสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ที่หาได้ในข้อ ก. อุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ส่วนเสถียรภาพของอะไมเลส ทำได้โดยบ่มอะไมเลสในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่หาได้ในข้อ ก. อุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่

ค. ผลของ metal ion ต่อการทำงานและเสถียรภาพของอะไมเลส

นำสารละลายเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับ EDTA ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปตรวจวัดกิจกรรมอะไมเลส ถ้า EDTA มีผลทำให้กิจกรรมของ อะไมเลส ลดลง จึงนำไป dialysis เพื่อกำจัด EDTA ออกไป จากนั้นเติมสารละลาย metal ions ชนิดต่างๆ ได้แก่ $Ca^{2+}$ $Co^{2+}$ $Cu^{2+}$ $Mn^{2+}$ $Mg^{2+}$ $Fe^{2+}$ และ $Zn^{2+}$ ลงในเอนไซม์ ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน เป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบกับ control ที่ไม่เติม EDTA ส่วนผลของ metal ion ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ ทำโดยบ่มอะไมเลสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใน metal ion ที่มีผลในการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ที่หาได้ในขั้นต้น ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ metal ion เป็น 1 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับ control ที่บ่มเอนไซม์กับบัฟเฟอร์ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 40 และ 60 นาที นำไปตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็นเวลา 10 นาที

3.8 <u>การตรวจสอบการยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับแป้งดิบชนิดต่างๆ</u>

ใช้วิธีการทดลองตามวิธีของ Ratanakhanokchai และคณะ (1999) โดยนำสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตรบ่มกับแป้งดิบชนิดต่างๆ 0.25 กรัม ที่แช่ใน acetate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว ปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที สารละลายส่วนใส (unbound) นำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนเปรียบ เทียบกับปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น

3.9 <u>Gel electrophoresis และ active-PAGE</u>

SDS-PAGE ใช้วิธีการของ Laemmli (1970) โดยต้มตัวอย่างโปรตีนใน SDS ร้อยละ 2 (w/v), 2-mercaptoethanol ร้อยละ 5 (v/v), glycerol ร้อยละ 10 (v/v) และ Tris-HCl 15 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 6.8) นาน 3 นาที โดยใช้ stacking และ separating gel ที่ประกอบด้วย polyacrylamide ร้อยละ 5 และ 10 ตามลำดับ และใช้โปรตีนมาตรฐานต่างๆ (high molecular weights calibration kit,) จากบริษัท Pierce ภายหลังจากที่ electrophoresis เสร็จแล้ว นำเจลไปย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

ส่วน native-PAGE ทำเช่นเดียวกับ SDS-PAGE แต่ไม่มีการเติมสารละลาย SDS และ 2-mercaptoethanol ลงในตัวอย่างโปรตีน และไม่มีการต้มตัวอย่าง

active-PAGE ใช้วิธีการของ Nakamura และคณะ (1993) โดยใช้ polyacrylamide ร้อยละ 10 ที่ประกอบด้วยแป้งที่ละลายน้ำร้อยละ 0.1 ภายหลังจากที่ electrophoresis เสร็จ โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับ SDS-PAGE นำเจลไปล้างด้วย tritonX-100 ร้อยละ 2 (v/v) โดยเขย่าเบาๆเพื่อล้าง SDS ออก และ renature โปรตีนที่ติดบนเจล หลังจากนั้นล้างเจล 4 ครั้งด้วยฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเจลไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนร้อยละ 0.1 ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ จนกระทั่ง excess dry ถูกชะออกจาก active band จนหมด

3.10 <u>การศึกษาและเปรียบเทียบความสามารถของอะไมเลสต่อการย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ</u>

เตรียมแป้งดิบชนิดต่างๆ ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 เติม sodium azide 5 มิลลิโมลาร์ นำไปวางใน water bath shaker ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเอนไซม์ลงไป 0.2 ยูนิต เพื่อย่อยแป้งแต่ละชนิด เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 15 30 นาที 1.5 2 3 4 5 7 9 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ ปั่นแยกแป้งและส่วนใสออกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 10 นาที นำตัวอย่างที่เวลาต่างๆ ไปตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมย่อยสลายของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบกับ control ที่ไม่เติมเอนไซม์ และเก็บแป้งที่ได้จากการปั่นแยกที่เวลา 12 ชั่วโมง นำไปตรวจดูลักษณะของเม็ดแป้งเทียบกับแป้งที่ไม่เติมเอนไซม์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.11 <u>การตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์น้ำตาล</u>

การตรวจสอบหาชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ และกากมันสำปะหลังด้วยเทคนิค Thin layer chromatography โดยการใช้ Silica gel 60 F 254 (Merck art. No.1.05554 ขนาด 20x20 เซนติเมตร) และ solvent system ที่ประกอบด้วย isopropanol-acetone-lactic acid 0.1 โมลาร์ (4:2:2) ตรวจสอบ sugar spot โดยการ spray ด้วย reagent ที่ประกอบด้วย aniline-$\alpha$-diphenylamine-acetone-80% $H_3PO_4$ (4 มิลลิลิตร: 4 กรัม: 200 มิลลิลิตร: 30 มิลลิลิตร) (Ratanakhanokchai และคณะ, 1992) โดยใช้ D-glucose, maltose, D-xylose และ D-xylobiose เป็นน้ำตาลมาตรฐานในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย ส่วนการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลด้วยเทคนิค HPLC ทำได้โดยการใช้คอลัมม์ Shodex Ionpak KS-800P (strong cation-exchange resin gels) และใช้ refractive index detector ในการตรวจวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ของ mobile phase โดยมีน้ำตาลดังที่กล่าวมาข้างต้นเป็นน้ำตาลมาตรฐาน (Pason และคณะ, 2006)