

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ตัวอย่างดินที่นำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย จากแหล่งต่างๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ ดินภายในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ บริเวณคอกอินทนนท์ บริเวณน้ำพุร้อนเทพพนม อ. แม่แจ่ม บริเวณน้ำพุร้อนสันกำแพง อ. สันกำแพง และบริเวณน้ำพุร้อน อ. ฝาง
2. อาหารที่ใช้แยกและเพาะเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)
 - 2.1 Carboxymethylcellulose (CMC) agar
 - 2.2 Carboxymethylcellulose broth
 - 2.3 Nutrient agar
3. สารเคมี
 - 3.1 สารเคมีที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
 - 3.1.1 Carboxymethylcellulose
 - 3.1.2 Casamino acid
 - 3.1.3 Peptone
 - 3.1.4 Yeast extract
 - 3.1.5 Ammonium chloride
 - 3.1.6 Ammonium sulphate
 - 3.1.7 Sodium nitrate
 - 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข)
 - 3.2.1 Citric acid
 - 3.2.2 Tri-sodium citrate
 - 3.2.3 Sodium hydroxide
 - 3.3 สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก ข)
 - 3.3.1 0.1% Congo red
 - 3.3.2 1 M NaCl
 - 3.3.3 Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent
 - 3.3.4 1% Carboxymethylcellulose solution

3.4 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณโปรตีน

3.4.1 Sodium carbonate

3.4.2 Sodium hydroxide

3.4.3 Copper sulfate

3.4.4 Trisodium citrate

3.4.5 Folin reagent

3.4.6 Bovine serum albumin (BSA)

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

4.1 จานเพาะเชื้อ

4.2 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร

4.3 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 37°C และ 45°C

4.4 เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดปริมาณเอนไซม์เซลล์

5.1 micropipette

5.2 หลอดทดลอง

5.3 เครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น EBA12 R ยี่ห้อ Hettich

5.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Memmert

5.5 spectrophotometer รุ่น UV 2100 ยี่ห้อ Shimadzu

5.6 tip

6. อุปกรณ์อื่นๆ

6.1 ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร

6.2 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

6.3 ขวด universal

6.4 กระบอกตวง

6.5 บีกเกอร์

6.6 แท่งแก้วคน

6.7 ที่วางหลอดทดลอง

6.8 ซ้อนตักสาร

6.9 ห่วงถ่ายเชื้อ

6.10 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ

- 6.11 เครื่องซังสาร
- 6.12 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) รุ่น SS-325 ยี่ห้อ Tomy
- 6.13 ตู้อบอุณหภูมิสูง
- 6.14 เครื่องวัด pH (pH meter) รุ่น F21 ยี่ห้อ Horiba
- 6.15 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope) ยี่ห้อ Olympus
- 6.16 สไลด์
- 6.17 ไม้บรรทัด
- 6.18 กระดาษอุณหภูมินิยม
- 6.19 ถุงพลาสติก
- 6.20 กระดาษซังสาร
- 6.21 สำลี

วิธีการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียทนความร้อนที่สามารถละลายเซลล์โลส
 - 1.1 เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ 5 แหล่งในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ภายในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 4 ตัวอย่าง บริเวณคอยอินทนนท์ 4 ตัวอย่าง บริเวณน้ำพุร้อนเทพพนม อ. แม่แจ่ม 2 ตัวอย่าง บริเวณน้ำพุร้อนสันกำแพง อ. สันกำแพง 4 ตัวอย่าง และน้ำพุร้อนอ. ฝาง 6 ตัวอย่าง ที่มีอุณหภูมิแตกต่างกันตั้งแต่ประมาณ 14 ถึง 75 °C นำมาแยกเชื้อทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอการแยกเชื้อภายในหนึ่งสัปดาห์
 - 1.2 นำดินตัวอย่างมาระเหยน้ำพอกหมด โดยใส่ในฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ อังบน water bath อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 20 นาที
 - 1.3 ชั่งดิน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการทำให้เชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางลง 10 เท่า จนถึงความเจือจางที่ 10^{-6}
 - 1.4 นำสารละลายดิน 0.1 มิลลิลิตร ทุกความเจือจางมาเกลี่ยบน carboxymethylcellulose (CMC) agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 - 1.5 นำเชื้อแต่ละโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบน CMC agar เพาะเลี้ยงบนจาน nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บบนอาหารวุ้นเอียงเป็น stock culture slant เพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป
- ดินที่นำมาแยกเชื้อจะระบุเป็นรหัสดังนี้
 - ก. ดินภายในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อุณหภูมิ 35 °C ให้รหัสเป็น CMU1, 2, 3 และ 4

- ข. ดินบริเวณคอกอินทนนท์
- อุณหภูมิ 14.5°C ให้รหัสเป็น I1
 - อุณหภูมิ 15°C ให้รหัสเป็น I2
 - อุณหภูมิ 22°C ให้รหัสเป็น I3
 - อุณหภูมิ 22.5°C ให้รหัสเป็น I4
- ค. ดินบริเวณน้ำพุร้อนเทพพนม
- อุณหภูมิ 42°C ให้รหัสเป็น T1
 - อุณหภูมิ 62°C ให้รหัสเป็น T2
- ง. ดินบริเวณน้ำพุร้อนสันกำแพง
- อุณหภูมิ 49°C ให้รหัสเป็น SK1 และ SK2
 - อุณหภูมิ 54°C ให้รหัสเป็น SK3
 - อุณหภูมิ 62°C ให้รหัสเป็น SK4
- จ. ดินบริเวณน้ำพุร้อนอำเภอฟาง
- อุณหภูมิ 45°C ให้รหัสเป็น F1
 - อุณหภูมิ 46°C ให้รหัสเป็น F2
 - อุณหภูมิ 60°C ให้รหัสเป็น F3
 - อุณหภูมิ 62°C ให้รหัสเป็น F4
 - อุณหภูมิ 73°C ให้รหัสเป็น F5
 - อุณหภูมิ 75°C ให้รหัสเป็น F6
2. การทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลส
- 2.1 การทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง
- นำแบคทีเรียที่แยกได้แล้วเก็บในอาหาร NA มาเพาะเลี้ยงบน CMC agar โดยใช้ loop ลากเป็นเส้นยาวประมาณ 1 เซนติเมตร (Gulati *et al.*, 1997) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสโดยเททับด้วย 0.1% congo red เป็นเวลา 15 นาที เททิ้ง แล้วเททับด้วย 1 M NaCl จะปรากฏวงใสที่ไม่ติดสี congo red ที่เกิดจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์เซลลูเลส วัดขนาดความกว้างของวงใสโดยวัดผลต่างระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสและเส้นผ่าศูนย์กลางรอยการเจริญของ isolates ที่ให้ผลการเกิดวงใสจะนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในขั้นตอนต่อไป
- 2.2 การทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว
- เจียเชื้อแต่ละไอโซเลทที่แยกได้ 1 loop เพาะลงใน CMC broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะแบบเขย่า (ภูวนัฐ, 2535) นำมาเก็บเอนไซม์โดยนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหาค่าการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ DNS reagent ตามวิธีของ Miller (1959) (ภาคผนวก ค) และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ

Lowry เพื่อหา specific activity เชื้อที่ให้ผล enzyme activity สูงสุดจะนำมาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

3. การบ่งบอกชนิดของแบคทีเรีย (สุรางค์, 2538 และ Krieg *et al.*, 1984)

การบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียตามวิธีที่ใช้ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg *et al.*, 1984)

3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อที่มี enzyme activity สูงสุด ซึ่งได้แก่ไอโซเลท CMC4-4 มาเพาะเลี้ยงบน NA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำ gram stain ตรวจสอบรูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ oil immersion objective

3.2 ศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีบางประการ

ศึกษาการสร้างอินโดล ความสามารถในการเคลื่อนที่ การย่อยสลายเจลาติน การผลิต catalase การใช้ nitrate และความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ glucose manitol arabinose และ xylose (ภาคผนวก ก)

4. การศึกษาผลของปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบ (seed culture)

นำเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผล enzyme activity สูงสุดที่คัดเลือกจาก 2.2 จำนวน 1 ไอโซเลท คือ CMC4-4 มา streak บน CMC agar ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อ 1 loop จากโคโลนีเดียวมาเพาะลงใน CMC broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.2 การทดสอบเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียมเชื้อตั้งต้นตามข้อ 4.1 ใช้ปิเปตที่ผ่านการทำให้เชื้อดูดเชื้อตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร (ประมาณ 5%) เพาะลงใน CMC broth ซึ่งใช้เป็น basal medium มีส่วนประกอบคือ CMC 0.05%, yeast extract 0.01% และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.01% pH 7 ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ 25 37 45 55 และ 65°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วเก็บเอนไซม์เพื่อนำมาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ DNS reagent และวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry เพื่อหา specific activity

4.3 การทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและค่าความเป็นกรดและด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียม CMC broth ที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน 0.05 % และ 0.1% และ pH ที่แตกต่างกัน คือ 3 5 7 9 และ 11 ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพาะเชื้อตั้งต้นบ่มที่

อุณหภูมิที่เหมาะสมที่เชื้อให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดจากข้อ 4.2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วเก็บเอนไซม์เพื่อหาปริมาณเซลลูเลสโดยใช้ DNS reagent และวัดปริมาณโปรตีน เพื่อหา specific activity นำอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและค่า pH ที่ให้ค่า enzyme activity สูงสุด เพื่อศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส

4.4 การทดสอบเพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียม CMC broth ที่มีแหล่งคาร์บอนและ pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากข้อ 4.3 โดยให้อาหารมี yeast extract peptone casamino acid NH_4Cl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ปริมาณ 30 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเชื้อแล้วบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่เลือกจาก 4.2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วเก็บเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อหา enzyme activity และ specific activity จากนั้นทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิต

เซลลูเลสต่อไป

4.5 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียมอาหารเช่นเดียวกับข้อ 4.4 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ที่ให้ผลปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดจากข้อ 4.4 เพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เก็บเอนไซม์ทุกๆ 2 - 4 ชั่วโมง ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง แล้วหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ DNS reagent และหาปริมาณโปรตีน เพื่อกำหนดค่า specific activity

5. การเก็บเกี่ยวเอนไซม์เซลลูเลส

นำอาหารที่เพาะเลี้ยงแบบที่เรียวมาเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วย high speed centrifuge ที่อัตราเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ซึ่งมี crude enzyme ไว้ทดสอบต่อไป

6. การวัดการทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีของ Miller (1959)

6.1 การวัดการทำงานของเอนไซม์โดยหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำ crude enzyme ที่เก็บได้ไปวัดการทำงานของเอนไซม์ โดยเตรียมชุดทดลอง 3 ชุดคือ

1. หลอดที่มี CMC 1% ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (substrate control ; SC)
2. หลอดที่มี crude enzyme 0.5 มิลลิลิตร และ 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (enzyme control ; EC)

3. หลอดที่มี crude enzyme 0.5 มิลลิลิตร และ CMC 1% ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (enzyme substrate ; ES)

เขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที ยกออกแล้วเติม DNS reagent ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วยกขึ้นเติม sodium-potassium tartate 40% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร ด้วย spectrophotometer เปรียบเทียบกับ blank

นำค่า OD_{ES} ที่วัดได้ลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงของ EC และ SC แล้วนำค่า OD (OD_{ES} - OD_{EC} - OD_{SC}) นี้ไปเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) เพื่อนำไปคำนวณหา enzyme activity

1 unit ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมา 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

$$\text{Enzyme activity} = \frac{\text{milligram glucose} \times 0.185}{0.5 \text{ millitre enzyme}} \quad \text{unit / ml}$$

6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (Lowry *et. al.*, 1951)

นำ crude enzyme ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติม reagent C (ภาคผนวก ข) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลาย 1 N Folin reagent (ภาคผนวก ข) 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่า OD ที่วัดได้กับปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ง)

สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่