

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การตรวจสอบอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงใน 2 ไอโซเลทจากตัวอย่างดิน ที่แยกโดยจุฬาฯ (2544) ซึ่งทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตเซลล์ที่มี enzyme activity สูงสุด คือ ไอโซเลท CMU4-4 แยกจากดินในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส วัด enzyme activity เท่ากับ 0.066 unit/ml และ specific activity เท่ากับ 0.11 unit/mg protein ไอโซเลท T1-5 แยกจากดินน้ำพุร้อนเทพพนม ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส วัด enzyme activity เท่ากับ 0.058 unit/ml และ specific activity เท่ากับ 0.088 unit/mg protein มาตรวจสอบอนุกรมวิธาน (ควงพร, 2537; Krieg *et al.*, 1984)

1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงใน nutrient agar มาชั่งมลกรัม (ภาคผนวก ข) ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้ oil immersion objective ศึกษาลักษณะต่างๆ ดังนี้

1.1.1 การติดสีแกรม

1.1.2 ขนาดของเซลล์

1.1.3 รูปร่างลักษณะของเซลล์

1.1.4 การจัดเรียงตัวของเซลล์

1.1.5 การสร้างและลักษณะของสปอร์

1.2 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีบางประการ (ภาคผนวก จ)

1.2.1 Catalase test

1.2.2 Indole test

1.2.3 Voges-proskauer test (V-P test)

1.2.4 Hydrolysis of gelatin

1.2.5 Motility

1.2.6 NO_2^- from NO_3^-

1.2.7 Oxidation fermentation

1.2.8 Acid form D-glucose

D-xylose

D-mannitol

L-arabinose

2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส

2.1 การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นต่อการเจริญของแบคทีเรีย

2.1.1 ใช้ห้วงเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวบนจาน nutrient agar มาเพาะเลี้ยงใน nutrient broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.2 ปิเปตเชื้อที่เลี้ยงใน nutrient broth ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในอาหารตั้งต้นชนิดต่างๆ ได้แก่ nutrient broth, tryptone yeast extract broth, Czapek's medium และ glucose soybean medium (GSM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มใน incubator shaker ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.3 วัดอัตราการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer รุ่น UV 2100 ของ Shimadzu ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเซลลูเลส

2.2.1 เตรียม cellulose broth (ภาคผนวก ก) ที่มี 0.2% cellulose ยี่ห้อ Merck เป็นแหล่งคาร์บอน และ 0.5% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปิเปตเชื้อที่ได้จากข้อ 2.1 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน incubator shaker ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง (+/-28), 37, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.2 ทำการเก็บเอนไซม์ โดยนำน้ำเลี้ยงมาเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วย high speed centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส (supernatant) มาวัดการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) ด้วย DNS reagent ตามวิธีของ Miller (1959) (ภาคผนวก ค) และวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) (ภาคผนวก ค) เพื่อดูความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ โดยดูการทำงานเฉพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ ซึ่งหมายถึงจำนวนหน่วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในโปรตีน 1 มิลลิกรัม (มุกดาและนิมมวล, 2527)

2.3 การศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตเซลลูเลส

2.3.1 เตรียม cellulose broth ที่มี 0.2% cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน และ 0.5% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน มี pH เริ่มต้นของอาหารต่างๆ คือ 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0 และ 9.0

2.3.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี pH ในข้อ 2.3.1 นำไปบ่มใน incubator shaker ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.3 ทำการเก็บและวัดการทำงานของเอนไซม์ และวัดปริมาณโปรตีน

2.4 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลลูเลส

2.4.1 เตรียม cellulose broth ที่มีแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ cellulose acetate, carboxymethyl cellulose และ cellobiose แทนในสูตร cellulose broth มี 0.5% peptone pH ที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.3

2.4.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ นำไปบ่มใน incubator shaker ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4.3 ทำการเก็บและวัดการทำงานของเอนไซม์และวัดปริมาณโปรตีน

2.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลลูเลส

2.5.1 เตรียม cellulose broth ที่มี แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.4 แทนในสูตร cellulose broth ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% และ 0.5% มี 0.5% peptone pH ที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.3

2.5.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มใน incubator shaker ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.5.3 ทำการเก็บและวัดการทำงานของเอนไซม์ และวัดปริมาณโปรตีน

2.6 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเซลลูเลส

2.6.1 เตรียม cellulose broth ที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมในข้อ 2.5 แทนในสูตร cellulose broth ที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ tryptone, soytone, ammonium sulphate และ ammonium nitrate pH ที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.3

2.6.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ นำไปบ่มใน incubator shaker ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.6.3 ทำการเก็บและวัดการทำงานของเอนไซม์ และวัดปริมาณโปรตีน

2.7 การศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเซลลูเลส

2.7.1 เตรียม cellulose broth ที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.5 มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.6 แทนในสูตร cellulose broth ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% และ 0.5% pH ที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.3

2.7.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มใน incubator shaker ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.7.3 ทำการเก็บและวัดการทำงานของเอนไซม์ และวัดปริมาณโปรตีน

2.8 การศึกษาผลความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์

2.8.1 เตรียม cellulose broth ที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่สุดในข้อ 2.5 มีแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดข้อ 2.7 แทนในสูตร cellulose broth ที่มี KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% และ 0.5% pH ที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.3

2.8.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มใน incubator shaker ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.8.3 ทำการเก็บและวัดการทำงานของเอนไซม์ และวัดปริมาณโปรตีน

2.9 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์

2.9.1 เตรียม cellulose broth ที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่สุดในข้อ 2.5 มีแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.7 แทนในสูตร cellulose broth ที่มี KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในข้อ 2.8 pH ที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.3

2.9.2 นำไปบ่มใน incubator shaker ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.2 เป็นเวลาต่างๆ คือ 6, 12, 18, 24, 30, 36 และ 42 ชั่วโมง

2.9.3 ทำการเก็บและวัดการทำงานของเอนไซม์ และวัดปริมาณโปรตีน

3. การศึกษาหาคุณสมบัติบางประการของเซลล์

3.1 การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของเซลล์

3.1.1 การศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำ crude enzyme ที่ได้จากข้อ 2 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับซับสเตรท ที่ pH 3.0, 4.0, 4.5, 4.8, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0 และ 9.0 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดการทำงานของเอนไซม์

3.1.2 การศึกษาความเสถียรต่อ pH ของเอนไซม์

นำ crude enzyme ที่ได้จากข้อ 2 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 0.05 M citrate buffer ที่ pH ต่างๆ คือ 3.0, 4.0, 4.8, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1% CMC 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที แล้ววัดการทำงานของเอนไซม์

3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเซลลูเลส

3.2.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำ crude enzyme ที่ได้จากข้อ 2 มาทำปฏิกิริยากับซับสเตรทที่เหมาะสมในข้อ

3.1.1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (+/-28), 37, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที แล้ววัดการทำงานของเอนไซม์

3.2.2 ศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์

นำ crude enzyme ที่ได้จากข้อ 2 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 0.05 M citrate buffer pH 4.8 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็น แล้ววัดการทำงานของเอนไซม์

3.3 การศึกษาผลของเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์

นำ crude enzyme ที่ได้จากข้อ 2 มาทำปฏิกิริยากับซับสเตรทที่เหมาะสมในข้อ 3.1.1 บ่มที่อุณหภูมิห้องที่เหมาะสมในข้อ 3.2.1 เป็นเวลา 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 และ 120 นาที แล้ววัดการทำงานของเอนไซม์

3.4 การศึกษาความจำเพาะต่อซับสเตรท

นำ crude enzyme จากข้อ 2 มาทำปฏิกิริยากับซับสเตรทชนิดต่างๆ เพื่อทดสอบความจำเพาะต่อซับสเตรท ได้แก่ 1% CMC เพื่อทดสอบเซลลูเลส 1% xylose ทดสอบไซแลนเนส 1% locuse bean gum (LBG) และ 1% arabic gum ทดสอบแมนแนนส โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดการทำงานของเอนไซม์

3.5 การศึกษาผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเซลลูเลส ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) (Kqueen *et al.*, 1999)

3.5.1 นำสารละลายที่ได้จากการบ่มเอนไซม์กับซับสเตรท ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบน stationary phase ซึ่งเป็น silica gel โดยใช้หลอด capillary มี glucose และ cellobiose เป็นน้ำตาลมาตรฐาน

3.5.2 นำแผ่น silica gel แฉใน chamber ที่มี mobile phase ซึ่งเป็นสารผสมระหว่าง butanol : 2-propanol : H₂O : acetic acid (7:5:4:2)

3.5.3 เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่จนถึง solvent front (15 เซนติเมตร) นำออกมาเป่าด้วย hair dryer จนแห้ง

3.5.4 นำแผ่น silica gel ไปพ่นด้วย developing agent (*p*-anisaldehyde : sulfuric acid : ethanol อัตราส่วน 1:1:18)

3.5.5 นำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที สังเกตสีที่เกิดขึ้น