

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส

1.1 เก็บตัวอย่างดินตามแหล่งต่างๆ เช่น ดินจากถุงเพาะเห็ด ดินบริเวณที่มีการทับถมของเปลือกกุ้ง และดินจากน้ำพุร้อน และ อาหารเช่น น้ำพริกเผา กะปิ เป็นต้น

1.2 นำแต่ละตัวอย่างมาทำการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ (enrich) ในอาหาร enrichment (ภาคผนวก ก) โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 ชุดการทดลองที่มีสับสเตรทแตกต่างกันคือ 10% colloidal chitin (ภาคผนวก ค) 10% เปลือกกุ้งบด และ 1% เปลือกกุ้งบด ในอาหาร enrichment 25 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($26-28^{\circ}\text{C}$) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน

1.3 นำอาหาร enrichment ที่มีดินตัวอย่างจากข้อ 1.2 มาทำเจือจาง 1 เท่าด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อ แล้วนำ 0.1 ml ของสารละลายดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร chitin agar (ภาคผนวก ก) โดยวิธี spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิห้อง

1.4 แยกเชื้อราไอโซเลทต่างๆ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Malt extract Yeast extract Glucose agar (MYG) (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บไว้เป็น stock culture ไอโซเลทละ 2 หลอด

2. การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส

2.1 นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 1 ทั้งสิ้นจำนวน 114 ไอโซเลท มาวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MYG ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

2.2 ใช้ cork boreor เบอร์ 2 เจาะชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย จำนวน 7 ชิ้นใส่ลงในอาหาร Enzyme Production Medium (EPM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 25 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

2.3 เก็บตัวอย่างโดยนำมาเหวี่ยงแยก (centrifuge) ด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (High speed centrifuge, Lab-Line, model no. 3527/3527-1 USA) ที่ 6,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็น crude enzyme ไปตรวจวัด enzyme activity และวัดปริมาณโปรตีนเพื่อหาค่า specific activity

2.4 เลือกเชื้อรา 5 ไอโซเลทที่มี enzyme activity สูงสุดมาเพาะเลี้ยงโดยวิธีการหมักในสภาพของแข็ง (Solid State Fermentation) โดยใช้เชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension 28.6% 10 ml ใส่ลงในอาหารพื้นฐาน (Basal medium) (ภาคผนวก ก) 9 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ที่มีเปลือกกุ้งบดและข้าวโพดหมักเป็นสับสเตรท โดยมีอัตราส่วนเปลือกกุ้งบด ต่อข้าวโพดหมัก เท่ากับ 5:1 ปริมาณรวมของสับสเตรทเท่ากับ 6 g บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($26-28^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 7 วัน

2.5 สกัดเอนไซม์โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 12 ml (2 เท่าของปริมาตรสับสเตรท) คนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 10–12°C โดยตั้งภาชนะในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน กรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น แล้วเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็น crude enzyme ไปตรวจวัด enzyme activity และ specific activity

การหาค่า enzyme activity และ specific activity

การหาค่า enzyme activity วัดได้จาก N-acetylglucosamine ที่ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทโดยวิธี DNS method (Miller, 1959) และใช้ N-acetylglucosamine ในการทำกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ง) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย

Enzyme control ประกอบด้วย crude enzyme 500 μ l ผสมกับ acetate buffer (pH 5.0) (ภาคผนวก ข) 1,000 μ l

Substrate control ประกอบด้วย substrate 1,000 μ l ผสมกับ acetate buffer (pH 5.0) (ภาคผนวก ข) 500 μ l

Enzyme substrate ประกอบด้วย crude enzyme 500 μ l ผสมกับ substrate 1,000 μ l โดย substrate เตรียมจาก colloidal chitin 1 g ใน acetate buffer (pH 5.0) 4 ml

2. นำ reaction mixture ไปปั่นพร้อมเขย่าใน magnetic shaking water bath (Varimag type E Germany) ความเร็ว 600 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

3. เติมน้ำ DNS reagent (ภาคผนวก ข) 3 ml ลงในแต่ละหลอด

4. ปิดหลอดด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที

5. เติมน้ำ 40% sodium potassium tartrate 1 ml แล้วทำให้เย็นทันที

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu UV 2000 Japan) โดยใช้ acetate buffer เป็น blank

หน่วยการทำงานของเอนไซม์ (unit of enzyme)

กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการปลดปล่อย N-acetylglucosamine 1 μ mol ในเวลา 1 นาที

การหาค่า specific activity ทำได้จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี modified Lowry's method (Lowry, 1951) โดยนำ crude enzyme จากข้อ 2.3 และ 2.5 ปริมาตร 0.3 ml ผสมกับสารละลาย reagent C 3 ml (ภาคผนวก ข) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมน้ำสารละลาย Folin reagent (ภาคผนวก ข) 0.3 ml ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ 750 nm เทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนเอนไซม์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (ภาคผนวก ง) เพื่อนำไปคำนวณหาค่า specific activity (ภาคผนวก จ)

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13

3.1 ชนิดของเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์โคติเนส

เตรียมเป็นชิ้นวัน : เพาะเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในอาหารแข็ง MYG ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ใช้ cock boreor เบอร์ 2 เจาะชิ้นวันบริเวณปลายเส้นใยจำนวน 7 ชิ้นใส่ลงในอาหารพื้นฐาน 9 ml pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 ปริมาณความชื้น 60 % อัตราส่วนสับสเตรท เปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดหมักเท่ากับ 5:1(w/w) โดยมีน้ำหนักรวมของสับสเตรท 6 g บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สกัดเอนไซม์แล้วนำไปตรวจวัด enzyme activity และ specific activity

เตรียมเป็น spore suspension : เพาะเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในอาหารแข็ง MYG ปริมาณ 25 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เติม 0.05% (v/v) tween 80 ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 25 ml ใช้หัวถ่ายเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วชุดเบาๆ ให้สปอร์กระจาย แล้วนับจำนวนสปอร์โดยใช้ heamacytometer ใช้ปิเปตขนาด 10 ml ดูด spore suspension ปริมาตร 10 ml (จำนวนสปอร์ 1×10^7 spore/ml คิดเป็น 28.6%) ใส่ลงในอาหารพื้นฐาน 9 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml pH 5 ปริมาณความชื้น 76% (ภาคผนวก จ) อัตราส่วนของ สับสเตรท เปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดหมัก เท่ากับ 5:1(w/w) โดยมีน้ำหนักรวมของสับสเตรท 6 g บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สกัดเอนไซม์แล้วนำไปตรวจวัด enzyme activity และ specific activity

3.2 ปริมาตร spore suspension ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนส

เตรียม spore suspension เช่นเดียวกับข้อ 3.1 โดยใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ใน ปริมาตรที่แตกต่างกัน คือ 0, 11.8, 21.0, 28.6, 34.7 และ 40% (0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ml ตาม ลำดับ) ปริมาณอาหารพื้นฐาน 9 ml pH 5 อัตราส่วนเปลือกกุ้งบดต่อข้าวโพดหมักเท่ากับ 5:1 (w/w) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สกัดเอนไซม์แล้วนำไปหาค่า enzyme activity และ specific activity

3.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนส

เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในอาหารพื้นฐาน 9 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ใช้ อัตราส่วนเปลือกกุ้งบด ต่อข้าวโพดหมักเท่ากับ 5:1 (w/w) pH 5 ใช้เชื้อตั้งต้นในรูปของ

spore suspension 21% (4 ml) ปั่นเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เก็บ crude enzyme เพื่อนำมาหาค่า enzyme activity และ specific activity ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่างๆคือ 0,1,3,5,7,9,11 และ 13 วัน

3.4 อัตราส่วนสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนส

3.4.1 เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในอาหารพื้นฐานเช่นเดียวกับข้อ 3.3 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 11 วันโดยที่ใช้ข้าวโพดหมักคงที่ที่ 1 g และปริมาณเปลือกกุ้งบดที่แตกต่างกันคือ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 g เก็บ crude enzyme เพื่อนำไปหาค่า enzyme activity และ specific activity

3.4.2 เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในอาหารพื้นฐานเช่นเดียวกับข้อ 3.3 โดยใช้ อัตราส่วนระหว่างเปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดหมัก เท่ากับ 3:0, 3:1, 3:2, 3:3, 3:4, 3:5 และ 3:6 (w/w) เก็บ crude enzyme เพื่อนำไปหาค่า enzyme activity และ specific activity

3.5 ปริมาตรอาหารพื้นฐานต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนส

เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในอาหารพื้นฐานเช่นเดียวกับข้อ 3.4 ใช้อัตราส่วนสับสเตรทระหว่างเปลือกกุ้งบดต่อข้าวโพดหมัก เท่ากับ 1:1 (w/w) น้ำหนักรวมสับสเตรท 6 g โดยมี ปริมาตรอาหารพื้นฐานแตกต่างกันคือ 0,1,3,5,7 และ 9 ml ปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 11 วัน เก็บ crude enzyme เพื่อนำไปหาค่า enzyme activity และ specific activity

3.6 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตโคติเนส

เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยใช้ spore suspension 30.8% (4 ml) ปริมาตรอาหารพื้นฐาน 3 ml pH 5 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml อัตราส่วนเปลือกกุ้งบดต่อข้าวโพดหมัก เท่ากับ 1:1 (w/w) น้ำหนักรวมสับสเตรท 6 g ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ 0.5% (w/v) peptone, soy bean, urea, yeast extract และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

เตรียมชุดควบคุมตามสูตรอาหาร basal medium ภาควนวก ก.

เตรียมชุดการทดลอง fermentation medium จาก basal medium (ภาควนวก ก) โดยเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.1% และ urea 1.1%

เตรียมชุดการทดลองที่มี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนจาก basal medium โดยเติม peptone 0.5%

เตรียมชุดการทดลองที่มี soy bean เป็นแหล่งไนโตรเจนจาก basal medium โดยเติม soy bean 0.5%

เตรียมชุดการทดลองที่มี urea เป็นแหล่งไนโตรเจนจาก basal medium โดยเติม urea 0.5%

เตรียมชุดการทดลองที่มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนจาก basal medium โดยเติม yeast extract 0.5%

เตรียมชุดการทดลองที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนจาก basal medium โดยเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%

ทำการสกัดและเก็บ crude enzyme เพื่อนำไปหาค่า enzyme activity และ specific activity

3.7 ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในอาหารพื้นฐานเหมือนข้อ 3.6 ที่มีปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แตกต่างกันคือ % (w/v) 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 11 วัน จากนั้นนำไปสกัดและเก็บ crude enzyme เพื่อหาค่า enzyme activity และ specific activity

3.8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในอาหารพื้นฐาน 3 ml spore suspension 30.8% (4 ml) ที่มี 0.1% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆคือ อุณหภูมิห้อง ($26-28^\circ\text{C}$), 37°C และ 45°C เป็นเวลา 11 วัน นำ crude enzyme ไปหาค่า enzyme activity และ specific activity

3.9 pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยใช้เชื้อตั้งต้นแบบ spore suspension 30.8% (4 ml) ปริมาตรอาหารพื้นฐาน 3 ml ที่มีอัตราส่วนสับสเตรท เปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดหมัก 1:1 (น้ำหนักรวมสับสเตรท 6 g) มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 11 วัน ที่อุณหภูมิ 37°C โดยมี pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 นำ crude enzyme มาหาค่า enzyme activity และ specific activity

3.10 อิทธิพลของสับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในอาหารพื้นฐานปริมาตร 3 ml ที่มีสับสเตรทแตกต่างกันได้แก่เปลือกกุ้งบด 3 g เปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดหมัก 1:1 (น้ำหนักรวมสับสเตรท 6 g) เปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดสด 1:1 (น้ำหนักรวมสับสเตรท 6 g) และเปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดหมักหนึ่งฆ่าเชื้อ 1:1 (น้ำหนักรวมสับสเตรท 6 g) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 11 วัน pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 นำ crude enzyme มาหาค่า enzyme activity และ specific activity

4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ crude enzyme

4.1 เวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์กับสับสเตรท

ตรวจวัด enzyme activity ที่เวลาต่างๆโดยวัดการทำงานของเอนไซม์ตามข้อ 2 แต่เปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์เป็นนำไปบ่มที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที อุณหภูมิ 37°C นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 nm

4.2 อุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์

ตรวจวัด enzyme activity ที่อุณหภูมิต่างๆโดยวัดการทำงานของเอนไซม์ตามข้อ 2 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์เป็น 30, 37, 45, 55 และ 60°C เป็นเวลา 30 นาที

4.3 ผลของ pH

ตรวจวัด enzyme activity ที่ pH ต่างๆโดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามข้อ 2 แต่เปลี่ยนใช้บัฟเฟอร์ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ในการเตรียมสับสเตรท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

5. การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกับการเพาะเลี้ยงในสภาพของแข็ง

แบ่งการทดลองออกเป็นชุดต่างๆดังนี้ 1) เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในอาหารเหลว EPM 25 ml ที่มี 0.5% colloidal chitin 2) เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในอาหารเหลว EPM 25 ml ที่มี 0.5% เปลือกกุ้งบดเป็นสับสเตรท และ 3) เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในสภาพของแข็งที่มีเปลือกกุ้งบดและข้าวโพดหมัก (อัตราส่วน 1:1 โดยมีน้ำหนักรวมเท่ากับ 6 g) เพาะเลี้ยงเชื้อราในชุดการทดลองที่เป็นอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วันบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 rpm และเพาะเลี้ยงเชื้อราในชุดการทดลองที่เป็นการหมักในสภาพของแข็งที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 11 วัน นำ crude enzyme มาหาค่า enzyme activity และ specific activity

6. การบ่งชนิดของเชื้อราไอโซเลท S1-13

นำเชื้อราไอโซเลท S1-13 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Czapek's solution agar (ภาคผนวก ข) ที่มี 20% sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และ malt extract agar (ภาคผนวก ข) รวมทั้งนำมาเพาะเลี้ยงโดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์ (ภาคผนวก ฉ) เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอกของเชื้อรา เช่น สี ขนาด รูปร่างของเส้นใย และโคนิเดีย ทดสอบการเจริญของเชื้อราไอโซเลท S1-13 ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงบน

อาหารแข็ง MYG บ่มที่อุณหภูมิ 20, 26-28, 37, 45, และ 50 °C เป็นเวลา 7 วัน ทำการบ่งบอกชนิดแล้วจัดลำดับชั้นทางอนุกรมวิธานตามหนังสือ Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett, 1987) พร้อมทั้งเปรียบเทียบลักษณะต่างๆที่สังเกตได้กับหนังสือ The Genus Aspergillus (Raper and Fennell, 1965)