

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส

1.1 เก็บตัวอย่างดิน น้ำ อาหารหมัก และถูกแบ่งจากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 64 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อด้วยวิธีต่อไปนี้

(1) การแยกเชื้อจากตัวอย่างโดยตรง (direct isolation) โดยนำตัวอย่างมาทำเจือจาง 10 เท่า ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาทำการ spread plate บนจานอาหาร starch agar, nutrient agar (NA) และ potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 3-5 วัน แยกแบคทีเรีย แอคติโนมัยซิส และเชื้อราที่เจริญได้จนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำมาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 25°C เลือกไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ทั้ง 2 อุณหภูมิเป็นเชื้อจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant)

(2) การแยกโดยการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ (enrichment method) โดยนำตัวอย่างที่เป็นของแข็ง 1 กรัม หรือของเหลว 1 มิลลิลิตร มาผสมในอาหารข้าวกล้อง 10 % (ภาคผนวก ก) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 3-5 วัน เลือกตัวอย่างที่สามารถย่อยข้าวกล้องได้ นำมาทำ spread plate บนจานอาหาร NA และ PDA แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ (1)

1.2 นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จำนวน 192 ไอโซเลทมาทดสอบการย่อยแป้งโดยนำมาเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย และ 3-5 วัน สำหรับเชื้อราและแอคติโนมัยซิส หยดสารละลายไโอดีน เลือกเฉพาะไอโซเลทที่ให่วงใสรอบโคโลนี เก็บไว้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากข้าวกล้อง

2.1 เตรียมเชื้อตั้งต้นของแต่ละไอโซเลทที่แยกได้ทั้งหมด 145 ไอโซเลท ดังนี้

ก. นำเชื้อราหรือแอคติโนมัยซิส มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร starch agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 5 วัน เติมสารละลาย 0.1% peptone ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้หว่านถ่ายเชื้อชุดสปอร์และเส้นใยบนอาหารขึ้นมา

ข. นำแบคทีเรียมา streak บนอาหาร starch agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในสารละลาย 0.1% peptone ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความขุ่นเท่ากับสารละลาย McFarland NO. 0.5 (ภาคผนวก ค)

2.2 ปิเปิดเชื้อตั้งต้นปริมาณ 500 ไมโครลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารข้าวกล้อง 10 % อยู่ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28-30°C) เป็นเวลา 3 วัน

2.3 นำข้าวที่ผ่านการย่อยแล้วมากรองด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น เพื่อแยกตะกอนของข้าวที่ไม่ถูกย่อยของเหลวที่ได้เก็บไว้ใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป นำตะกอนข้าวที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักของข้าวหลังอบแห้งแล้ว นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ข้าวที่ถูกย่อยโดยเทียบจากน้ำหนักข้าวเริ่มต้นก่อนการย่อย (ภาคผนวก จ)

2.4 นำของเหลวที่ได้จากข้อ 2.3 ไปเหวี่ยงแยก (centrifuge) ด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกความเร็วสูง (High speed centrifuge, Lab-Line, model no.3527/3527-1 USA) ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ซึ่งเป็น crude enzyme ไปตรวจวัด amylase activity และ specific activity ต่อไป

การหาค่า amylase activity และ specific activity

การหาค่า amylase activity วัดได้จากน้ำตาลมอลโตสที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทโดยวิธี DNS (Miller, 1959) และใช้น้ำตาลมอลโตสในการทำกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย

Enzyme control ประกอบด้วย crude enzyme 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.2 M phosphate buffer pH 7.0 (ภาคผนวก ข) 1,000 ไมโครลิตร

Substrate control ประกอบด้วย substrate 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.2 M phosphate buffer pH 7.0 1,000 ไมโครลิตร

Enzyme substrate ประกอบด้วย crude enzyme 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับ substrate 1,000 ไมโครลิตร

โดยใช้ 2% soluble starch เป็น substrate (ภาคผนวก ข)

2. นำ reaction mixture ไปบ่มพร้อมเขย่าใน magnetic shaking water bath (Varimag type E Germany) ความเร็ว 600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที

3. เติม DNS reagent (ภาคผนวก ข) 3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด

4. ปิดหลอดด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที
5. เติม 40% sodium potassium tartrate 1 มิลลิลิตร แล้วทำให้เย็น
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu UV 2000 Japan) โดยใช้ 0.2 M phosphate buffer pH 7 เป็น blank

หน่วยการทำงานของเอนไซม์ (unit of enzyme)

กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลมอลโตส 1 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิ 40 °C ในเวลา 1 นาที

การหาค่า **specific activity** หาได้จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตาม modified Lowry's method (Lowry, 1951) โดยนำ crude enzyme ที่ได้จากข้อ 2.4 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย reagent C (ภาคผนวก ข) 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลาย Folin phenol reagent (ภาคผนวก ข) 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนเอนไซม์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (ภาคผนวก ค) เพื่อนำไปคำนวณหาค่า specific activity (ภาคผนวก ง)

3. การบ่งชนิดของเชื้อแบคทีเรียไอโซลท SB 29

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยทำการย้อมแกรม ย้อมสปอร์เพื่อดูลักษณะสปอร์ของเชื้อ นำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ เทียบผลที่ได้กับคู่มือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Holt *et al.*, 1994)

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยข้าวกล้องและผลิตเอนไซม์อะไมเลสของแบคทีเรีย SB 29 ดังนี้

4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยข้าวกล้องและผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เตรียมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรีย SB 29 โดยเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งลงในอาหารเหลว starch medium เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อตั้งต้น 500 ไมโครลิตรลงในอาหารข้าวกล้อง 10% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20°C, อุณหภูมิห้อง (28±2°C), 37°C, 45°C และ 55°C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง หาเปอร์เซ็นต์การย่อยเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.3 วัด

ปริมาณน้ำตาลที่ได้โดยใช้ refractometer (Bellingham & Stanley Ltd.) นำ crude enzyme ไปตรวจวัด amylase activity และ specific activity

4.2 pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการย่อยข้าวกล้องและผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เตรียมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรีย SB 29 เช่นเดียวกับข้อ 4.1 ปีเปิดเชื้อตั้งต้น 500 ไมโครลิตร ลงในอาหารข้าวกล้อง 10% ที่มีการปรับ pH ของอาหารเป็น 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 โดยใช้กรดแลคติก 10% และ 0.1 N NaOH ในการปรับ pH นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง หาเปอร์เซ็นต์การย่อย วัดปริมาณน้ำตาลที่ได้โดยใช้ refractometer นำ crude enzyme ไปตรวจวัด amylase activity และ specific activity

4.3 อัตราส่วนของอาหารข้าวกล้องที่เหมาะสมต่อการย่อยและการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เตรียมเชื้อตั้งต้นเช่นเดียวกับข้อ 4.1 ปีเปิดเชื้อตั้งต้น 500 ไมโครลิตรลงในอาหารข้าวกล้อง 5%, 10%, 15%, 20% และ 30% ที่มีการปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ pH ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง หาเปอร์เซ็นต์การย่อย วัดปริมาณน้ำตาลที่ได้โดยใช้ refractometer นำ crude enzyme ไปตรวจวัด amylase activity และ specific activity

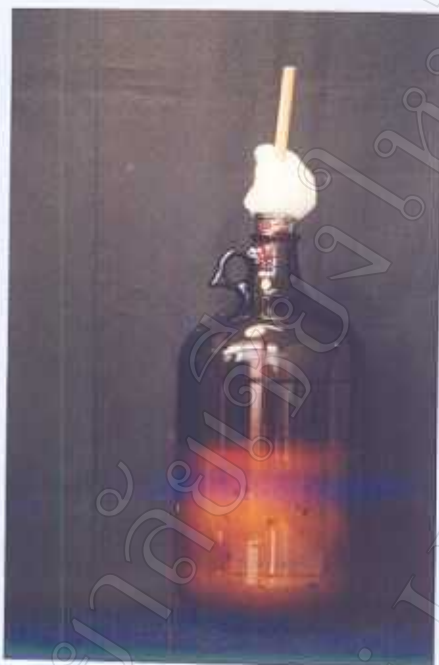
4.4 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยข้าวกล้องและผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เตรียมเชื้อตั้งต้นเช่นเดียวกับข้อ 4.1 ปีเปิดเชื้อตั้งต้น 500 ไมโครลิตร ลงในอาหารข้าวกล้อง ที่มีอัตราส่วนตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.3 ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้ได้ pH เท่ากับที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง หาเปอร์เซ็นต์การย่อย วัดปริมาณน้ำตาลที่ได้โดยใช้ refractometer นำ crude enzyme ไปตรวจวัด amylase activity และ specific activity

5. ศึกษาอัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย SB 29

เตรียมอาหารข้าวกล้อง 15% ที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 5.0 ปริมาตร 2 ลิตรในขวดสีชาปากแคบขนาด 4 ลิตร อุดปากขวดด้วยจุกสำลีที่มีไม้วีสำหรับกวนอาหาร (ภาพ 3) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอแล้วทิ้งไว้ให้เย็น เตรียมเชื้อตั้งต้นเช่นเดียวกับข้อ 4.1 ปีเปิดเชื้อตั้งต้นปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารข้าวกล้องที่เตรียมไว้ เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง (การเก็บต้องทำให้ปลอดเชื้อทุกครั้ง) โดยแต่ละครั้งที่เก็บตัวอย่างจะนำมาทำ pour plate เพื่อติดตามอัตราการเจริญของเชื้อ

วัดปริมาณน้ำตาลที่ได้โดยใช้ refractometer จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง เพื่อเก็บ crude enzyme นำมาตรวจวัดค่า amylase activity และ specific activity



ภาพ 3 การเตรียมอาหารในขวดสี่ขาปากแคบที่มีการใช้ไม้สำหรับกวนเพื่อให้อากาศ

6. การหมักแอลกอฮอล์โดยแบคทีเรีย SB 29 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5094

6.1 เตรียมอาหารข้าวกล้อง 15% ที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 5.0 ปริมาตร 2 ลิตรในขวดปากแคบ ขนาด 4 ลิตร ที่ปิดด้วยสำลีพันปลายไม้เพื่อกวนให้อากาศ โดยแบ่งออกเป็น 3 ชุด

ชุดที่ 1 หลังจากนำไปอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพาะเชื้อแบคทีเรีย SB 29 อายุ 24 ชั่วโมง ที่เตรียมในอาหาร starch medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตร หมักทิ้งไว้ 5 วัน โดยไม่เขย่า หมั่นกวนให้อากาศ จากนั้นจึงเพาะเชื้อยีสต์ *Sacch. cerevisiae* TISTR 5094 อายุ 24 ชั่วโมงที่เตรียมในอาหาร Yeast Malt Extract Broth (YM) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วย air lock หมักทิ้งไว้จนกว่าจะสิ้นสุดกระบวนการ สังเกตจากการเกิดก๊าซฟูขึ้นมาที่ air lock

ชุดที่ 2 หลังจากนำไปอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพาะเชื้อแบคทีเรีย SB 29 อายุ 24 ชั่วโมงที่เตรียมในอาหาร starch medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตรและเชื้อ *Sacch. cerevisiae* TISTR 5094 อายุ 24 ชั่วโมงที่เตรียมในอาหาร YM ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยจุกสำลีพันปลายไม้เพื่อกวนให้อากาศ 5 วัน จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น air lock หมักทิ้งไว้จนกว่าจะสิ้นสุดกระบวนการ สังเกตจากการเกิดก๊าซฟูขึ้นมาที่ air lock

ชุดที่ 3 หลังจากนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพาะเชื้อแบคทีเรีย SB 29 อายุ 24 ชั่วโมงที่เตรียมในอาหาร starch medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตร หมักทิ้งไว้ 5 วันโดยไม่เขย่า หมั่นกวนให้อากาศ จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกตะกอนออก นำเฉพาะส่วนใสไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วจึงเพาะเชื้อ *Sacch. cerevisiae* TISTR 5094 อายุ 24 ชั่วโมงที่เตรียมในอาหาร YM ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วย air lock หมักทิ้งไว้จนกว่าจะสิ้นสุดกระบวนการ สังเกตจากการเกิดก๊าซพุ่งขึ้นมาจาก air lock

6.2 คูลเอาเฉพาะส่วนใสหยุดปฏิกิริยาด้วยสาร potassium metabisulphite 200 ppm นำไปวัดปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ Ebulliometer

6.3 เตรียมอาหารข้าวขาวโดยวิธีเดียวกับการเตรียมอาหารข้าวกล้อง แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดและทำการหมักเช่นเดียวกัน

6.4 เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักโดยใช้ข้าวกล้อง และข้าวขาว โดยเปรียบเทียบสี ความใส กลิ่น และปริมาณแอลกอฮอล์