บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. Autoclave: SS-320, Tomy, Seiko, Japan
2. Autopipette: Acuboy,TECNUMARA, Swiss
3. Erlenmeyer flask: PYREX, USA
4. Incubator shaker: Innova™ 4330, New Brunswick scientific co., inc., New Jersey, USA
5. Laminar flow: Holten lamin Air, Allerod, Denmark
6. Micropipette: Model P200, P1000, P5000, Gilson, France
7. Oven: Memmert 854, Memmert, Schwawach, Germany
8. pH meter: MP220, Mettler Toledo Ltd., Halstead, England
9. Spectrophotometer: Spectronic 21, Milton Rag Ltd., USA
10. Volumetric flask: 10, 50, 250, 500, 1000 ml, SCHOTT DURAN, Germany
11. Vortex mixer: Vortex-2 Gene G-560E, Scientific industries Inc., New York, USA

3.1.2 สารเคมี

1. Boric acid (Fisher Scientific)
2. Calcium chloride (Ajex Finechem)
3. Potassium di-hydrogen phosphate (Carloerba Co., Ltd.)
4. 3,5- dinitrosalicylic acid (Fluka Chemical)
5. Di-potassium hydrogen phosphate (Ajex Finechem)
6. Di-sodium hydrogen phosphate (Merck KGaA)
7. Folin-ciocalteu's Reagent (Carloerba Co., Ltd.)
8. Glucose (Ajex Finechem)
9. Magnesium sulfate (Carloerba Co., Ltd.)
10. Manganese sulfate (Carloerba Co., Ltd.)
11. Phenol (Merck KGaA)
12. Potassium sodiumtartate (Ajex Finechem)
13. Sodium chloride (Ajex Finechem)
14. Sodium carbonate (Merck KGaA)
15. Sodium di-hydrogen phosphate (Carloerba Co., Ltd.)

16. Sodium hydroxide (Carloerba Co., Ltd.)
17. Sodium nitrate (Carloerba Co., Ltd.)
18. Sulfuric acid (Merck KGaA)
19. Trichloroacetic acid (Carloerba Co., Ltd.)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Agar technical (Difco Laboratories)
2. Bacto™ peptone (Difco Laboratories)
3. Beef extract (Difco Laboratories)
4. Birch wood xylan (Sigma Co., Ltd.)
5. D-mannitol (Ajex Finechem)
6. L-Tryrosine (Sigma Co., Ltd.)
7. Nutrient Agar (Difco Laboratories)
8. Polymyxin B sulfate (Fluka Chemical)
9. Phenol red (Fisher Scientific)
10. Tryptic Soy Broth (Merck KGaA)

3.2 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

เลี้ยง *Bacillus subtilis* 405 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม หรือจนกว่าจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตเต็มที่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บเป็น Stock culture ที่ 4 °C ถ้าไม่ใช้ทันที

3.3 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดลอง

เขี่ย *Bacillus subtilis* 405 ที่เจริญบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม หรือจนกว่าจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตเต็มที่ ลงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) จำนวน 50 ml ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ 37 °C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 องค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 กากถั่วเหลืองสูตร 1 : SBM-F1 (ดัดแปลงจาก Han-Seung Joo และ Chun-Soon Chang, 2004)

กากถั่วเหลือง	15	กรัมต่อลิตร
แป้งสาลี	1	กรัมต่อลิตร
นมผง	4	กรัมต่อลิตร
ซูโครส	4	กรัมต่อลิตร

K_2HPO_4	1	กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4	1	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	0.05	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.2 กากถั่วเหลืองสูตร 2 : SBM-F2 (ดัดแปลงจาก Han-Seung Joo และ Chun-Soon Chang, 2004)

กากถั่วเหลือง	15	กรัมต่อลิตร
แป้งสาลี	1	กรัมต่อลิตร
นมผง	4	กรัมต่อลิตร
ซูโครส	4	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
ปลาป่น	4	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ก่อน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5 วิธีการวิเคราะห์

3.5.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Chaplin, 1986)

โดยวิธี Dinitrosalicylic acidซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. ปิเปตสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย DNS 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที
3. หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำแข็ง
4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร อ่านค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้น้ำตาลแลคโตส ความเข้มข้น 0 – 3 กรัมต่อลิตร เป็นมาตรฐาน

3.5.2 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของอัลคาไลน์โปรติเอส

โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Anson (1938) ซึ่งรายละเอียด การวิเคราะห์ดังนี้

กรณีสารตัวอย่าง

1. ปิเปตสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่เหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลาย Casein 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 10 นาที
3. เติมสารละลาย Tricholoacetic acid 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 °Cเป็นเวลา 10 นาที
4. นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,800 rpm เป็นเวลา 5 นาที
5. ปิเปตสารละลายใสมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
6. เติมสารละลาย Sodium carbonate 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
7. เติมสารละลาย Folin 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
8. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร อ่านค่าความเข้มข้น ของปริมาณผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากการย่อยสลายเทียบ จากกราฟมาตรฐานสารละลาย Tyrosine ที่ความเข้มข้น 0 - 60 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร
10. คำนวณหาค่ากิจกรรมของอัลคาไลน์โปรติเอส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

กรณี control

1. ปิเปตสารตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย Tricholoacetic acid 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา
3. เติมสารละลาย Casein 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 10 นาที
4. นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,800 rpm เป็นเวลา 5 นาที
5. ปิเปตสารละลายใสมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง และทำการทดลองเช่นเดียวกับในกรณีสารตัวอย่างตามขั้นตอนที่ 6-10

นิยามของกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรติเอส : 1 ยูนิต (Unit) ของกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรติเอส คือ ปริมาณเอ็นไซม์ที่สามารถย่อยสลาย Casein ได้เป็น Tyrosine 1 ไมโครกรัม ภายในเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 45 °C และ pH 9.0

3.6 วิธีการทดลอง

1. เลี้ยงในสภาพการหมักปกติสูตรอาหารกากถั่วเหลืองทั้งสองสูตร ศึกษาจำนวนเซลล์และปริมาณการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส

2. วิเคราะห์สูตรอาหารในปัจจัย ที่มีผลต่อจำนวนเซลล์และการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส และทำการทดสอบ (Screening) หาปัจจัยที่มีผลโดยใช้ Fractional Factorial Design

3. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสม (Optimization) โดยใช้ Full Factorial Design / Central Composite Design

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย