วิธีการทดลอง

1. ศึกษาการผลิต crude enzyme β–glucosidaseโดยจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการสกัดสีครามที่แยกเชื้อจากดินบริเวณเขื่อนจุฬาภรณ์

1.1 การคัดเลือกแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับการสกัดสีคราม ที่สร้างเอนไซม์ β – glucosidase สูงสุด โดยการประยุกต์จากวิธีของ Qaddri, S.M.H. et. al., 1980 ดังนี้

1.1.1 เตรียม Esculin buffer solution ประกอบด้วย ferric ammonium citrate 0.5 กรัม Esculin 5.0 กรัม NaCl 8.0 กรัม K_2HPO_4 0.4 กรัม KH_2PO_4 0.1 กรัม น้ำกลั่น 1000 มล. pH 5.6

1.1.2 ปิเปต Esculin buffer solution ลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อซึ่งวางใน petridish ให้ชุ่ม

1.1.3 เตรียมแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการสกัดสีครามจำนวน 50 ไอโซเลท(งามนิจ นนทโส 2551) โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลทใน TSB เป็นเวลา 24 ชม. นำมาเซ็นตริฟิ้วเพื่อเก็บเฉพาะเซลล์แบคทีเรีย แล้วนำไปแขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ MacFarland no. 3

1.1.4 ปิเปตซัสเพนชั่นของแต่ละไอโซเลทลงบนกระดาษกรองที่ชุบ Esculin buffer solution

1.1.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 30 นาที

1.1.6 นำไปอ่านผลโดยการนำไปฉายแสง UV เพื่อเลือกไอโซเลทที่สร้างเอนไซม์ β – glucosidase โดยเลือกไอโซเลทที่เปลี่ยนเป็นสีดำที่ชัดเจน

1.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ β – glucosidase โดยใช้กลูโคส หรือ cellobiose เป็นซับสเตรท

1.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในซับสเตรทต่างชนิดกัน

ก. เตรียม basal medium ซึ่งประกอบด้วย น้ำกลั่น 1000 มล. ($(NH_4)_2SO_4$ 4.0 กรัม K_2HPO_4 1.8 กรัม KH_2PO_4 0.6 กรัม $MgSO_4 .7H_2O$ 0.2 กรัม Salt solution 10.0 มล. pH 7.2 (Salt solution ประกอบด้วย $FeCl_3 . 6H_2O$ 0.6 กรัม $MnCl_2 . 4H_2O$ 0.6 กรัม $ZnCl_2$ 0.6 กรัม $CuSO_4 .2H_2O$ 0.6 กรัม $CaCl_2 . 2H_2O$ 0.6กรัม NaCl 0.6 กรัม น้ำกลั่น 1000 มล.)

ข. เตรียม cellubiose medium ประกอบด้วย cellobiose 0.5 % ใน basal medium เตรียมอาหาร glucose medium ประกอบด้วย glucose 0.5 % ใน basal medium และอาหาร indigo leave mince medium ประกอบด้วย ใบครามสดบด 2.5 % ใน basal medium

ค. เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย B6 ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 มาเพาะเลี้ยงใน Tryptic Soy Broth 24 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm , 15 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้ง นำไปปรับความขุ่น ที่ 540 nm เท่ากับ 1.57

ง. นำกล้าเชื้อแบคทีเรียไปเติมลงใน cellobiose medium, glucose medium และ indigo leave mince medium ในอัตรา 0.5 % –

จ. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เก็บตัวอย่างที่เวลา 24, 48, 96 ชม. นำไปวัดวัดค่า pH และนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วนำส่วน supernatant มาวิเคราะห์ค่าต่างๆดังนี้

1. ค่า β – glucosidase activity ใน cellobiose medium และglucose medium
2. ปริมาณ indigo blue ใน indigo leave mince medium

1.2.2 การตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ β – glucosidase

ก. เตรียม Standard curve ของสาร PNP (p - nitrophenol) ในความเข้มข้น 5,10, 15, 30, 35,40 µg/ml นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm นำไปสร้างกราฟมาตรฐาน

ข. เตรียมสารที่ใช้ในการตรวจวัด β – glucosidase activity

1. 0.02 M p-Nitrophenyl--D-glucopyranoside (PNPG) solution
2. 0.1 M Acetate buffer, pH 5.0
3. 0.2 M Na_2CO_3 solution

ค. การวัด β – glucosidase activityใน crude enzyme ในแต่ละซับสเตรทที่ช่วงเวลาต่างๆ

1. การเตรียม reagent mixture ประกอบด้วย Acetate buffer, pH 5.0 1.0 มล. และ PNPG solution 0.5 มล.

2. การเตรียม sample blank โดยนำ reagent mixture จากข้อ 2.3.1 มาผสมกับ Na_2CO_3 ในปริมาตร 2 มล. นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงเติม crude enzyme

3. การวัด β – glucosidase activity โดยการเติม crude enzyme ปริมาตร 0.5 มล. ใน reagent mixture ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.1 ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงเติม Na_2CO_3 ในปริมาณ 2 มล.

4. นำ sample blank และ sample crude enzyme ในแต่ละช่วงเวลาจากข้อ 2.3.3 ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 405 nm โดยใช้น้ำเป็น blank ในการปรับค่าให้เป็น 0

5. นำค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 405 nm ของ sample blank ไปลบออกจาก sample crude enzyme แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบความเข้มข้นของ p - nitrophenol จาก standard curve

6. คำนวนค่า β – glucosidase activity โดยเอนไซม์ 1 μunit หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อย p - nitrophenol ปริมาณ 1 μmol ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

1.3 การศึกษาการผลิต indigo blue ใน indigo leave mince medium

ตามวิธีของ Fanjul-Bolado, et al. 2005

1.3.1 เตรียม Standard curve ของสาร indigo carmine ในความเข้มข้น 5,10, 25, 50 μg/ml

ก. เตรียมสาร 2 N NaOH แล้วเติมสาร sodium dithionite กวนให้ละลาย จนกระทั่งสารละลายอิ่มตัว

ข. ปิเปตสาร indigo carmine แต่ละความเข้มข้นในปริมาตร 100 μl ผสมกับ sodium dithionite saturated in 2N NaOH ในปริมาตร 100 μl

ค. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยใช้ plate reader

ง. นำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐาน

1.3.2 ปิเปตตัวอย่าง indigo leave mince medium ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.1.ข ที่เวลาบ่มต่างๆ มาวัดปริมาณ indigo ดังเช่นในข้อ 1.3.1.ข และค. แล้วคำนวณค่าปริมาณ indigo blue โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2. ศึกษาการรีดิ้ว indigo blue ให้เป็น leuco indigo โดยใช้โดย indigo blue reducing bacteria

2.1 เตรียม Medium A ประกอบด้วย 1% glucose (w/v) 0.01 % indigo carmine และ Medium B ประกอบด้วย 0.5% glucose (w/v), 1% urea และตะกอนคราม 1 % ใน basal medium pH 7.2

2.2 เตรียม inoculums D6 (งามนิจ นนทโส 2551)เลี้ยงเชื้อใน Tryptone broth 24 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm , 15 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้ง นำไปปรับความขุ่น ที่ 540 nm เท่ากับ 1.57

2.3 เติม indigo reducing bacteria ไอโซเลท D6 ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2 ในอัตรา inoculum 0.5 % บ่มที่อุณหภูมิ 30°C

2.4 วัดค่า pH, Redox potential ที่เวลา 12, 24, 72 ชม.

3. ศึกษาวิธีการเก็บรักษาเนื้อคราม (indigo blue) ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเก็บและการใช้งาน

เก็บ indigo blueไว้ในรูปตะกอนคราม โดยการเติม $Ca(OH)_2$ pH 12.3 แล้วไปเขย่าอย่างแรงเพื่อเป็นการเติมอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้งไป นำตะกอนครามไปเก็บรักษา ดังนี้

3.1 เก็บในสภาพเดิมที่มีความชื้นประมาณ60-70% แล้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 10°C

3.2 ทำให้แห้งที่อุณภูมิห้อง ความชื้น 5-10% แล้วบดให้ละเอียดเป็นผง

4. ศึกษาวิธีการเก็บรักษา leuco indigo ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเก็บและการใช้งาน

เก็บไว้ในรูปของเหลว โดยการบรรจุให้เต็มขวดไม่มีช่อง นำไปเก็บดังนี้

4.1 เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 10°C

4.2 นำไปทำให้แห้งโดยการเครื่อง freeze dryer