

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. Fermentor: BioFlo 110, BioCommand Controller, New Brunswick Scientific Ltd., USA
2. ตู้อบแห้งควบคุมอุณหภูมิ (Hot air oven): Memmert 854, Memmert, Schwabach, Germany
3. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator): RIVACOLD, บริษัท ริวาคอลด์ เซอร์วิส จำกัด, ประเทศไทย
4. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker): Innova™ 4330, New Brunswick Scientific Ltd., USA
5. Instrument for Image analyzer technique :
 - Software: Olympus micro imaged DP70 for Windows Software, Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA
 - Microscope: Olympus BX51 series microscope and Olympus Automatic Exposure Photo micrographic System Model PM-10 AK, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan
 - Video Camera: Olympus DP70 Color Video Camera Model DXC-151AP, Sony Corporation, Japan
6. Filter papers: Qualitative 90 mm Dia. x 100 Circles, Whatman No. 1, Whatman International Ltd., Maidstone, England
7. Haemocytometer: Improved Neubauer deep 1/10 mm., Bright Line, BOECO, Germany
8. Laminar flow: Holten Lamin Air, Allerod, Denmark
9. Spectrophotometer: Spectronic21, Milton Rag Ltd., USA
10. Vacuum pump: GAST Manufacturing, USA
11. Vortex mixer: Vortex-2 Gene G-560E, Scientific Industries Inc., New York, USA

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4): Carlo Erba Reagenti Ltd., Lambadia, Italy
2. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4): Ajax Finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand
3. Tween 80: Ajax Finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand
4. Sodium chloride: Ajax Finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand
5. Lactose: Difco Ltd., Detroit, USA

6. Casein: Sigma chemical CO, Steinheim, Germany
7. Tricholoacetic acid: Merck KGaA, Darmstadt, Germany
8. Sodium carbonate (Na_2CO_3): Merck KGaA, Darmstadt, Germany
9. 3, 5- Dinitrosalicylic acid: Fluka Biochemika, Switzerland
10. Folin Reagent: Carlo Erba Reagenti Ltd., Lambadia, Italy
11. Glucose: Ajax Finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Malt extract powder: HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
2. Casitone: Becton, Dickinson and company, France
3. Agar technical: Difco Ltd., Detroit, USA
4. Peptone: Merck KGaA, Darmstadt, Germany
5. Defatted soybean: K.M.P. Biotech CO., Ltd, Thailand

3.4 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นเป็นสปอร์

เลี้ยงรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3087 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract agar (MEA) ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน จะได้ สปอร์ (conidiospore) สะสมสปอร์โดยใช้ 0.025% (v/v) tween 80 ใน normal saline ใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น ในการทดลองต่อไป

3.5 สภาพที่ใช้ในการทดลอง

เลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3087 ใน Fermenter รุ่น BioFlo 110 (New Brunswick Scientific) ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Complex medium ประกอบด้วย 1% defatted soybean, 0.5% lactose, 0.5% KH_2PO_4 และ 0.1% casitone ปริมาตรอาหาร 1500 มิลลิลิตร จำนวนสปอร์เริ่มต้น 1×10^8 สปอร์/ 50 มิลลิลิตรของอาหาร อัตราการให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 30 °C pH เริ่มต้น 5.00 และไม่ควบคุม pH ระหว่างการหมักตลอดการทดลอง

3.6 การคำนวณหาจำนวนสปอร์จาก haemocytometer

จาก spore suspension ที่เตรียมได้ (3.4) นับโดยใช้ haemocytometer นำมาคำนวณหาจำนวน สปอร์ในสารละลายที่เตรียมได้

3.7 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.7.1 การเตรียม Malt extract agar (MEA)

Malt extract	20	กรัมต่อลิตร
Bacto TM peptone	1	กรัมต่อลิตร
Glucose	20	กรัมต่อลิตร
Agar	20	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดโดยการต้มเพื่อให้ส่วนผสมละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.7.2 อาหารสูตรพื้นฐาน (Complex medium)

Defatted soybean	10	กรัมต่อลิตร
Lectose	5	กรัมต่อลิตร
KH ₂ PO ₄	5	กรัมต่อลิตร
Casitone	1	กรัมต่อลิตร
pH เริ่มต้น 5.0		

3.7.3 การเตรียมสารละลาย Stock Tween 80 ความเข้มข้น 1% (v/v)

สารละลาย Tween 80	10	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

ทำการผสมสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันเก็บใส่ขวดไว้ใช้เป็น Stock ในการเตรียมสารละลาย Tween 80 ใน normal saline ความเข้มข้น 0.025% (v/v) เพื่อใช้ในการทำ spore suspension

3.7.4 การเตรียมสารละลาย Tween 80 in normal saline ความเข้มข้น 0.025% (v/v)

สารละลาย Tween 80 ความเข้มข้น 1% (v/v)	25	มิลลิลิตร
Sodium chloride	8	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

ทำการผสมสารทั้งหมดให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.8 วิธีการวิเคราะห์

3.8.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Chaplin, 1986)

โดยวิธี Dinitrosalicylic acid ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

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

3.8.2 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีนเอส

โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Anson (1938) ซึ่งมีรายละเอียด การวิเคราะห์ดังนี้

กรณีสารตัวอย่าง

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

กรณี control

1. ปิเปตสารตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมน้ำตาลละลาย Tricholoacetic acid 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา
3. เติมน้ำตาลละลาย Casein 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 10 นาที

4. นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,800 rpm เป็นเวลา 5 นาที
5. ปิเปตสารละลายไอโซมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง และทำการทดลองเช่นเดียวกับในกรณีสารตัวอย่างตามขั้นตอนที่ 6-10

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

3.8.3 ค่าการละลายของออกซิเจน

บันทึกค่าการละลายของออกซิเจนจาก Software BioCommand Controller ระหว่างการหมัก

3.9 วิธีการทดลอง

ในงานวิจัยเป็นการใช้การปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมัก เพื่อให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและต่อกระบวนการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสในราสายพันธุ์ปกติ คือ *A. oryzae* TISTR 3087 ซึ่งภายใต้เงื่อนไขสภาพบรรยากาศปกติ ราสายพันธุ์นี้ ผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้ ไม่สูงเท่ากับสายพันธุ์ที่มีการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีพันธุวิศวกรรม เช่น *A. oryzae* U1521 โดยการปรับสภาพบรรยากาศในถังหมักให้มีสัดส่วนของก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนร้อยละ 50 ต่อก๊าซไนโตรเจนร้อยละ 50 (ซึ่งเคยมีงานวิจัยแล้วว่า เป็นสัดส่วนที่ทำให้มีการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้สูงขึ้นในถังหมักที่ควบคุมสภาพบรรยากาศ-ชานนท์ สัตยารมณ, 2549) และศึกษาค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก ต่อการเปลี่ยนแปลง สันฐานวิทยาของรา โดยมีการทดลองดังต่อไปนี้

1. เลี้ยงในสภาพการหมักปกติ ในถังหมัก เพื่อศึกษาสภาพการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสปกติของราสายพันธุ์นี้ (ชุด control)
2. เลี้ยงในสภาพการหมักที่มีการปรับสภาพบรรยากาศในถังหมัก โดยการเปรียบเทียบการกวนที่อัตราการกวนต่ำ (200 rpm) และอัตราการกวนสูง (700 rpm) ระหว่างหัวเชื้อรูปแบบที่เป็นสปอร์และเพลเล็ท
3. ศึกษาสันฐานวิทยาของราที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก โดยใช้เทคนิค Imaged analysis