# บทที่ 3
# วิธีการทดลอง

## 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษา

**Nutrient Agar Slant**

| | |
|---|---|
| Beef Extract | 3 กรัม |
| Peptone | 5 กรัม |
| Bacto Agar | 15 กรัม |
| NaCl | 5 กรัม |

ละลายส่วนผสมของอาหารให้เข้ากันในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร บรรจุในหลอดทดลอง และนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดมาวางเอียงประมาณ 15 องศา ก่อนที่อาหารจะแข็งตัว รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อยังไม่นำมาใช้

### 1.2 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

**อาหารสูตรพื้นฐาน (Basal Medium)**

**สูตรที่ 1 ( MG Halpern, 1981)**

| | |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 1 กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.50 กรัม |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.01 กรัม |
| สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) | 20 กรัม |
| กลูโคส | 5 กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 ลิตร |

ละลายส่วนผสมของอาหารให้เข้ากันในน้ำกลั่นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สูตรที่ 2 (Sadanobu และ คณะ ,1975)

| | | |
|---|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 0.50 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | 0.50 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.20 | กรัม |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| $MnSO_4.7H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) | 20 | กรัม |
| กลูโคส | 5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

ละลายส่วนผสมของอาหารให้เข้ากันในน้ำกลั่นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Luria Broth**

| | | |
|---|---|---|
| Yeast Extract | 10 | กรัม |
| Bacto Peptone | 5 | กรัม |
| Bacto Agar | 15 | กรัม |
| NaCl | 10 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

ละลายส่วนผสมของอาหารให้เข้ากันในน้ำกลั่นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบขั้นปฐมภูมิ

**Skim Milk Stock Solution**

ชั่งนมผงขาดมันเนย (Skim Milk) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

**Skim Milk Agar Plate**

ชั่ง Bacto Agar 1.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติม Skim Milk Stock Solution 5 มิลลิลิตร และเติมยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลินความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้อุ่นก่อนนำไปเทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

**1.4 การเตรียมอาหารที่มีวัตถุดิบผสมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน**

วัตถุดิบที่ใช้ได้แก่ กากถั่วเหลือง และ กากเมล็ดทานตะวัน โดยเตรียมดังนี้

การย่อยสลายวัตถุดิบด้วยกรด โดยชั่งวัตถุดิบ 12 กรัม ใส่ในภาชนะที่ทนกรด เติมกรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล จำนวน 40 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 80 มิลลิลิตร นำไปกรองเอาเฉพาะส่วนน้ำใส นำไปปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 1 คืน เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอนำมาใช้

**2. การเตรียมสารละลาย**

**2.1 สารละลายสำหรับหาแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี**

**สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.5 และ 8.0**

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 53.65 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 27.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เป็น Stock Solution ผสมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ดังนี้

| pH | $NaH_2PO_4$ (ml) | $Na_2HPO_4$ (ml) |
|---|---|---|
| 7.5 | 80.0 | 420.0 |
| 8.0 | 26.5 | 473.5 |

เติมน้ำกลั่นลงในบัฟเฟอร์จนครบ 1 ลิตร

**สารละลายบัฟเฟอร์ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ pH 8.5 และ 9.0**

ทรีส (ไฮดรอกซีเมทธิล) อะมิโนมีเธน (Tris (Hydroxy-Methyl) Aminomethane) 12.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH ให้เป็น 8.5 และ 9.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

**สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 9.5,10.0 และ10.5**

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 21.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร และโซเดียม-ไบคาร์บอเนต 16.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บเป็น Stock Solution ผสมสารละลายของโซเดียมคาร์บอเนตและโซเดียมไบคาร์บอเนต ตามอัตราส่วนต่อไปนี้

| pH | $Na_2CO_3$ (ml) | $NaHCO_3$ (ml) |
|---|---|---|
| 9.5 | 65.0 | 185.0 |
| 10.0 | 137.0 | 112.5 |
| 10.5 | 202.5 | 47.5 |

เติมน้ำกลั่นลงในสารละลายบัฟเฟอร์จนครบ 1 ลิตร นำไปวัด pH

**สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 11.0**

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 10.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร

**สารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6**

ชั่งอิมมิดาโซล 6.808 กรัม ละลายในน้ำกลั่น1 ลิตรและปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.6

**สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ pH 10.5**

ชั่งเคซีนฮาร์มมาสเตน 0.5 กรัม ละลายในสารละลายคาร์บอเนตไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 คนจนเคซีนละลายหมด นำไปปรับ pH ให้เท่ากับ 10.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ เติมสารละลายบัฟเฟอร์จนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาในตู้เย็น

สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 10 เปอร์เซนต์

ชั่งกรดไตรคลอโรอะซีติก 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนจนกรดไตรคลอโรอะซีติก ละลายหมด บรรจุในขวดสีชา เก็บรักษาในตู้เย็นก่อนนำมาใช้

2.2 สารละลายสำหรับทำการกลายพันธุ์ด้วย NTG

การเตรียม Stock Solution ของ NTG

โดยการชั่งสาร NTG 0.001 กรัม ละลายในสารละลายทรีส (ไฮดรอกซีเมทริล) อะมิโนมีเธน-มาเลต บัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร

สารละลายทรีส (ไฮดรอกซีเมทริล) อะมิโนมีเธนมาเลตบัฟเฟอร์ 0.1โมลาร์ pH 8.0

ชั่งทรีส (ไฮดรอกซีเมทริล)-อะมิโนมีเธน 12.1กรัม ผสมกับกรดมาลิอิก 11.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นนำไปปรับ pH เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บบรรจุใส่ขวด

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์

ชั่งสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.3 สารละลายสำหรับหาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl (Leonard, 1987)

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซนต์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลายกรดบอริก 4 เปอร์เซนต์

ชั่งกรดบอริก 4 กรัม ละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนช่วยในการละลาย

สารละลายอินดิเคเตอร์

ชั่งเมธิลเรด 0.2 กรัม และเมธิลลีนบลู 0.1 กรัม ละลายในเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ 150 มิลลิลิตร

3. การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียระยะสั้น

เขี่ยเชื้อจาก Stock ลงบน Nutrient Agar (NA) Slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ประมาณ 12-16 ชั่วโมง ปิดจุกพันด้วยพาราฟิลม์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 2-3 เดือน

3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียระยะยาว

เลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุ Nutrient Broth ประมาณ 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วผสมกลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์ เทปิดทับผิวหน้า 1-2 เซนติเมตร ปิดจุกพันด้วยพาราฟิลม์เก็บไว้ที่-20 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 1 ปี

4. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย

4.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter Inoculum)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนี จาก NA-Slant 1-2 loop ลงในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ประมาณ 12-16 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.6

4.2 การเลี้ยงและการติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

ทำการถ่ายเชื้อโดยใช้ปิเปตที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้วดูดน้ำเลี้ยงจากข้อ4.1 จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลีห่อผ้าขาวบาง นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างไปวัดการเจริญของแบคทีเรีย โดยใช้ปิเปตที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นผสมสารละลายแขวนลอยให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ค่าที่วัดได้ไม่ควรเกิน 0.5 เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

## 5. การกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ด้วยสารซักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

### 5.1 การกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet Light)

5.1.1 เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 4.1 และ 4.2 เมื่อเชื้อเจริญถึงช่วงกลางของ Log Phase ใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ค่า 0.6 ซึ่งมีความหนาแน่นเซลล์ $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5.1.2 ปิเปตเซลล์แขวนลอย10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มี Magnetic Stirrer กวนตลอดเวลา

5.1.3 นำเซลล์แขวนลอยนำไปฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กำลังงาน 15 วัตต์ จำนวน 1 หลอด ระยะห่างจากแสง 20 เซนติเมตร โดยมีการกวนตลอดเวลา ที่ระยะเวลาในการฉายแสงต่างๆ กัน

5.1.4 กระจายเซลล์ 0.1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตบนอาหารวุ้นแข็งLB ที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อบ่มที่มีดอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

5.1.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) คำนวณเปอร์เซนต์การรอด

5.1.6 ตรวจหาโคโลนีที่เกิดการกลายพันธุ์เบื้องต้น โดยดูลักษณะ รูปร่าง ขนาด และสีของโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์เดิม

5.1.7 นำโคโลนีที่เจริญนำไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ ตามวิธีทดลองในข้อ 6

### 5.2 การกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ด้วยสารเคมี NTG ( N-Methyl-N′-Nitro-N -Nitrosoguanidine )

5.2.1 เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 4.1 และ 4.2 เมื่อเชื้อเจริญถึงช่วงกลางของ Log Phase เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ทำการกระจายอีกครั้งด้วยทรีส-กรดมาลิอิกบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ค่า 0.6 ซึ่งมีความหนาแน่นเซลล์ $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5.2.2 นำสารละลาย NTG ในทรีสกรดมาลิอิกบัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.0 เติมลงในสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นของ NTG เป็น 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5.2.3 นำเซลล์ที่ได้มาปั่นด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

5.2.4 กระจายเซลล์แขวนลอย 0.1 มิลลิลิตร ที่ได้ลงบนอาหารวุ้นแข็ง LB ที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง

5.2.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) คำนวณเปอร์เซนต์การรอด

5.2.6 ตรวจหาโคโลนีที่เกิดการกลายพันธุ์เบื้องต้น โดยดูลักษณะ รูปร่าง ขนาดและสีของโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์เดิม

5.2.7 นำโคโลนีที่เจริญ นำไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ ตามวิธีทดลองในข้อ 6

## 6. การคัดเลือก *Bacillus subtilis* ที่กลายพันธุ์

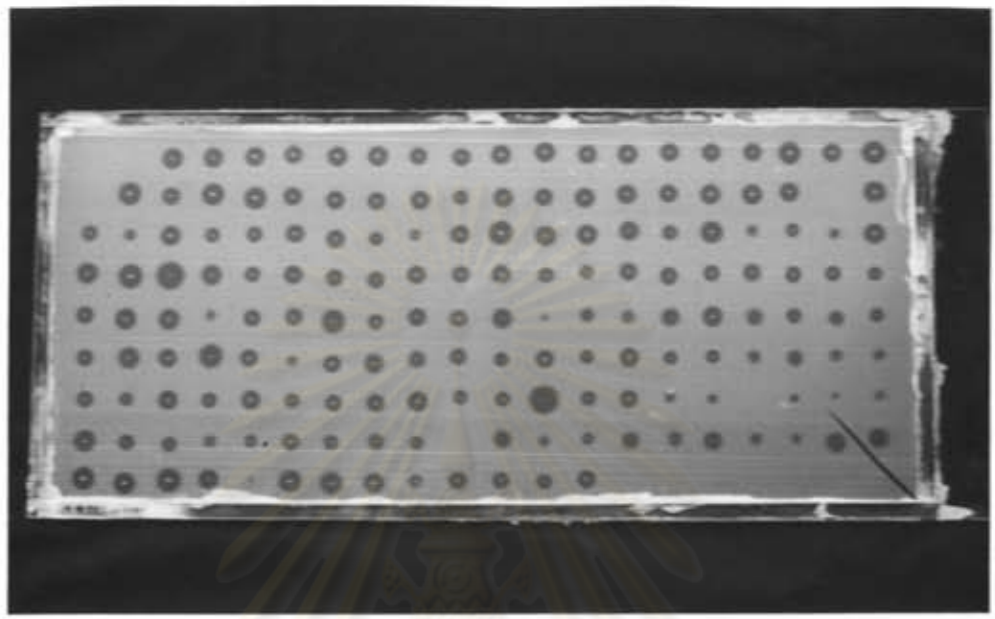
### 6.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (Primary Screening)

6.1.1 เทอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นชนิดแข็ง (Agar) ที่มีนมผงขาดมันเนย (Skim Milk) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ผสมยาปฏิชีวนะเตตร้าไซคลินความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในถาดกระจกขนาด 17.5X45X0.5 เซนติเมตร

6.1.2 เขี่ยโคโลนี *Bacillus subtilis* ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากข้อ 4 ด้วยไม้จิ้มฟันลงบนอาหารในข้อ 6.1.1 บรรจุลงในกล่องแสตนเลสที่มีฝาปิดขนาด 20X20X50 เซนติเมตร ที่ผ่านการนึ่งอบฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อที่ผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้

6.1.3 คัดเลือก *Bacillus subtilis* ที่กลายพันธุ์ และให้ค่าอัตราส่วนของความกว้างบริเวณใสรอบๆโคโลนีต่อความกว้างโคโลนีของเชื้อหรือเรียกว่า Potency Index (ภาคผนวก ) มากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น นำมาคัดเลือกต่อตามวิธีในข้อ 6.2 (รูปที่ 5)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูปที่ 5 แสดงความกว้างบริเวณใสรอบ ๆโคโลนี (Clear Zone)จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ ภายหลังการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง**

**6.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (Secondary Screening)**

**การวัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส**(ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Richardson และ Tewhaiti,1978)

เก็บตัวอย่างมาเหวี่ยงตกตะกอนแยกเซลล์ออกนำส่วนใสมาหาแอคติวิตีโดยบ่มตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ ในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ pH 10.5 จำนวน 0.9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อ่างน้ำอุ่นที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำขึ้นจากอ่างน้ำอุ่น และนำไปแช่ลงในอ่างน้ำเย็น หยุดปฏิกิริยาทันทีโดยเติมสารละลาย 10 เปอร์เซนต์ ของกรดไตรคลอโรอะซิติก 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์โดยเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์กับกราฟมาตรฐานไทโรซีนที่มีความเข้มข้น 0-140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก )

I 18938106

กำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์เท่ากับปริมาณของไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ที่ได้จากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์ที่สภาวะของการวัดแอคติวิตี ภายในเวลา 1 นาที

ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทุกตัวอย่างจะต้องทำหลอดควบคุมด้วยสำหรับเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างแท้จริง โดยทำการบ่มสารละลายเคซีนกับ 10 เปอร์เซนต์ ของกรดไตรคลอโรอะซิติก เป็นเวลา 20 นาทีก่อน จากนั้นจึงค่อยเติมบัฟเฟอร์และตัวอย่างลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเหวี่ยงตกตะกอนแยกส่วนน้ำใส นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์อย่างแท้จริงหาได้จากค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงจากหลอดควบคุม แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน

**7. การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl (Leonard , 1987)**

นำตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน 1-2 มิลลิลิตร เติมคะตาลิส 7 กรัม (โพตัสเซียมซัลเฟต 95 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม) และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปกลั่นด้วยเครื่อง Buchi โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซนต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร นำเอาขวดที่บรรจุกรดบอริก 4 เปอร์เซนต์ จำนวน 100 มิลลิลิตร ซึ่งเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด มารองรับสารละลายที่กลั่นได้ จนกระทั่งมีปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร หรือสีของสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีม่วง แล้วจึงนำไปไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ไตเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเขียวใส คำนวณหาปริมาณของไนโตรเจนจากสูตรข้างล่างนี้

$$\text{เปอร์เซนต์ไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times C \times 1.4}{V}$$

A= ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B= ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

C= ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

V= ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

1.4= มวลโมเลกุลของไนโตรเจนทำให้มีหน่วยเป็นกรัมเปอร์เซนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 8. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี (Lowry , 1959)

ใช้ตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้อีก 30 นาที เติมสารละลาย Phenol reagent นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## 9. การหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมในการเลี้ยง

ถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้นที่เตรียมตามข้อ 4.1 ลงในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 , สูตรที่ 2 ที่มีส่วนประกอบดังในข้อ 1.2 และอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบที่มีส่วนประกอบตามข้อ 1.3 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงใน flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาวัดการเจริญที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร และนำมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ตามวิธีข้อ 6.2 เปรียบเทียบและคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

## 10. การเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้นที่เตรียมตามข้อ 4.1 ลงในอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบดังมีส่วนประกอบตามข้อ 1.4 ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 3.5 ลิตร โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงจนครบ 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาวัดการเจริญที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร pH และวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส ตามวิธีการทดลองข้อ 6.2

## 11. การหา pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส

pH ที่ใช้ในการทดลองคือ 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5,10.0,10.5 และ 11.0 โดยเตรียมบัฟเฟอร์ดังนี้ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 และ 8.0 , ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ pH 8.5 และ 9.0, คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ pH 9.5,10.0,10.5 และ 11.0

การหา pH ที่เหมาะสมในการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสทั้งหมด ทำการบ่มตัวอย่างจำนวน 0.1 มล.กับ 0.5 เปอร์เซนต์ ของเคซีนจำนวน 1 มล. ที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิต่างๆ 25, 37, 45, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 10 เปอร์เซนต์ ของกรดไตรคลอโรอะซิติก 2 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีนที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ

## 12. การหา อุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส

อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองคือ 25, 37, 45, 60 และ 70 องศาเซลเซียส การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสทั้งหมดทำการบ่มตัวอย่างกับเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ ที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิต่างๆข้างต้น เป็นเวลา 20 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 10 เปอร์เซนต์ กรดไตรคลอโรอะซิติก 2 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐานของไทโรซีนที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ

## 13. การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาลักษณะเซลล์

### 13.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาลักษณะเซลล์ด้วย Transmission Electron Microscope (TEM) ( เวคิน นพนิตย์, 2524, 2527, 2529)

กล้องจุลทรรศน์ชนิดลำแสงผ่านตัวอย่าง Transmission Electron Microscope (TEM) เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน์ที่ใช้กันทั่วไป เพื่อศึกษาตัวอย่างชนิดบาง เตรียมโดยวิธีพิเศษเพื่อให้ลำแสงอิเล็กตรอน (Electron Beam) ผ่านทะลุได้ กล้องชนิดนี้ใช้ศึกษารายละเอียดองค์ประกอบภายในของตัวอย่าง เช่น ภายในเซลล์ ลักษณะของเยื่อบางหุ้มเซลล์ (Cell Membrane) ซึ่งได้ตัดไว้บางเป็นพิเศษ สามารถให้รายละเอียดสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดใดๆ ที่มีอยู่ในยุคปัจจุบัน ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้

1. แช่ตัวอย่าง (Pre-Fix) ใน 3 % Glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate Buffer pH 7.2 นาน 1 ชม. หรือข้ามคืนในตู้เย็น

2. ล้างด้วย Phosphate Buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

3. แช่ตัวอย่าง (Post-Fix)ใน 2 % $OsO_4$ ใน 0.1 M Phosphate Buffer pH 7.2 หรือในน้ำกลั่นนาน 1-2 ชม.

4. ดูดเอา $OsO_4$ ออก แล้วใส่ 35% Ethanol เพื่อล้างน้ำยาดอง $OsO_4$ และเริ่ม Dehydration ใช้เวลา 15 นาที

5. ขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (Dehydrate)ด้วย Ethanol หรือ Acetone ความเข้มข้น 70%, 95%, 100% (3 ครั้ง)และ Propylene Oxide (2 ครั้ง)ตามลำดับ ขั้นละ10-15 นาที

6. ใส่ตัวกลางสำหรับทำให้ตัวอย่างแข็งตัว เพื่อตัดทำ Block โดยใช้ Propylene Oxide + Epon Embedding Media 60 นาที

7. Polymerization ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

8. ติดตัวอย่างบนแผ่นตาข่าย (Grid) นำไปย้อมด้วย Lead Citrate หรือ Uranyl Acetate เพื่อเป็นการเพิ่ม Contrast ให้กับตัวอย่าง ล้างด้วยน้ำ ซับ Grid ให้แห้ง

9. นำไปส่องดูด้วย TEM

### 13.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาลักษณะเซลล์ด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) (เวคิน นพนิตย์, 2524, 2527, 2529)

กล้องจุลทรรศน์แบบสะแกน Scanning Electron Microscope (SEM) เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบที่ใช้กันทั่วไป เพื่อศึกษารายละเอียดของพื้นผิว(Surface)ของตัวอย่างที่ต้องการศึกษาและตรวจสอบ ลักษณะเป็นภาพ 3 มิติที่มีส่วนลึก กล้องชนิดนี้มีประโยชน์ในการศึกษาลักษณะภายนอกของตัวอย่าง เช่น ศึกษาและตรวจสอบ ลักษณะผิวนอกเนื้อเยื่อและเซลล์ หรือศึกษาหน้าตัดของโลหะและวัสดุทุกชนิดตามต้องการ กล้องชนิดนี้มีกำลังความสามารถในการเพิ่มกำลังขยาย และให้รายละเอียดมากกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบธรรดาที่ให้ภาพ 3 มิติ (Stereo Microscope) ได้หลายพันเท่า ตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาด้วย SEM จะต้องอยู่ในสภาพที่ปราศจากน้ำหรือความชื้นใดๆ และมีสภาพผิวที่นำไฟฟ้า การเตรียมตัวอย่างมีดังนี้

1. แช่ตัวอย่าง (Pre-Fix) ใน 2.5 % Glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate Buffer pH 7.2 นาน 1 ชม. หรือข้ามคืนในตู้เย็น

2. ล้างด้วย Phosphate Buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

3. แช่ตัวอย่าง (Post-Fix) ใน 1 % $OsO_4$ ใน 0.1 M Phosphate Buffer pH 7.2 หรือในน้ำกลั่นนาน 1-2 ชั่วโมง

4. ล้างด้วย Phosphate Buffer หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

5. ขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (Dehydrate)ด้วยEthanol หรือ Acetone ที่ความเข้มข้น 30%, 50%, 70%, 90%และ100% (2 ครั้ง)ตามลำดับ ขั้นตอนละ10-15 นาที

6. ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่องทำให้แห้ง (Critical Point Dryer)

7. ติดตัวอย่างบนฐานรองตัวอย่าง (Stub) ด้วยเทป 2 หน้า หรือกาว

8. นำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่องฉาบทอง(Ion Sputter)และส่องดูด้วย SEM

## 14. การเตรียมเอนไซม์ในรูปผงและทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ผงโดยเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ

### 14.1 การเตรียมเอนไซม์ในรูปผง

ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออก มาแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 70 เปอร์เซนต์ (472 กรัมต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) โดยค่อยๆ เติมทีละน้อย คนเบาๆตลอดเวลาจนแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมดแล้วจึงนำไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน เหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 และล้างตะกอนด้วยสารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1โมลาร์ pH 7.6 นำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจนแห้ง จากนั้นนำเอนไซม์ที่อบแห้งแล้วนำมาบดให้เป็นผง ชั่งน้ำหนักเอนไซม์ผงที่ได้

### 14.2 การทดสอบความสามารถในการเก็บเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เตรียมเอนไซม์ผงที่ได้จากการทดลองข้อ 14.1 แบ่งเอนไซม์ผงที่ได้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20, 4, 25, 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาหาแอคติวิตีเป็นระยะๆ เปรียบเทียบกับแอคติวิตีผงที่เตรียมได้ก่อนที่จะนำมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ หาค่าแอคติวิตีที่เหลือเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซนต์แอคติวิตีสัมพัทธ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย