บทที่ 2
วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องบันทึกการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Spectronic 20 บริษัท Baush Lomb, U.S.A.

เครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ (Bench top centrifuge) International Equipment, U.S.A.

เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated centrifuge) Beckman Model JA 14 บริษัท Beckman Instrument Inc., U.S.A.

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Hereaus, U.S.A.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (Shaking water bath) Gyrotary water bath shaker model G-76 New Brunswick Scientific Edison, N.J., U.S.A.
Heto lab Equipment บริษัท Heto lab Equipment, Denmark.

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) PHM 33 Autocal pH meter บริษัท Radiometer Copenhagen, Denmark.

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) Model HA-30 บริษัท Hirayama Manufacturing Coperation, Japan.

เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน Buchi 315 Distillation Unit และ Buchi 425 Digestor บริษัท Buchi Laboratory-Techniques Ltd., Switzerland.

ถังหมักขนาด 5 ลิตร model MD-300 และชุดควบคุมสภาวะ บริษัท L.E. Marubishi, Tokyo, Japan.

2.1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี (ชื่อทางการค้า)	บริษัทผู้ผลิต
กรด พารา-อะมิโนเบนโซอิก(PABA) (p-Aminobenzoic acid)	E. Merck, Germany.
กรด 1-อะมิโน-8-ไฮดรอกซีแนพธาลีน-3, 6-ไดซัลโฟนิก (1-Amino-8-hydroxynapthalene-3, 6-disulfonic acid, H-acid)	Fluka A.G., Bucks S.G., Switzerland.
กลูโคส (D(+)-Glucose monohydrate)	Reidel-dehaenag Sulfehannover, Germany.
เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
โครโมเจน (Chromogen)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
กรด เปอร์คลอริก (Perchloric acid)	Reidel-dehaenag Sulfehannover, Germany.
โปรตีนมาตราฐาน (Bovine serum albumin)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
เทอร์มามิวล์ (Termamyl®)	Novo Industrias, Enzymes Division, Denmark.
อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase;AMG)	Novo Industrias, Enzymes Division, Denmark.
ยูเรีย (Urea)	Sigma Chemical Co., U.S.A.

สารเคมี (ชื่อทางการค้า)	บริษัทผู้ผลิต
แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
วาลีน (Valine)	BDH Laboratory Chemicals & Biochemicals Ltd.Poole, England.
กรดแอสปาร์ติก (Aspartic acid)	BDH Laboratory Chemicals & Biochemicals Ltd.Poole, England.
ซิสตีอีน (Cysteine)	BDH Laboratory Chemicals & Biochemicals Ltd.Poole, England.
แบะแซ (Glucose syrup)	ซื้อจากตลาดทั่วไป
แป้งมันสำปะหลัง (cassava flour)	ซื้อจากตลาดทั่วไป
กากน้ำตาล (Molasses)	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
กากถั่วเหลือง (Soybean meal)	บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด

2.2 <u>แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง</u>

สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาวิจัย คือ *Proteus rettgeri* SPS-6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ปรับปรุงมาจาก *P. rettgeri* ATCC 9250 ในห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก่อเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้สูง จนมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในอุตสาหกรรม (สมศักดิ์ สรั่งบิน, 2530)

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย (สมศักดิ์ สรั่งบิน, 2530)

2.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้อาหารสูตรปรับต่ำ ซึ่งใน 1 ลิตร ของอาหารนี้ประกอบด้วย

ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	7	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต	10	มิลลิกรัม
วิตามิน บี 1	5	มิลลิกรัม

หากเป็นอาหารแข็ง ต้องเติม Bacto-Agar 15 กรัม ต่อ ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.1

2.3.2 การเก็บรักษาเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ แบ่งออกเป็น

ก. การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง

เพื่อใช้เป็น stock culture โดยหลังจากการเขี่ยเชื้อจะบ่มเชื้อไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 28° ซ. เป็นเวลาประมาณ 3 วัน จึงย้ายไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ. แล้วทำการถ่ายเชื้อทุกเดือน

ข. การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

เพื่อติดตามการเจริญเติบโต และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลส เริ่มจากการเตรียมหัวเชื้อ(starter inoculum) เขี่ยเชื้อจาก master plate มา 1 ลูป ใส่ลงในอาหารเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในขวดชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 28° ซ. ด้วยความเร็ว 150-200 รอบ ต่อ นาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อที่เลี้ยงได้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารชนิดเหลงสูตรที่ต้องการ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดชมพู่ขนาด 1 ลิตร เขย่าเลี้ยงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเช่นเดิม

ค. การเลี้ยงเชื้อในถังหมัก (Fermentor)

ใช้เชื้อที่เลี้ยงไว้ในขวดชมพู่ขนาด 1 ลิตร มาเป็นหัวเชื้อในปริมาตร 5 เปอร์เซนต์ ของปริมาตรอาหารทั้งหมดที่ใช้ในถังหมัก แล้วทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

2.3.3 การติดตามการเจริญของเชื้อ

โดยการตรวจวัดความขุ่น ด้วยเครื่องบันทึกการดูดกลืนแสง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.3.4 การเตรียมเซลล์ เพื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

นำเซลล์มาปั่นแยกออกจากอาหาร ใช้เครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ ความเร็ว 3500xg เป็นเวลา 40 นาที ที่ 4° ซ. ล้างเซลล์ 1 ครั้ง ด้วยสารละลายนอร์มอลซาลีน แล้วกระจายเซลล์ในนอร์มอลซาลีน ปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรเดิม เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ. เพื่อใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์

2.4 การเตรียมสารละลาย

2.4.1 สารละลายกรด ฟีนิลอะซีทิล-4-อะมิโนเบนโซอิก (Phenylacetyl -4-aminozenzoic acid; PAAB) เพื่อใช้เป็นลับสเตรท (จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ, 2528)

ละลาย PAAB 25.5 มิลลิกรัม ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.08 โมลาร์ pH 7.8 จนได้ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เก็บได้นานประมาณ 1 เดือน ที่ 4° ซ.

2.4.2 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

2.4.2.1 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (Cupper solution) ประกอบด้วย

ก. 2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์

ข. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์

ค. สารละลายโปตัสเซียมทาร์เทต 1 เปอร์เซ็นต์

โดยผสมสารละลาย ก. 100 มิลลิลิตร กับสารละลาย ข. 1 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย ค. 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนใช้

2.4.2.2 สารละลายฟีนอล รีเอเจนต์ (Phenol reagent)

ผสมโซเดียมทังสเตท 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดท 12.5 กรัม น้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์ 25 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอลิกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร ต้มกลั่น (reflux) ด้วยความร้อนต่ำๆ 10 ชั่วโมง

เติมลิเธียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และน้ำโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอ 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาในตู้เย็นก่อนการใช้เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

2.4.3 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid : DNSA reagent)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาณ 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมาผสมกับสารละลายที่มีโปตัสเซียมโซเดียมตาเตรท 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชา

2.4.4 สารละลายที่ใช้ในการวัดปริมาณกลูโคส

(Bergmeyer และคณะ, 1965)

2.4.4.1 สารละลายกลูโคส รีเอเจนต์ (Glucose reagent) ประกอบด้วย

ก. สารละลายผสมของ บัฟเฟอร์และเอนไซม์

มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 40 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร และ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 250 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 7.0

ข. โครโมเจน

เป็นสารละลายของออโธไดอะนิซีดินไดไฮโดรคลอไรด์ (orthodianicidine dihydrochloride) 10 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เก็บที่ 4° ซ. ได้นาน 2-3 วัน

โดยผสมสารละลาย ก. 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย ข. 0.5 มิลลิลิตร เข้ากันก่อนใช้

2.4.4.2 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ละลายกลูโคส 25 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมกรดเปอร์คลอลิก 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.625 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4° ซ.

2.5 <u>การเตรียมแป้งไฮโดรไลซ์</u> (Hydrolysate of Starch)

ดัดแปลงมาจากวิธีของ สมบุญ ศุภผล (2525)

โดยเตรียมสารละลายแป้ง 30 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เติม Termamyl® ลงไป (1.2 กรัม ของ Termamyl® ต่อ 1,000 กรัมน้ำหนักแห้งของแป้งมันสำปะหลัง) แล้วตีกวนให้เข้ากันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนอ่างน้ำอุ่นที่ควบคุมอุณหภูมิ 95° ซ. จนได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อนใสมีกลิ่นหอม หยุดการทำงานของ Termamyl® โดยนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121° ซ. ภายใต้ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงจนได้อุณหภูมิ 60° ซ. ปรับ pH ให้เป็น 4.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอลิกเข้มข้น 4 นอร์มอล แล้วเติม Amyloglucosidase (AMG) ลงไป (1.5 มิลลิลิตร ของ AMG ต่อ 1,000 กรัมน้ำหนักแห้งของแป้งมันสำปะหลัง) กวนให้เข้ากันเบาๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนอ่างน้ำอุ่นที่ควบคุมอุณหภูมิ 60° ซ. แล้วหยุดการทำงานของ AMG โดยนำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที จะได้ของเหลวใสสีเหลืองอ่อนสำหรับนำไปใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.6 <u>การเตรียมกากถั่วเหลืองไฮโดรไลซ์</u> (Hydrolysate of Soybean Meal)

(ศิริลักษณ์ ธีระดากร, 2529)

นำกากถั่วเหลืองที่อบแห้งขนาด 20 เมช (0.84 มิลลิเมตร) มาย่อยด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น 1 นอร์มอล แล้วนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121° ซ. ภายใต้ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 40 นาที สกัดสารที่ได้ด้วยน้ำ 2 ครั้ง ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 นอร์มอล กรองตะกอนที่เกิดขึ้นทิ้งไป เก็บส่วนสารละลายไว้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.7 <u>การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส</u>

(Szewezuk และคณะ, 1980)

นำเซลล์ (ข้อ 2.3.4) 0.1 มิลลิลิตร รวมกับ กรดฟีนิลอะซีทิล-4-อะมิโน-เบนโซอิก (Phenylacetyl-4-aminobenzoic acid;PAAB) 1.25 มิลลิโมลาร์ (ข้อ 2.4.1) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร บ่มที่ 45° ซ. เป็นเวลา 15 นาที เติมโซเดียมไนไตรท์ 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายอยู่ใน กรดอะซีติก 0.25 โมลาร์ ลงไป

0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรด 1-อะมิโน-8-ไฮดรอกซีแนพธาลีน-3,6-ไดซัลโฟนิก (1-amino-8-hydroxynaphthalene-3,6-disulfonic acid) ซึ่งละลายอยู่ในโซเดียมคาร์บอเนต 0.66 โมลาร์ 1.5 มิลลิลิตร นำสารละลายสีชมพูที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectronic 20 เปรียบเทียบปริมาณกับ กราฟมาตรฐานของกรด พารา-อะมิโนเบนโซอิก (p-Aminobenzoic acid) (ภาคผนวกที่ 1)

กำหนดให้ เอนไซม์ 1 หน่วย (unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการเกิดกรด พารา-อะมิโนเบนโซอิก 1 นาโนโมล ต่อ นาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.8 <u>การวัดปริมาณโปรตีน</u> (Lowry และคณะ, 1951)

ปริมาณโปรตีนสุทธิของเซลล์วัดได้ โดยการไฮโดรไลซ์เซลล์ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของเซลล์ที่ใช้ สารละลายที่ได้เรียกว่า ไฮโดรไลเซท (hydrolysate)

นำไฮโดรไลเซท 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายอัลคาร์ไลน์คอปเปอร์ (ข้อ 2.4.2.1) 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลายฟินอล รีเอเจนต์ (ข้อ 2.4.2.2) 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงของ สารละลายสีน้ำเงินที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectronic 20 เปรียบเทียบปริมาณกับ กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 2)

2.9 <u>การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์</u> ดัดแปลงจากวิธีของ Bernfeld (1955)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ข้อ 2.4.3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้กัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที นำออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 10 นาที) เติมน้ำกลั่นลงไป ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectonic 20 เปรียบเทียบปริมาณกับ กราฟมาตราฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวกที่ 3)

2.10 <u>การวัดปริมาณกลูโคส</u> (Bergmeyer และ Bent, 1965)

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณกลูโคส 0.1 มิลลิลิตร มาผสมกับกรดเปอร์คลอลิก 2.9 % (v/v) 1.0 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ นำมา 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกลูโคส รีเอเจนต์ (ข้อ 2.4.4.1) 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง นำไปบ่มที่ 25° ซ. นาน 30 นาที วัดความเข้มของสีน้ำตาล-ส้มที่เกิดขึ้น ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectronic 20 เปรียบเทียบปริมาณกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส (ภาคผนวกที่ 4)

2.11 <u>การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด</u> โดยวิธี Kjeldahl Gunning method

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การย่อย

นำสารตัวอย่าง 0.5 กรัม หรือ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมสารคะตาไลท์ (ประกอบด้วย คอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม กับ โปตัสเซียมซัลเฟต 95 กรัม) 7 กรัม และเติมกรดกำมะถันเข้มข้น ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเครื่องย่อย(digestor) ด้วยเครื่อง Buchi 425 จนได้สารละลายใสในตู้ควัน ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปวิเคราะห์ตามวิธีในขั้นตอนที่ 2 ต่อไป

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน ด้วยเครื่องกลั่น

นำสารตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วจากขั้นตอนที่ 1 มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 % (w/v) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการกลั่นจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้น โดยใช้สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้น 4%(w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีอินดิเคอร์ผสม (เมทธิล เรด และเมทธิลลีนบลู 0.1 กรัมในเอทธานอล เข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร) อยู่ 3 หยด กลั่นตัวอย่างจนกระทั่งสารละลายกรดบอริกมีปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาติเตรทกับสารละลายมาตราฐานกรดกำมะถัน โดยที่

$$\text{ร้อยละของไนโตรเจน} = \frac{\text{ปริมาตรติเตรทของตัวอย่าง} \times \text{ความเข้มข้นของกรดกำมะถัน} \times 1.4}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$