บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ

(Basal medium)

K_2HPO_4	0.9	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Bacto agar	15.0	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.8

ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ปริมาณ 250 มล. ผสมสารประกอบทั้งหมดให้เข้ากันก่อนที่จะนำไปปรับ pH แล้วจึงเติมน้ำมันมะกอกให้มีความเข้มข้น 1% และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รีบเขย่าขวดเบาๆ ขณะที่อาหารยังร้อนอยู่จนอาหารเปลี่ยนจากลักษณะใสเป็นขุ่น แล้วจึงนำมาเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือบรรจุลงในหลอดทดลองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว นำหลอดมาวางเอียงประมาณ 15 องศา ก่อนที่อาหารจะแข็งตัวรอจน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเมื่อยังไม่นำมาใช้

3.1.2 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

อาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium)

สูตรที่ 1

K_2HPO_4	0.9	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.8

สูตรที่ 2

K_2HPO_4	0.9	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
$MnSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม

ทั้งอาหารสูตรที่ 1 และ 2 นำมาละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ปริมาณ 250 มล. ผสมสารประกอบทั้งหมดให้เข้ากันก่อนที่จะนำไปปรับ pH แล้วจึงเติมน้ำมันมะกอกให้มีความเข้มข้น 0.33% และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว

3.1.3. อาหารที่ใช้ในการเตรียม inoculum

เหมือนสูตรข้อ 1 นำไปปรับ pH แล้วถ่ายใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปริมาณ 100 มล. แล้วจึงเติมน้ำมันมะกอก ให้มีความเข้มข้น 0.112% และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.1.4. การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การเตรียมซับเสตรทของเอนไซม์ไลเปส

ซับเสตรทจะประกอบไปด้วย

1% (w/v) gum arabic	90.0	มล.
1 M NaCl	19.0	มล.
2% $CaCl_2$	2.1	มล.

ผสมให้เข้ากัน แล้วตวงมา 100 มล. เติมน้ำมันมะกอก 1 มล. แล้วนำไปผสมให้เข้ากันในเครื่อง moulinex ที่ความเร็วสูงสุด 7 นาที จะได้ 1% emulsion ของน้ำมันมะกอก ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะนำไปใช้

สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่ pH 4.8

ชั่งโซเดียมอะซิเตท 0.5456 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมกรดอะซิติค 1.38 มล. ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปวัด pH

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายมาตรฐาน โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.025 นอร์มอล

ชั่งโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร แล้วจึงนำไปหาความเข้มข้นมาตรฐานโดยใช้โพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท (potassium hydrogen phthalate , $COOH.C_6H_4COOK$,analytical reagent) อบ 2 ชั่วโมง ที่ 121 °ซ แล้วทำให้เย็นลงในโถอบแห้ง ชั่งอย่างละเอียด 0.5105 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้ม 20 นาที เขย่าจนละลายหมดแล้วจึงนำไปปรับให้ได้ปริมาตร 100 มล. ด้วย volumetric flask ขนาด 100 มล. แล้วไตเตรทด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.025 นอร์มอล ความเข้มข้นมาตรฐานของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (N)} = \frac{\text{กรัมของ } COOH.C_6H_4.COOK \times 1000}{\text{มิลลิลิตรของ KOH} \times 204.22}$$

สารละลายฟีนอล์พทาลีน 0.433%

ชั่งฟีนอล์พทาลีน 0.433 กรัม ละลายลงใน95%แอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร

สารอีมัลชั่นของกรดโอลีอิกมาตรฐาน

ดูดกรดโอลีอิกมาตรฐานมา 0.317 มล.ละลายด้วยสารละลายผสมระหว่าง ethanol กับ diethyl ether อัตราส่วน 1: 1ปริมาตร 50 มล. ที่ปรับ pH ให้เป็นกลางแล้ว ดังนั้นสารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 20 µmol/ml. นำสารละลายที่ได้มาปริมาณ 1,2,3,4 มล. (20,40,60,80 และ 100 µmol) ใส่ลงใน flask ขนาด 250 มล. จากนั้นเติมสารละลายชนิดเดิม 50. มล. เติม ฟีนอล์พทาลีน 1 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.025 M จนกระทั่ง สารละลายฟีนอล์พทาลีนเปลี่ยนสี

3.1.5 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน โดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford,1967)

สารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford stock solution) ประกอบไปด้วย

1 เอธานอล 95 เปอร์เซนต์ 100 มล.

2 กรดฟอสฟอริค 85 เปอร์เซนต์ 200 มล.

3 สีย้อมเซอร์วาบลูจี (Serva Blue G Dye) 350 มก.

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ใช้โดยก่อนจะนำมาใช้ต้องนำมาเจือจางเสียก่อน (Bradford Working Buffer) โดยการนำสารละลายแบร์ดฟอร์ดที่เตรียมไว้ 30 มล. เอธานอล 95% 15 มล. กรดฟอสฟอริค 85% 30 มล. และน้ำกลั่น 425 มล. ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในขวดสีน้ำตาล

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Standard Protein solution)

ละลาย Bovine serum albumin (BSA) เกรด v จำนวน 10 มก. ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 10 มล. เก็บไว้ที่ -20°ซ

3.2. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก stock แล้ว streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จากข้อ 3.1.1 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซเก็บได้นานประมาณ 1 เดือน

3.3. การเลี้ยงเชื้อและการเตรียม crude enzyme

3.3.1การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculum)

ใช้ loop เขี่ยเชื้อ ลงในอาหารเหลวจากข้อ 3.1.3 ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.3.2 การเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายเชื้อที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.3.1 ลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1.2แล้วปรับความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.1 นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซเก็บตัวอย่างทุก 30 นาที ติดตามการเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์และpH โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ 3.9

3.4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้นที่เตรียมตามข้อ 3.3.1 ลงในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 และ 2 ที่มีส่วนประกอบดังในข้อ 3.1.2 ปริมาตร 10 มล. ปรับให้ความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 90 นาทีจนครบ 30 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวัด การเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ 3.9 เปรียบเทียบและคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

3.5 <u>การหาความเร็วรอบในการให้อากาศที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ</u>

ถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้นที่เตรียมตามข้อ 3.3.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับให้ความขุ่น ปรับให้ความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ แปรผันการเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 150,200,250 และ 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 90 นาที จนครบ 30 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวัดการเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ3.9 เปรียบเทียบและหาความเร็วรอบในการให้อากาศที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.6 <u>การหาปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสม</u>

ถ่ายเชื้อตั้งต้นที่เตรียมได้ตามข้อ 3.1.3 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ด้วยความเข้มข้น 5, 10,15,20 มล. ปรับให้ความขุ่นตั้งต้นเท่ากับ 0.05 ,0.1,0.15 และ 0.2 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.5 เก็บตัวอย่างทุก90 นาที จนครบ 30 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวัดการเจริญ ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และ pH โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ3.9 เพื่อหาปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.7 <u>การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ</u>

ถ่ายเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมที่เตรียมได้ในข้อ 3.6 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ด้วยการเขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5 นำมาเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ เพื่อเปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เก็บตัวอย่างทุก 90 นาที เป็นเวลา 30 ชั่วโมง มาวัดการเจริญเติบโต แอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ3.9 เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อที่สุด

3.8 <u>การศึกษา pH ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ</u>

ถ่ายเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6 ลงในอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 แต่ปรับให้ pH ตั้งต้นเท่ากับ 4.5,5.5, 6.5,6.8,7.0 และ 7.5 เพื่อหา pH ที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.7 ด้วยการเขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5 เก็บตัวอย่างทุก 90 นาที มาวัดการเจริญ , แอคติวิตีของ

เอนไซม์ และ pH เพื่อหา pH โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ3.9 เพื่อหา pH ตั้งต้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ

3.9 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

นำ1% emulsion ของ น้ำมันมะกอกมา 15 มล. และสารละลายเอนไซม์ 0.5 มล. มาบ่มที่ 45 °ซ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม เอธานอล 95% ปริมาณ 20 มล.ไตเตรทกรดไขมันอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาด้วย KOH 0.025 M โดยใช้ฟีนอล์พทาลีน เป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลส์ไขมันแล้วได้กรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมล ภายในเวลาและสภาวะที่กำหนด และแสดงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ เป็นหน่วยต่อ มล. ของสารละลายเอนไซม์

$$\text{Unit of enzyme} = \frac{M-M_o X1}{1.18X10^{-3}}$$

โดยที่ M = mole ของ KOH ที่ถูกใช้ในปฏิกิริยา ซึ่งคำนวณได้จาก ปริมาณ KOH X molar KOH

M_o = mole ของ KOH ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับblank (นำเอนไซม์ไปนึ่งที่121°ซเป็นเวลา 15 นาที) ซึ่งคำนวณได้จากปริมาณ KOH Xmolar KOH

$1.18X10^{-3}$ = ความชันของกราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก

0.5 = ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการวัดแอคติวิตี (มล.)

Total activity = Unit of enzyme x 250 ml./OD600nm.

โดยที่ 250 = ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

OD_{600} = ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm.

3.10 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปส

นำ crude enzyme ในช่วงของการเจริญที่ตรวจพบว่ามีประสิทธิภาพของการทำงานของเอนไซม์ไลเปส มาศึกษาสมบัติต่าง ๆโดย

3.10.1 ศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์โดยใช้อะซิเตทบัฟเฟอร์ที่ pH 4.8 และ 5.6 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่pH 7.0 และ 8.0 และโดยใช้คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.5 และ 10.5

3.10.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการทำงานของเอนไซม์ โดยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับซับเสตรทที่อุณหภูมิ 30°ซ, 37°ซ, 45°ซ,60°ซ และ 80°ซ

3.10.3 ศึกษาความจำเพาะต่อซับเสตรทของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบระหว่างน้ำมันมะกอกและTween 80

3.10.4 ศึกษาชนิดของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

3.10.5 ศึกษาปริมาณของเอนไซม์ เพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่เหมาะสม

3.10.6 ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ภายใต้ภาวะที่กำหนด

<u>3.11 การหาแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ</u>

3.11.1 เพาะเลี้ยงในอาหารและวิธีเดียวกับข้อ 3.1.3โดยใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆได้แก่ น้ำมันรำ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันงา น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันละหุ่ง น้ำมันข้าวโพด และ น้ำมันปาล์ม แทนน้ำมันมะกอก เปรียบเทียบและเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ และการทำงานของเอนไซม์ที่สูงที่สุด โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ3.9

3.11.2 เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารตามวิธีเดียวกับข้อ 3.1.3 แต่ใช้ น้ำตาลกลูโคส, ซูโครส, ฟรุคโตส, มอลโตส,และกาแลคโตส ปริมาณ 1g% เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำมันมะกอก เลือกชนิดของวัตถุดิบที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อและการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ3.9

3.11.3 เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.1.3 แต่ใช้แป้งมันสไปะหลัง ปริมาณ 0.1,1.0 และ 5.0 % เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำมันมะกอก เลือกปริมาณ ของ แป้ง

มันสำปะหลังที่เหมาะสมในการเจริญและการสร้างเอนไซม์ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ3.9

3.11.4 เลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.2 และ3.11.3 มาเลี้ยงเชื้อโดยใช้ น้ำมันที่เลือกได้จากข้อ 3.11.1 ปริมาณ 0.112 %เป็น inducer เพื่อหาแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ3.9

3.12 <u>การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl (Leonard,1987)</u>

ใช้ตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน 1-2 มล. เติมคะตะไลส์ (โพแตสเซียมซัลเฟต 95 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม) 7 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มล. นำไปอุ่นบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 50มล. นำตัวอย่างไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่น Buchi โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 % จำนวน 50 มล. นำเอาขวดที่บรรจุกรดบอริก 4% ปริมาณ 100มล. ซึ่งเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ 2-3 หยดมารองรับสารละลายที่กลั่นได้จนกระทั่งปริมาตรรวม 200 มล. หรือสีของสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีม่วง แล้วจึงนำไปไปเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ไตเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเขียวใส คำนวณหาปริมาณของไนโตรเจนจากสูตรข้างล่างนี้

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

A = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

C = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

V = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

3.13. <u>หาแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อ</u>

3.13.1 หาปริมาณของวัตถุดิบเริ่มต้น ที่จะใช้โดยใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นตัวศึกษาแปรผันปริมาณดังนี้ 0.01,0.1,0.5 และ 1 % เลี้ยงเชื้อแล้วติดตามการเจริญและการสร้างเอนไซม์เพื่อคัดเลือกปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อและการทำงานของเอนไซม์ที่สูงที่สุดแล้วนำสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมไปหาเปอรเซนต์

ไนโตรเจนโดยรวมด้วยวิธี Kjeldahl โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ3.9

3.13.2 เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.2 และปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสม จากข้อ 3.13.1 และมีแหล่งไนโตรเจน 0.2 % ของ peptone, tryptone , urea, สารสกัดจากยีสต์, $(NH_4)H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$และ NH_4NO_3 คัดเลือกชนิดของแหล่งที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนที่ให้การทำงานของเอนไซม์สูงที่สุด โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วยblank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ 3.9

3.13.3 เลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 3.13.2 ทดลองใช้กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวัน แทน สารสกัดจากยีสต์ โดยวัตถุดิบที่เลือกได้จากข้อ 3.11.4 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ3.9

3.13.4 วัตถุดิบที่เลือกได้จากข้อ 3.13.3 และสารสกัดจากยีสต์นำมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 ทำการเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบผลที่ได้กับการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ3.9

3.13.5 แปรผันปริมาณของวัตถุดิบผสมที่ได้จากข้อ 3.13.4 ทำการเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบผลที่ได้กับข้อ 3.13.4 โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบด้วย blank ทุกตัวอย่างดังวิธีการทดลองในข้อ3.9

3.14 <u>การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด</u>

ปิเปตสารที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 10,20,และ 50 ไมโครลิตร ผสมกับอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH4.8 ให้เท่ากับ 100 ไมโครลิตรแล้วนำสารละลายแบรดฟอร์ดที่เตรียมไว้ 1 มล. เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ภายใน 1 ชั่วโมง นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน(BSA) ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 20 ไมโครกรัมต่อ มล.

3.15. <u>การเตรียมเอนไซม์ให้เข้มข้นขึ้น</u>

<u>วิธีที่ 1</u> ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้วแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็งมาเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด ที่เปอร์เซนต์ต่างๆ โดยค่อยๆเติมที

ละน้อย คนเบาๆจนแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมดแล้วจึงนำไปตั้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน เหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนของตะกอนที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิต่างๆเช่น 37°ซ,45°ซ, 60°ซ, 80°ซ เป็นต้น

วิธีที่ 2 ตกตะกอนด้วยเกลือโซเดียมซัลเฟต ทำการตกตะกอนเหมือนกับการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแต่ใช้โซเดียมซัลเฟตแทน

วิธีที่ 3 ตกตะกอนด้วยเอธานอล (Gowland และคณะ,1987) นำเอธานอล 95%ไปแช่ที่อุณหภูมิ -20°ซ 1 คืนแล้วนำมาเทใส่น้ำเลี้ยงเชื้อโดยให้ความเข้มข้นที่เมื่อรวมกับน้ำเลี้ยงเชื้อแล้วมีความเข้มข้นเท่ากับ 80% (ประมาณ 3 เท่า) ค่อยๆรินเอธานอลลงไปในน้ำเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 4°ซกวนอย่างสม่ำเสมอตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ แล้วนำตะกอนที่ได้ไปปั่นตกตะกอนที่ ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา ครึ่งชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°ซ แล้วล้างตะกอนด้วยเอธานอลที่แช่เย็นไว้ที่ -20°ซ อีก 2 ครั้ง จึงนำตะกอนที่ได้ไปกรองและอบแห้งที่อุณหภูมิ 25°ซ 37°ซ 60°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเอนไซม์ที่ได้

วิธีที่ 4 ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี Ultra-filtration และทำให้แห้งโดยวิธีLyophilization นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้วมาทำ Ultra-filtration โดยลดปริมาตรเหลือ 1 ใน 3 โดยกรองผ่านเมมเบรนที่มี molecular weight cut off 10,000 นำส่วนที่ได้จากการทำ Ultrfiltration แล้วไปทำ Lyophilization จนได้เอนไซม์รูปผง ชั่งน้ำหนักเอนไซม์ที่ได้ เปรียบเทียบปริมาณและแอคติวิตีของเอนไซม์ผงที่เตรียมได้จากแต่ละวิธี และหาปริมาณโปรตีนในแต่ละวิธีเพื่อหา specific activity ที่ดีที่สุดเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมเอนไซม์ผง

3.16 การทดสอบความสามารถในการเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

นำเอนไซม์ผงที่ได้จากข้อ3.15 มาแบ่งเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิ -20°ซ ,4 °ซ,30°ซ 37°ซ, และ 60°ซ เก็บตัวอย่างมาหาแอคติวิตีเป็นระยะๆ เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเอนไซม์ผงก่อนที่จะนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ หาแอคติวิตีที่เหลือโดยเทียบเป็นเปอร์เซนต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ (Relative activity)