บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 แบคทีเรีย

1. *B. subtilis* ORB7106 (*azoR1-lacZ, ΔyodB, tet^r, cm^r*)
2. *B. subtilis* JH642 (Wild type)

3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์

1. Plate
2. Flask
3. Auto Pipette
4. Filter sterile 0.45 μM (Millipore)
5. Shaker (Gallenkamp)
6. Centrifuge Model minispin plus SPACE (Eppendorf)
7. Centrifuge Model SUPER T21 (Sorvall)
8. Spectrophotometer Model 6405 UV/Vis (Jenway)
9. pH meter Model pH 510 (Eutech Instruments)
10. Incubator Model Binder
11. Cooled incubator Model Binder
12. Autoclave Model AMA 260S (Astell)
13. Balance Model TE 214S (Sartorius)

3.1.3 สารเคมี

3.1.3.1 สีย้อมเอโซ (โครงสร้างดูภาคผนวก)

1. Azobenzene (Sigma-Aidrich)
2. Methyl red (Sigma-Aidrich)
3. Orange G (Fluka Analytical)
4. Congo red (Merck)

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.1.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Nutrient Broth (Himedia)
2. $MnCl_2$ (Analytical univar reagent Ajax Finechem)
3. KCl (Analytical univar reagent Ajax Finechem)
4. $FeSO_4$ (Carlo erba reagent)
5. $MgSO_4$ (Merck)
6. Ca (NO_3) Sd fine-chem limited
7. Tryptophan (Sigma-Aidrich)
8. Amphicillin (Sigma-Aidrich)
9. Chloramphenical (Sigma-Aidrich)
10. Tetracycline (Sigma-Aidrich)
11. NaOH (Merck)
12. Lysozyme (Sigma-Aidrich)
13. Sodium acetate (Analytical univar reagent Ajax Finechem)
14. Monobasic sodium phosphate (Analytical univar reagent Ajax Finechem)
15. Dibasic sodium phosphate (Analytical univar reagent Ajax Finechem)
16. Glacial acetic acid (Lab-scan analytical science)
17. Bovine serum albumin (Fluka)
18. Protein assay dye reagent concentrate (Bio-Rad)

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.2 วิธีการการศึกษา

3.2.1 ศึกษาระยะการเจริญของแบคทีเรีย

นำเชื้อ *B. subtilis* ORB7106 1 ลูป (loop) เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Difco sporulation medium (DSM) 5 มิลลิลิตร (ดูภาคผนวก ก) นำมาเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมา 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลว DSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำมาเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญโดยการวิเคราะห์หาค่าความขุ่นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600})

3.2.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ บนอาหารแข็ง DSM

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ORB7106 ในอาหารเหลว DSM เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Spot inoculation (5 ไมโครลิตร) บนอาหารแข็ง DSM ที่ผสมสีย้อมเอโซแต่ละชนิดได้แก่ Azobenzene, Methyl red, Orange G และ Congo red ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอช 7 จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 25, 30, 37, 40 และ45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร

3.2.3 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซบนอาหารแข็ง DSM

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ORB7106 ในอาหารเหลว DSM เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Spot inoculation (5 ไมโครลิตร) บนอาหารแข็ง DSM ที่ผสมสีย้อมเอโซแต่ละชนิดได้แก่ Azobenzene, Methyl red, Orange G และ Congo red ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอช 5, 7 และ 9 โดยปรับพีเอชด้วย Acetate และ Phosphate buffer จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร

3.2.4 การทดสอบความเข้มข้นเริ่มต้นของสีย้อมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซในอาหารเหลว DSM

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ORB7106 และ *B. subtilis* JH642 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง นำมา 1 มิลลิลิตร เลี้ยงลงในอาหาร

Prince of Songkla University Pattani Campus

เหลว DSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผสมสีย้อมเอโซแต่ละชนิดได้แก่ Azobenzene, Methyl red, Orange G และ Congo red ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคงที่ (static condition) เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง ตามค่าความยาวคลื่นของสีย้อมเอโซแต่ละชนิด ที่ค่าความยาวคลื่น 380, 430, 480 และ 490 สำหรับ Azobenzene, Methyl red, Orange G และ Congo red ตามลำดับ (Sugiura *et al.,* 2006) เพื่อวัดประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ตาม วิธีการของ Wang *et al*. (2008)

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลาย (\%Decolorization)} = \frac{(A_i - A_t)}{A_i} \times 100$$

เมื่อ A_i คือ ค่าการดูดกลืนแสงก่อนเกิดการย่อยสลาย

A_t คือ ค่าการดูดกลืนแสงหลังเกิดการย่อยสลาย ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

3.2.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ ในอาหารเหลว DSM

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ORB7106 และ *B. subtilis* JH642 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง นำมา 1 มิลลิลิตร เลี้ยงลงในอาหารเหลว DSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผสมสีย้อมเอโซแต่ละชนิดได้แก่ Azobenzene, Methyl red, Orange G และ Congo red ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 25, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะคงที่ (static condition) เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

3.2.6 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ ในอาหารเหลว DSM

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ORB7106 และ *B. subtilis* JH642 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง นำมา 1 มิลลิลิตร เลี้ยงลงในอาหารเหลว DSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผสมสีย้อมเอโซแต่ละชนิดได้แก่ Azobenzene, Methyl red, Orange G และ Congo red ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับพีเอช 5, 7 และ 9 โดยใช้ Acetate และ Phosphate buffer บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคงที่

Prince of Songkla University Pattani Campus

(static condition) เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง เพื่อวัดประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

3.2.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมเอโซในทุกสภาวะโดย *B. subtilis* ORB7106 และ *B. subtilis* JH642 ในอาหารเหลว DSM วิเคราะห์โดยวิธี *t'* test (SAS version 9.2) ที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$

3.2.8 ศึกษาชนิดของเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1) ที่สร้างจาก *B. subtilis* ORB7106 ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซ (ดัดแปลงจาก Chen *et al*., 2005)

3.2.8.1 การศึกษา Extracellular enzymatic activity

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ORB7106 ในอาหารเหลว DSM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เซลล์ที่ตกตะกอนนำไปล้างด้วย 0.05 M phosphate buffer (pH 7) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับส่วนใสที่ได้ไปกรองผ่านตัวกรอง (filter sterile) ขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โดยส่วนผสมที่เกิดปฏิกิริยา (reaction mixture) จำนวน 1,000 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สีย้อมเอโซชนิด Methyl red ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร NADH ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 ไมโครโมลาร์ และสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการกรอง จากนั้นนำไปวัดประสิทธิภาพการย่อยสลายและอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (control) ที่มีส่วนผสม (reaction mixture) จำนวน 1,000 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สีย้อมเอโซชนิด Methyl red ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร NADH ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 ไมโครโมลาร์ และสารละลายไลโซไซม์ (0.1 กรัมต่อลิตร) นำมาคำนวณกิจกรรมเอนไซม์เอโซรีดักเทสโดยใช้ค่า molar absorption coefficient เท่ากับ 18.5 ต่อมิลลิโมลาร์ต่อเซนติเมตร (Sugiura *et al.,* 2006)

1 ยูนิตของเอนไซม์เอโซรีดักเทส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถรีดิวซ์สี Methyl red 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่กำหนด

Payap University Phitsanulok Campus

3.2.8.2 การศึกษา Intracellular enzymatic activity

นำตะกอนเซลล์ (ที่ได้จากข้อ 3.2.8.1) เติมไลโซไซม์ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองผ่าน ตัวกรอง (filter sterile) ขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปวิเคราะห์ เช่นเดียวกับข้อ 3.2.8.1

3.2.8.3 การหาปริมาณโปรตีน

นำส่วนผสมที่เกิดปฏิกิริยา (reaction mixture) จำนวน 1,000 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการกรอง 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.05 M phosphate buffer (pH 7) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และ dye reagent concentrate (Bio Rad protein assay) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และใช้สมการที่ได้ จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin (BSA) (ภาคผนวก ง) เพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีน

3.2.9 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

$$\text{1 ยูนิตของเอนไซม์ (ไมโครโมลต่อนาที)} = \frac{(A_i - A_t)/\Delta t.10^3}{\varepsilon.L}$$

โดย A_i คือ ค่าการดูดกลืนแสงก่อนเกิดการย่อยสลาย

A_t คือ ค่าการดูดกลืนแสงหลังเกิดการย่อยสลาย

Δt คือ ระยะเวลาการย่อยสลาย (2 นาที)

ε คือ ค่า molar absorption coefficient (18.5 ต่อมิลลิโมลาร์ต่อเซนติเมตร)

L คือ ความกว้างของคิวเวตต์ (1 เซนติเมตร)

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)} = \frac{\text{ยูนิตของเอนไซม์}}{\text{มิลลิกรัมของโปรตีน}}$$

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.2.10 ศึกษาประสิทธิภาพของสีย้อมเอโซในการชักนำการสร้างเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* JH642 ในอาหารเหลว DSM ที่เติมและไม่เติมสีย้อมเอโซชนิด ได้แก่ Methyl red ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์ ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์ ที่ได้ล้างด้วย 0.05 M phosphate buffer (pH 7) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมไลโซไซม์ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองกรองผ่านตัวกรอง (filter sterile) ขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปวิเคราะห์ เช่นเดียวกับข้อ 3.2.8.1

Prince of Songkla University Pattani Campus