บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. แหล่งตัวอย่างสำหรับการคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ CGTase

- ดินบริเวณสนามหญ้าและแปลงเกษตรภายในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
- เศษอาหารสัตว์จากรำข้าว จากโรงเลี้ยงไก่และสุกร
- เศษแป้งจากโรงงานที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ เช่น โรงงานขนมจีน โรงงานผลิตขนมปัง โรงงานผลิตเส้นหมี่

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ CGTase (Illias *et al.*, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi II สำหรับคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ประกอบด้วย soluble starch ร้อยละ 1, ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5, เปปโตน ร้อยละ 0.5, K_2HPO_4 ร้อยละ 0.02, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ร้อยละ 0.02, phenolphthalein ร้อยละ 0.02, Na_2CO_3 ร้อยละ 1.0 และวุ้นร้อยละ 1.5

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาการเจริญของเชื้อและผลิตเอนไซม์ CGTase

ประกอบด้วย soluble starch ร้อยละ 1, ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5, เปปโตนร้อยละ 0.5, K_2HPO_4ร้อยละ 0.02, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ร้อยละ 0.02 และ Na_2CO_3 ร้อยละ 1.0 (ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมวุ้นร้อยละ 1.5)

3. แป้ง (แหล่งคาร์บอนและสับสเตรท)

- Soluble starch เกรดสำหรับการวิเคราะห์
- แป้งสาคู จากสหกรณ์การเกษตร หมู่ 5 ตำบลช่อง อำเภอนาโยง จังหวัดตรัง
- แป้งมันสำปะหลัง ตราใบหยก
- แป้งข้าวเจ้า ตราสามเศียร
- แป้งข้าวโพด ตราคนอร์

4. สารเคมี

4.1 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ (ภาคผนวก ก)

4.1.1 สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นสารเคมีเกรดสำหรับการวิเคราะห์

4.1.2 สารเคมีที่ใช้การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ในการผลิตเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน

4.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยใช้ Folin – Ciocalteau reagent

5. อุปกรณ์

5.1 อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

- ขวดดูแรนมีฝาปิดขนาด 500 มิลลิลิตร
- เครื่องแก้วสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์
- เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
- จานให้ความร้อน (hot plate)
- เครื่องเขย่า
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

5.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น 420A บริษัท Orion Research, Inc.
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D Company, Ltd
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP210-s บริษัท Sartorius
- เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท LAB-Line Instruments, Inc
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์(spectrophotometer) รุ่นU-2000 บริษัทTechnical Cooperation
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W350 บริษัท Memmert
- เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น 5403 บริษัท Eppendrof
- ตู้เก็บอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- เครื่อง HPLC Agilent 1100 series บริษัท Agilent

วิธีวิเคราะห์

1. ค่าพีเอช

นำตัวอย่างน้ำหมักที่ที่ชั่วโมงต่างๆ จำนวน 2 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าพีเอชของสารละลายโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ในการผลิตเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน (ดัดแปลงจาก Mahat *et al.*, 2004)

เจือจางเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียด้วย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ในความเข้มข้นที่เหมาะสม ดูดสารละลายเอนไซม์เจือจางปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแป้ง (soluble starch) ร้อยละ 4 ซึ่งเตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลาย 0.03 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 3.5 มิลลิลิตร และเติมฟีนอฟทาลีน (phenopthalein) ร้อยละ 0.02 ใน 0.005 M โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำสารละลายไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ใช้สารละลายเอนไซม์ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับแป้งเป็นแบล็ง (blank) เทียบกับกราฟมาตรฐานของเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินความเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข)

โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ การเกิด 1 ไมโคลโมลของเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3. การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ (Total cell protein) โดยใช้ Folin – Ciocalteau reagent (Lowry, 1951)

เก็บตัวอย่างเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงมา 0.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงความเร็วสูง 10 นาที ที่ 8,000 รอบต่อนาที นำส่วนตะกอนมาล้างด้วยสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 3 ครั้ง ครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เติม 1 N NaOH 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10–15 นาที และทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ โดยใช้ Folin – Ciocalteau reagent (ภาคผนวก ข)

4. การวิเคราะห์เบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน (ดัดแปลงจาก Mahat *et al.*, 2004)

นำตัวอย่างสารละลายไซโคลเด็กตรินที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ CGTase กับแป้ง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมลงใน 30 mM โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร และเติมฟีนอฟทาลีน ร้อยละ 0.02 ใน 5 mM โซเดียมคาร์บอเนต (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันและวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ใช้

ตัวอย่างที่ไม่ทำปฏิกิริยาแทนสารละลายไซโคลเด็กตรินเป็นแบล็ง (blank) เตรียมกราฟมาตรฐานของเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินความเข้มข้น 0.01-2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5. การตรวจหาปริมาณไซโคลเด็กซ์ตรินโดยวิธี HPLC (Kinalekar *et al.*, 1999)

นำสารละลายแป้งร้อยละ 4 ใน 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเอนไซม์ CGTase 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วตัดสายของเด็กตรินให้เป็นกลูโคสด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำมากรองผ่านแผ่นมิลลิพอร์ (millipore) ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์หาไซโคลเด็กซ์ตริน โดยฉีด 20 ไมโครลิตร ของตัวอย่างเข้าไปในเครื่อง HPLC โดยใช้ column ; Zorbax Carbohydrate ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร, mobile phase ; acetonitrile : water (70:30 ปริมาตรต่อปริมาตร) ; flow rate : 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐานไซโคลเด็กซ์ตริน (standard 2-10 มิลลิกรัม)

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase

1.1 การคัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ CGTase จากแหล่งต่างๆ

ชั่งตัวอย่าง ดิน เศษอาหารสัตว์ และรำข้าว 10 กรัม ใส่ลงในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากันด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เจือจางสารละลายเชื้อให้มีความเจือจางเหมาะสม ประมาณ 10^{-2}-10^{-3} เท่า ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Horikoshi II ที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน (เติมฟีนอฟทาลีนสำหรับการแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ โดยเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ จะสร้างเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินจากการย่อยแป้งและเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินจะดูดซับสีของฟีนอฟทาลีนซึ่งมีขนาดพอดีกับโพรงของเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน ทำให้ฟีนอฟทาลีนเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นไม่มีสี) เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วจานอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีวงใสเกิดรอบๆ มาทำการ streak บนอาหาร Horikoshi II เพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว แล้วเก็บเชื้อในอาหารวุ้นเอียง Horikoshi II ที่ไม่เติมฟีนอฟทาลีน

1.2 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้สูง

นำเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ที่คัดเลือกได้จากแหล่งต่างๆ จากข้อ 1.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 10 มิลลิลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้น (inoculum) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นเอียงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่ลงในอาหารเหลวที่เติม soluble starch เข้มข้นร้อยละ 1 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำสารละลายมาปั่นแยกเซลล์ออก แล้วนำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase เพื่อเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดี และนำเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 10 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ที่เติม soluble starch เข้มข้นร้อยละ 1 ใช้เชื้อเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว มาแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเหลว นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ CGTase และเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดีที่สุดเก็บในสารละลายกลีเซอรอลร้อยละ 50

1.3 การจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* sp.

1.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1) ศึกษารูปร่างและการติดสีแกรม

ป้ายแผ่นฟิล์มเชื้อบนสไลด์ (smear) สำหรับย้อมสี ทิ้งให้แห้งแล้วผ่านเปลวไฟ (heat-fix) 2-3 ครั้ง หยด crystal violet ให้ท่วมรอย smear ที่ป้ายไว้นาน 1 นาที ล้างน้ำและเทน้ำออกให้หมด จากนั้นหยด Gram's iodine 1 นาที ล้างน้ำและเทน้ำออกให้หมด ล้างสีด้วยเอทานอลร้อยละ 95 โดยเอียงสไลด์ไปมาประมาณ 15 วินาที ล้างน้ำระวังอย่าล้างสีนานเกินไปเพราะจะทำให้สี crystal violet-iodine complex หลุด แล้วหยด safranin 15 วินาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้งก่อนดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

หมายเหตุ เซลล์ติดสีม่วงของ crystal violet – Gram positive bacteria

เซลล์ติดสีชมพูของ safranin – Gram negative bacteria

2) ย้อมสีเอนโดสปอร์ (endospore) ของแบคทีเรีย

ป้ายแผ่นฟิล์มเชื้อบนสไลด์ (smear) สำหรับย้อมสี ทิ้งให้แห้ง (air-dry) แล้วผ่านเปลวไฟ ประมาณ 2 ครั้ง หยดสี malachite green ให้ท่วมสไลด์ ใช้ไฟลนใต้สไลด์ให้ร้อนเป็นไอ นาน 10 นาที คอยเติมสี ระวังอย่าให้สีเดือดหรือแห้งติดสไลด์ แล้วล้างด้วยน้ำ หยด safranin นาน 15-30 วินาที รินสีที่เหลือออก ล้างน้ำและซับให้แห้ง

หมายเหตุ ส่วนที่ติดสีเขียว – เอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย

ส่วนที่ติดสีชมพู – เซลล์ส่วนอื่นที่ไม่ใช่เอนโดสปอร์ (vegetative cell)

1.3.2 ลักษณะทางชีวเคมี การสร้างเอนไซม์แคทาเลส (catalase)

ทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลส โดยใช้เข็มเขี่ยแตะตรงกลางโคโลนีของแบคทีเรียที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง วางบนสไลด์ แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 3 ลงบนแบคทีเรียดังกล่าว (ใช้เข็มเขี่ยผสมแบคทีเรียกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) ตรวจดูผลจากฟองแก๊สที่เกิดขึ้นทันทีทันใด

ถ้ามีฟองเกิดขึ้นบันทึกผลเป็นบวก คือ แบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์แคทาเลสได้ จึงสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้น้ำและแก๊สออกซิเจนเกิดขึ้น แต่ถ้าหากไม่เกิดฟองแก๊สแสดงว่าให้ผลเป็นลบหรือแบคทีเรียนั้นไม่สร้างเอนไซม์แคทาเลส

หมายเหตุ แบคทีเรีย *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างสปอร์ และมีเอนไซม์แคทาเลสเพื่อสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจนได้

1.4 การจำแนกสกุลของเชื้อ *Bacillus* sp.

จัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยใช้ 16S rDNA โดยการส่งตัวอย่างวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสที่ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล แล้วนำลำดับเบส 16S rDNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบลำดับเบสที่มีอยู่ใน database ซึ่งมีข้อมูลอยู่ในอินเตอร์เน็ต โดยใช้เว็บไซต์ของ http://www.ncbi.nlm.nim.gov ด้วยโปรแกรม BLAST

1.5 การบ่งชี้ผลผลิตและชนิดของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่คัดเลือกได้โดยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษ (Paper Chromatography) (ภาคผนวก ข)

ใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ เอ็น-บิวทานอล (n-butanol) : ไพริดีน (pyridine) : น้ำ ผสมกันในอัตราส่วนของปริมาตรเท่ากับ 6 : 4 : 3 ตามลำดับ และสารละลายที่ใช้ย้อม คือ สารละลายอิ่มตัวของซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) ในตัวทำละลายอะซีโตน (acetone) (สารละลาย A) และสารละลายผสมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) กับเมทธานอล (methanol) (สารละลาย B)

1.6 จำแนกชนิดของไซโคลเด็กซ์ตรินโดยวิธี HPLC (Kinalekar *et al.*, 1999)

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่คัดเลือกได้

2.1 แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แป้งชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนคือ soluble starch, แป้งสาคู, แป้งข้าวเจ้า, แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ทำการเจลาทิไนซ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยเขย่านาน 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อป้องกันไม่ให้แป้งเกิดการรวมตัวเป็นก้อน แล้วเติมเชื้อเริ่มต้นที่เก็บในสารละลายกลีเซอรอลปริมาณร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเหลว แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ที่ 48 ชั่วโมง เลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดเพื่อนำมาทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยกำหนดความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกัน เลือกความเข้มข้นของแป้งที่ให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2.2 แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นแป้งที่ได้จากข้อ 2.1 และใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ ยีสต์สกัด, เปปโตน, และทริปโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เติมเชื้อเริ่มต้นที่เก็บในสารละลายกลีเซอรอลปริมาณร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเหลว แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ที่ 48 ชั่วโมง เลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด เพื่อนำมาทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยกำหนดความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนที่ร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 แล้วจึงทำการทดลองเช่นเดียวกันเพื่อเลือกความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2.3 พีเอชเริ่มต้นของอาหาร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แป้งและแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 2.1 และ 2.2) ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 7, 8, 9, 10 และ 11 ด้วย Na_2CO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 10 เติมเชื้อเริ่มต้นที่เก็บในสารละลายกลีเซอรอลปริมาณร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเหลว แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ที่ 48 ชั่วโมง เลือกพีเอชที่ให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด

2.4 อุณหภูมิ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แป้งและแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 2.1 และ 2.2) ปรับพีเอชเริ่มต้นตามข้อ 2.3 เติมเชื้อเริ่มต้นที่เก็บในสารละลายกลีเซอรอลปริมาณร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเหลว แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ที่ 48 ชั่วโมง เลือกอุณหภูมิที่ให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ CGTase

การทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วนก่อนศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase ทำโดยนำเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดี มาเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase (ข้อ 2) แล้วนำสารละลายมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออก เอาสารละลายส่วนใสปริมาตร 1·

ลิตร มาตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 50-80 ของจุดอิ่มตัว ค่อยๆ เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยๆ จนหมดผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้ มาละลายในสารละลาย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 สารละลายที่ได้นำไปไดอะไลซ์ (dialysis) โดยใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีขนาด molecular weight cut-off เท่ากับ 8,000 ดาลตัน ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันในปริมาตรที่มากเกินพอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดปริมาตร และกิจกรรมเอนไซม์

3.1 การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ CGTase

ปรับพีเอชของ soluble starch เข้มข้นร้อยละ 4 และเจือจางเอนไซม์ CGTase ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4–11 (0.1 M อะซิเตทบัฟเฟอร์ (พีเอช 4- 5), 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-8) และ 0.1 M ไกลซีน–โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (พีเอช 8.5-10)) ทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที วัดการผลิตเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน

3.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ CGTase

ปรับพีเอชของสับสเตรท (soluble starch) เข้มข้นร้อยละ 4 และเจือจางเอนไซม์ CGTase ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที วัดการผลิตเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน

3.3 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่พีเอชต่าง ๆ

เจือจางเอนไซม์ CGTase ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4–11 (0.1 M อะซิเตทบัฟเฟอร์ (พีเอช 4-5), 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-8) และ 0.1 M ไกลซีน–โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (พีเอช 9-11)) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการบ่มที่พีเอชต่างๆ มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ที่เหลือ

3.4 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เจือจางเอนไซม์ CGTase ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 3.3 แล้วนำสารละลายเอนไซม์ CGTase ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 55, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำเอนไซม์ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ที่เหลือ

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน

4.1 ชนิดของแป้งในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน

เตรียมสับสเตรทที่ใช้ศึกษาในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน คือ soluble starch, แป้งสาคู, แป้งข้าวเจ้า, แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ให้มีความ

เข้มข้นของแป้งร้อยละ 1 และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงเติมสารละลายเอนไซม์ CGTase จากข้อ 3 เข้มข้น 12 ยูนิตต่อกรัม (แป้ง) นำไปบ่มที่สภาวะข้อ 3.1 และ 3.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน เพื่อทำการคัดเลือกชนิดของสับสเตรทที่ใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

4.2 ผลของการให้ความร้อนกับแป้ง

ละลายแป้งที่ได้จากการทดลองข้อ 4.1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (จากข้อ 3.1) ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50, 55, 60, 65, 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมสารละลายเอนไซม์ CGTase จากข้อ 3 เข้มข้น 12 ยูนิตต่อกรัม(แป้ง) นำไปบ่มที่สภาวะที่ได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน เพื่อทำการคัดเลือกวิธีการเตรียมสารละลายแป้งในการผลิตเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินด้วยเอนไซม์ CGTase

4.3 ความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน

นำแป้งที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้แป้งความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 มาบ่มด้วยเอนไซม์ CGTase จากข้อ 3 ที่มีความเข้มข้น 12 ยูนิตต่อกรัมแป้ง ในสภาวะที่ได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินด้วยเอนไซม์ CGTase

4.4 อัตราส่วนของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเด็กซ์ตริน

นำสารละลายแป้งความเข้มข้นที่ได้จากข้อที่ 4.3 มาบ่มด้วยเอนไซม์ CGTase จากข้อ 3 ที่มีความเข้มข้น 12, 24, 48, 96 และ 192 ยูนิตต่อกรัมแป้ง ที่สภาวะข้อ 3.1 และ 3.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำสารละลายมาวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินเพื่อทำการคัดเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase ที่เหมาะสมในการผลิตเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน

4.5 อัตราส่วนของไซโคลเด็กซ์ตรินแต่ละชนิดที่ผลิตได้

นำความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมจากข้อ 4.3 มาบ่มด้วยเอนไซม์ CGTase จากข้อ 3 ในอัตราส่วนเอนไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.4 ในสภาวะตามข้อ 3.1 และ 3.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำสารละลายมาวิเคราะห์หาปริมาณไซโคลเด็กซ์ตรินแต่ละชนิด (α-, β- และ γ-CD) ด้วยเครื่อง HPLC