

บทปฏิบัติการทดลอง

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์

เอนไซม์เป็นตัวเร่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต (biocatalyst) เอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นก้อน ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ก็จะขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโปรตีน (พัชรา วีระกะลัส , 2541) ซึ่งปัจจุบันนี้เอนไซม์ได้เข้ามามีบทบาทในกระบวนการแปรรูปอาหารอย่างกว้างขวางและนับวันจะเริ่มเพิ่มจำนวนการใช้และปริมาณการผลิตมากขึ้น (ปรานี อานเปรีอง , 2543) เอนไซม์ที่ใช้สำหรับอุตสาหกรรม หรือที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น เอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์อะไมเลส รวมทั้งเอนไซม์ไซลาลเนส ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสารประเภทคาร์โบไฮเดรตมีการนำมาใช้มากในอุตสาหกรรมการแปรรูปน้ำผลไม้ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และอุตสาหกรรมการทำเยื่อกระดาษ เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ แต่แหล่งผลิตที่สำคัญในอุตสาหกรรมในปัจจุบัน ได้แก่ จุลินทรีย์ เนื่องจากมีข้อดี คือ จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ปริมาณมาก ๆ ได้ในระยะเวลาสั้น โดยใช้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการผลิตจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และมีขนาดเล็ก จึงใช้พื้นที่น้อย นอกจากนี้ยังสามารถเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูกและผลิตได้ตลอดเวลาโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล (สมใจ ศิริโชค, 2537) โดยเฉพาะจุลินทรีย์จำพวกเชื้อราซึ่งจัดเป็นแหล่งที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส เนื่องจากสามารถเติบโตได้เร็วในสภาพที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการผลิตสูง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา

กิจกรรมนักศึกษา

1. ทำแบบทดสอบก่อนเรียน
2. แบ่งกลุ่มประมาณ 5-6 คน
3. ปฏิบัติการทดลอง
4. สรุปรายงานผลการทดลองและนำเสนอ

วิธีการ

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย

1.1 การแยกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้ง

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา จากนั้นทำการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างเชื้อที่เจริญได้ดีและมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar slant ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้ง โดยหยดสารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 0.1 N ลงบนโคโลนี หากเชื้อใดมีบริเวณรอบโคโลนีใสแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีการย่อยแป้งได้

1.2 การแยกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา จากนั้นทำการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างของเชื้อที่เจริญได้ดีและสังเกตรอบโคโลนี หากมีบริเวณใสแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีการย่อยสลายโปรตีน และเก็บลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar slant

1.3 การแยกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา จากนั้นทำการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ tributyrin agar ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างของเชื้อที่เจริญได้ดีและสังเกตรอบโคโลนี หากมีบริเวณใสแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีการย่อยสลายไขมัน และเก็บลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ tributyrin agar slant

2. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา

2.1 ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเชิงคุณภาพ ดัดแปลงจากวิธี

ของ Uddin และคณะ (2012)

นำเชื้อราทนร้อนบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิเหมาะสม เป็นเวลา 3 วัน นำหัวของ Dopper ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ที่ปราศจากเชื้อเจาะตรงปลายเส้นใย นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC Agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-5 วัน โดยให้โคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 40 มิลลิเมตร จึงนำมาทดสอบด้วย congo red test โดยการเทร้อยละ 0.1 congo red ให้ท่วมอาหารทิ้งไว้ 10-15 นาที จึงเทสารละลาย congo red ออก จากนั้นราดทับด้วย 1 M NaCl นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนเกินทิ้ง จะเห็นวงใสที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ตรวจสอบผลความสามารถในการผลิตของเอนไซม์เซลลูเลส และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสแล้วบันทึกข้อมูล

2.2 ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเชิงคุณภาพ ตามวิธีของ Ahirwar และคณะ (2017)

นำเชื้อราที่บริสุทธิ์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิเหมาะสม เป็นเวลา 3 วัน นำหัวของ Dopper ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ที่ปราศจากเชื้อ เจาะตรงปลายเส้นใย นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นตัวควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1-5 วัน หลังจากนั้น นำเชื้อราที่ผ่านการเพาะเลี้ยง มา Flash plate ด้วย congo red 0.1 % เป็นเวลา 30 นาที และล้าง plate ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เป็นเวลาประมาณ 1 วินาที ทำการ Flash plate อีก 2 ครั้ง ด้วย 1 M NaCl เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบวงใส (clear zone) ที่เกิดรอบ ๆ โคลินีของจุลินทรีย์บนพื้น background สีแดงหรือสีม่วงอ่อนบนตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อและวัดขนาดของวงใส (clear zone)

สำหรับเกณฑ์การแบ่งระดับความสามารถในการผลิตของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสามารถแบ่งได้ดังนี้

- Significant : ขนาดของวงใส (Clear zone) มากกว่าหรือเท่ากับโคลินี
- Moderate : ขนาดของวงใส (Clear zone) น้อยกว่าหรือขนาดของวงจาง (Pale zone) มากกว่าโคลินี
- Negligible : ขนาดของวงจาง (Pale zone) น้อยกว่าหรือเท่ากับโคลินี

การวัดผลและการประเมินผล

1. สังเกตจากการปฏิบัติการทดลอง
2. การนำเสนอรายงานการทดลอง
3. การทำแบบฝึกหัด
4. การตรงต่อเวลาและความรับผิดชอบ
5. การรักษาความสะอาดของห้องปฏิบัติการ และการดูแลรักษาอุปกรณ์
6. การทดสอบก่อนเรียนและหลังเรียน

รายงานผลการทดลอง

เรื่อง.....

ชื่อผู้รายงาน 1.....รหัส.....
 2.....รหัส.....
 3.....รหัส.....
 4.....รหัส.....
 5.....รหัส.....
 6.....รหัส.....

วันที่ทำการทดลอง.....

ผลการทดลอง

.....

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

.....

ภาคผนวก ก

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยสลายแป้ง (Starch agar)

เปปโตน (Peptone)	2.0	กรัม
สารละลายแป้ง (Soluble starch)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ชั่งเปปโตน 2.0 กรัม ผงสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัม วุ้น 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย ซึ่งสารละลายแป้ง 10.0 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย ไม่ควรใช้น้ำร้อนในการละลายเนื่องจากแป้งอาจจะเกาะกันเป็นก้อนแข็งได้ จากนั้นเทน้ำแป้งลงไปในส่วนผสมทั้งหมดปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเล็กน้อยเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากัน จนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยสลายโปรตีน (Skim milk agar)

เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
นมพร่องมันเนย (Skim milk)	100.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ชั่งเปปโตน 5.0 กรัม ผงสกัดจากเนื้อ 3.0 กรัม และวุ้น 15.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย ชั่งนมพร่องมันเนย 100.0 กรัม ใส่ในขวดเตรียมอาหารไบโใหม่ ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อละลายผงนมพร่องมันเนย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแยกกันที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำมาวางไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนผสมของสารละลายนมพร่องมันเนยลงในส่วนผสมทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยสลายไขมัน (Tributyryn agar)

เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
ไตรบูไทรีน (Tributyryn)	100.0	มิลลิลิตร
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ชั่งเปปโตน 5.0 กรัม ผงสกัดจากยีสต์ 3.0 กรัม และวุ้น 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย ปิดเตาไตรบูไทรีน 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในส่วนผสมทั้งหมด นำไปให้ความร้อนเล็กน้อย ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส (Xylan agar)

ไซแลน (Xylan)	10.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.2	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหารตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลส (CMC agar)

คาร์บอกซี เมทิล เซลลูโลส	4.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหารตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

ภาคผนวก ข
สีและน้ำยาทดสอบ

1. การเตรียม ร้อยละ 0.1 Congo red

Congo red	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย Congo red ในน้ำกลั่นให้เข้ากัน หากมีตะกอนให้กรองก่อนใช้

2. การเตรียม 1 M NaCl

NaCl	55.44	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่นให้เข้ากัน