บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างรากพืชที่นำมาแยกเชื้อแอคติโนมัยซีส เก็บจากตำบลสันผีเสื้อ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่รากกล้วยไม้แคทลียา รากข่า รากกล้วยน้ำว้า และรากตะไคร้
2. ตัวอย่างดินที่นำมาแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสเก็บจากอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุยจังหวัดเชียงใหม่ จำแนกได้ดังนี้
   2.1 ดินบริเวณน้ำตกมณฑาธาร 11 ตัวอย่าง
   2.2 ดินบริเวณแหลมสนและห้วยคอกม้า 10 ตัวอย่าง
3. เชื้อแอคติโนมัยซีสที่เก็บรักษาไว้ที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. อาหารที่ใช้สำหรับแยกและเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีส (ภาคผนวก ก.)
   4.1 starch casein agar
   4.2 Hickey Tresner (HT)
   4.3 humic acid vitamin (HV)
   4.4 nutrient agar (NA)
   4.5 Bennet's agar
   4.6 oat meal mannitol agar
   4.7 potato dextrose agar (PDA)
   4.8 yeast extract agar (YEA)
   4.9 อาหาร ISP (International Streptomycetes Projects) medium No. 1, 2, 3 และ 4
   4.10 อาหารสำหรับทดสอบmannanaseโดยวิธี gel diffusion assay
   4.11 อาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed medium)
   4.12 อาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเพื่อการผลิตเอนไซม์ (cultivation medium)
5. สารเคมี (ภาคผนวก ข.)
   5.1 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
      5.1.1 DNS reagent

5.1.2 sodium-potassium tartrate 40%

5.2 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบ mannanase โดยวิธี gel diffusion assay

5.2.1 citrate 0.1 M - phosphate buffer 0.2 M pH 5.0

5.2.2 K_2HPO_4 0.2 M

5.2.3 Congo red 1.0 %(w/v)

5.2.4 NaCl 1 M

5.3 sodium acetate buffer 0.1 M

5.4 phosphate buffer 0.1 M

6. เครื่องมือ

6.1 Spectrophotometer รุ่น UV 2100	ยี่ห้อ Shimadzu
6.2 Incubator shaker	ยี่ห้อ Lab-Line
6.3 Reciprocal shaker รุ่น NR-80	ยี่ห้อ Taitec
6.4 Incubator	ยี่ห้อ Memmert
6.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	ยี่ห้อ Memmert
6.6 pH meter รุ่น F 21	ยี่ห้อ Horiba
6.7 หม้อนึ่งอัดไอ รุ่น SS-325	ยี่ห้อ Tomy
6.8 Hot air oven	ยี่ห้อ Heraeus
6.9 เครื่องชั่งอย่างละเอียด	ยี่ห้อ Sartorius
6.10 กล้องจุลทรรศน์	ยี่ห้อ Olympus
6.11 เครื่องเหวี่ยง รุ่น EBA 12R	ยี่ห้อ Hettich
6.12 ตู้ถ่ายเชื้อ รุ่น TL 2448	ยี่ห้อ Holten
6.13 ตู้เย็นเก็บสารเคมี	

7. อุปกรณ์อื่นๆ

7.1 หลอดทดลองขนาด 16 $\times$ 100 มิลลิลิตร

7.2 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250, 1,000 มิลลิลิตร

7.3 ขวดปรับปริมาตรขนาด 100, 500 มิลลิลิตร

7.4 ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร

7.5 บีกเกอร์ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

7.6 กระบอกตวงขนาด 50, 250 และ 500 มิลลิลิตร

Chiang Mai University

7.7 Micropipette ปรับปริมาตรได้ขนาด 2-20 ไมโครลิตร, 40-200 ไมโครลิตรและ 200-1,000 ไมโครลิตร

7.8 ห่วงถ่ายเชื้อ

7.9 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการทดลอง

1. การแยกแอคติโนมัยซีส จากรากพืช

รากพืชที่นำมาแยกเชื้อจะต้องเป็นรากจากพืชที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงซึ่งได้แก่ รากกล้วยไม้แคทลียา รากข่า รากกล้วยน้ำว้า และรากตะไคร้ แล้วนำมาทำการทดลองดังต่อไปนี้

1. นำรากพืชมาล้างเอาดินออกให้สะอาด แล้วแช่ในน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที
2. ฆ่าเชื้อบริเวณผิวรอบรากพืชโดยแช่ใน sodium hypochlorite 5.25% (w/v) 3 นาที
3. ซับรากพืชให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดรากพืชให้เป็นชิ้นๆละ 1 เซนติเมตร
4. วางรากพืชบนอาหาร starch casein medium ที่มี nystatin, cyclohexamide และ nalidixic acid อยู่อย่างละ 50 ppm
5. บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C สังเกตดูการเจริญของเชื้อรอบๆรากพืชทุกวัน
6. ถ้ามีเชื้อขึ้น ทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์บน HT agar

2. การแยกแอคติโนมัยซีสจากดิน

การแยกแอคติโนมัยซีสจากดินบริเวณน้ำตกมณฑาธาร

1. เก็บดินบริเวณ ที่มีซากใบไม้และกิ่งไม้ผุทับถมอยู่
2. ผึ่งดินให้แห้ง 2 วัน แล้วใช้โกร่งบดเม็ดดินให้ละเอียด
3. นำดินที่ผึ่งแห้งและบดแล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนถึง 10^{-3} (1:1000)
4. นำสารละลายจากข้อ 3 มา 0.1-0.2 ml แล้ว spread plate ลงบน humic acid vitamin agar ที่มี cyclohexamide ผสมอยู่ 50 ppm บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์
5. สังเกตดูโคโลนีที่แห้ง หยาบและเป็นปุยสั้นๆ ประกอบกับการดูด้วย stereomicroscope ว่าเป็นแอคติโนมัยซีสแล้วจึงแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์บน HT agar อีกครั้งหนึ่ง
   แอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินบริเวณนี้ให้ code เป็น HV

การแยกแอคติโนมัยซีสจากดินบริเวณแหลมสนและห้วยคอกม้า

1. เก็บดินบริเวณ ที่มีซากใบไม้และกิ่งไม้ผุทับถมอยู่
2. ผึ่งดินให้แห้ง 2 วัน แล้วใช้โกร่งบดเม็ดดินให้ละเอียด
3. นำดินไปอบในตู้อบด้วยอุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ดินที่อบแล้ว 1 g เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 9 ml
5. นำส่วนผสมจากข้อ 4 มา 0.5 ml แล้วเติมลงใน
   - 5.1 สารละลาย phosphate buffer 5 mM pH7.0 4.5 ml ที่มี benzethonium chloride 0.01% ผสมอยู่
   - 5.2 สารละลาย phosphate buffer 5 mM pH7.0 4.5 ml ที่มี benzethonium chloride 0.03 % ผสมอยู่
   - 5.3 น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 4.5 ml (control)
6. นำสารละลายทั้ง 3 หลอดบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที
7. นำสารละลายแต่ละหลอดมา 1 ml เจือจางในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 9 ml
8. จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากข้อ 7 มา 0.1 หรือ 0.2 ml แล้ว spread ลงบน humic acid vitamin agar ที่มี cyclohexamide 50 ppm และ nalidixic acid 20 ppm ผสมอยู่บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์
9. สังเกตดูโคโลนีที่แห้ง หยาบและเป็นปุยสั้นๆ ประกอบกับการดูด้วย stereomicroscope ว่าเป็นแอคติโนมัยซีสแล้วจึงแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร HT agar อีกครั้งหนึ่ง

แอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากข้อ 5.1, 5.2 และ 5.3 ให้ code เป็น KMS, KMD และ KMC ตามลำดับ

3. การทดสอบแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ที่ผลิต mannanase โดยวิธี gel diffusion assay (Downie *et al*, 1994)

1. เพาะเชื้อแอคติโนมัยซีสที่บริสุทธิ์บน HT agar ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน
2. นำเชื้อจากข้อ 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว cultivation medium (วรางคณา, 2539) 3 ml ที่อยู่ในหลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิห้องเขย่าแบบซ้าย-ขวาด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4วัน แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปทำการทดสอบต่อไป

3. นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 2 มา 10 μ l หยอดลงในหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 mm ของจานอาหารแข็งสำหรับการทดสอบ mannanase แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง
4. เท K_2HPO_4 0.2 M ลงไปพร้อมกับเขย่าเป็นระยะๆเป็นเวลา 30 นาทีแล้วจึงเททิ้ง
5. ย้อมทับด้วย Congo red 1.0 %(w/v) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเททิ้ง
6. ล้างด้วย NaCl 1 M จนสามารถสังเกตเห็นวงใสได้ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

4. การทดสอบแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ที่ผลิต mannanase โดยวิธี DNS method

1. เลี้ยงแอคติโนมัยซีสที่สามารถให้วงใสกับการทดสอบโดยวิธี gel diffusion assay บน HT agar ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน
2. นำแอคติโนมัยซีสจากข้อ 1 มาเลี้ยงใน seed medium 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml โดยเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน
3. ใช้กล้าเชื้อ 2 ml ใส่ลงใน cultivation medium (วรางคณา, 2539) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วันเก็บตัวอย่างโดยนำมาเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็น crude enzyme ไปตรวจวัด enzyme activity และวัดปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ค) คัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิต mannanase ได้สูงสุดมาทำการศึกษาต่อไป

5. การศึกษาการเจริญของเชื้อ แอคติโนมัยซีส E2/22 บนอาหารแข็ง

5.1 การเจริญบนอาหารชนิดต่างๆ

เพาะเชื้อ แอคติโนมัยซีส E2/22 บน HT agar, nutrient agar, Bennet's agar, oat meal mannitol agar, potato dextrose agar, yeast extract agar, ISP medium No.1, 2, 3, 4 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจดูลักษณะการเจริญของเชื้อ

5.2 pH เริ่มต้นของอาหาร

เพาะเชื้อบน HT agar และ nutrient agar ที่มี pH เริ่มต้น 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจดูลักษณะการเจริญของเชื้อ

5.3 อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ

เพาะเชื้อบน HT agar และ nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 28°C , 30°C , 37°C และ 45°C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจดูลักษณะการเจริญของเชื้อ

6. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการศึกษาสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีส E2/22

6.1 การย่อยเคซีน

เพาะเชื้อบน casein agar ให้เป็นวงกว้างประมาณ 10 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วันตรวจดูการย่อยเคซีน โดยดูจากวงใสรอบๆบริเวณที่เชื้อเจริญหรือตรงใต้โคโลนี

6.2 การย่อยแป้ง

เพาะเชื้อบน strarch hydrolysis agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน ใช้ Gram's iodine ราดบริเวณที่เชื้อเจริญ ถ้าเชื้อย่อยแป้งได้จะเห็นวงใสรอบๆโคโลนี ถ้าเชื้อไม่ย่อยแป้งจะเห็นสีน้ำเงินเข้มบริเวณรอบๆโคโลนี

6.3 การย่อยเจลาติน

เพาะเชื้อใน gelatin agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วันตรวจดูการย่อยเจลาตินโดยนำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ้าอาหารเหลวแสดงว่าเชื้อสามารถย่อยเจลาตินได้

6.4 การรีดิวซ์ไนเตรท

เพาะเชื้อบน nitrate agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน หยดสารละลาย sulfanilic acid และ α-napthylamine ลงบนอาหารที่มีเชื้อเจริญ ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก

6.5 การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

เพาะเชื้อบน TSI agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน ถ้าเชื้อสามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จะเห็นสีดำปรากฏในเนื้ออาหาร

6.6 การทนเกลือ

เพาะเชื้อบน nutrient agar ที่มี NaCl 0, 2, 4 และ 6 % บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน สังเกตดูการเจริญของเชื้อ

6.7 สัณฐานวิทยา

เขี่ยเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ หรือทำ slide culture ย้อมสีแกรม แล้วตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

7. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลต่อการผลิต mannanase โดย *Streptomyces* sp. E2/22

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase ได้แก่ สูตรอาหารพื้นฐานสำหรับผลิต mannanase ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน pH เริ่มต้นของอาหาร อุณหภูมิที่เหมาะสม และเวลาที่เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด

7.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิต mannanase

การเตรียมกล้าเชื้อ (seed inoculum)

เพาะเชื้อ *Streptomyces* sp. E2/22 ในอาหารวุ้นเอียง Hickey Tresner's agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อจำนวน 1 loop มาเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย mannitol 1.0 %(w/v), peptone 0.2 %(w/v), beef extract 0.1 %(w/v), yeast extract 0.1 %(w/v) pH 7.0 ปริมาณ 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วันใช้กล้าเชื้อ 2 ml ใส่ลงในอาหารสำหรับการผลิตเอนไซม์สูตรที่ 1- 4 (ภาคผนวก ก) 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างโดยนำมาเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็น crude enzyme ไปตรวจวัด mannanase activity และวัดปริมาณโปรตีน

7.2 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต mannaase

เตรียมหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. E2/22 เหมือนข้อ 7.1 นำ suspension ของเชื้อ 2 ml ถ่ายลงในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ปริมาตร 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ซึ่งประกอบด้วย peptone 0.5 %(w/v), KH_2PO_4 0.05 %(w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 %(w/v)pH 6.5 แล้วเติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 15 ชนิดคือ glucose, galactose, fructose, lactose, maltose, xylose, mannose, mannitol, sorbitol, soluble starch, locust bean gum, กากมะพร้าวป่น, แป้งบุก, mannan จาก *Acacia variabilis* และ mannan จาก *Acacia campanulatus* โดยเติมในปริมาณ 1.0 %(w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 ° C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วันเมื่อครบเวลาแล้วนำของเหลวที่ได้ไปปั่นแยกเอาเซลล์ออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงแยกเอาส่วนใสไปทดสอบ mannanase activity และวัดปริมาณโปรตีนต่อไป

7.3 การศึกษาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase

เตรียมหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. E2/22 เหมือนข้อ 7.1 นำ suspension ของเชื้อ 2 ml ถ่ายลงในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ปริมาตร 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ซึ่งประกอบด้วย peptone 0.5 %(w/v), KH_2PO_4 0.05 %(w/v)และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 %(w/v) แล้วเติม locust bean gum ในปริมาณต่างๆกันคือ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 %(w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 ° C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วันเมื่อครบเวลาแล้วนำของเหลวที่ได้ไปปั่นแยกเอาเซลล์ออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยง แยกเอาส่วนใสไปทดสอบ mannanase activity และวัดปริมาณโปรตีนต่อไป

7.4 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต mananase

เตรียมหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. E2/22 เหมือนข้อ 7.1 นำ suspension ของเชื้อ 2 ml ถ่ายลงในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ปริมาตร 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ซึ่งประกอบด้วย locust bean gum 2.5 %(w/v), KH_2PO_4 0.05%(w/v) และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v) และมีแหล่งในโตรเจนที่แตกต่างกัน 9 ชนิดคือ peptone, casein, casitone, beef extract, soy bean meal, tryptone, urea, $NaNO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วันเมื่อครบเวลาแล้วนำของเหลวที่ได้ไปปั่นแยกเอาเซลล์ออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยง แยกเอาส่วนใสไปทดสอบ mannannase activity และวัดปริมาณโปรตีนต่อไป

7.5 การศึกษาปริมาณในโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase

เตรียมหัวเชื้อโดยเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. E2/22 เหมือนข้อ 7.1 นำ suspension ของเชื้อ 2 ml ถ่ายลงในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ปริมาตร 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ซึ่งประกอบด้วย locust bean gum 2.5 %(w/v), KH_2PO_4 0.05 %(w/v) และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 %(w/v) มีแหล่งในโตรเจนคือ peptone ในปริมาณต่างๆคือ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 %(w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วันเมื่อครบเวลาแล้วนำของเหลวที่ได้ไปปั่นแยกเอาเซลล์ออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยง แยกเอาส่วนใสไปทดสอบ mannanase activity และวัดปริมาณโปรตีนต่อไป

7.6 การศึกษาค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase

เตรียมหัวเชื้อโดยเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. E2/22 ลงใน HT บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วันแล้วถ่ายเชื้อลงใน seed medium 50 ml ที่มีขดลวดสปริงอยู่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 วันแล้วนำ suspension ของเชื้อ 2 ml ถ่ายลงในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ที่ได้ศึกษาชนิดและปริมาณของคาร์บอนและในโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แล้วปริมาตร 50 ml บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ซึ่งประกอบด้วย locust bean gum 2.5 %(w/v), peptone 0.5 %(w/v), KH_2PO_4 0.05 %(w/v) และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 %(w/v) แล้วปรับ pH ให้ได้ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 โดยใช้ 1 M NaOH และ 1 M HCl บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วันเมื่อครบเวลาแล้วนำของเหลวที่ได้ปั่นแยกเอาเซลล์ออกโดยใช้เครื่องแยกเอาส่วนใสไปทดสอบ mannanase activity และวัดปริมาณโปรตีนต่อไป

7.7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase และ galactanase

เตรียมหัวเชื้อโดยเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. E2/22 เหมือนข้อ 7.6 นำ suspension ของเชื้อ 2 ml ถ่ายลงในอาหารที่ผ่านการทดสอบแล้วจากข้อ 7.6 ปริมาตร 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ซึ่งประกอบด้วย locust bean gum 2.5 %(w/v), peptone 0.5 %(w/v), KH_2PO_4 0.05 %

(w/v) และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 %(w/v) pH 5.0 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 ° C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วันจากนั้นเก็บน้ำที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาทำการทดสอบการทำงานของ mannanase, galactanase และวัดปริมาณโปรตีน

7.8 การศึกษาไคเนติกของ mannanase, galactanase และ β-mannosidase โดย *Streptomyces* sp. E2/22

เตรียมหัวเชื้อโดยเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. E2/22 เหมือนข้อ 7.6 แล้วนำ suspension ของเชื้อ 2 ml ถ่ายลงในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ปริมาตร 50 ml บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ซึ่งประกอบด้วย locust bean gum 2.5 %(w/v), peptone 0.5 %(w/v), KH_2PO_4 0.05 %(w/v) และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 %(w/v) pH 5.0 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ30 ° C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บน้ำที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทุกๆ 12 ชั่วโมงจนถึงเวลา 108 ชั่วโมงโดยนำแต่ละตัวอย่างที่ได้ปั่นแยกเอาเซลล์ออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 ° C เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนใสไปทดสอบ enzyme activity วัดปริมาณโปรตีน และชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์

8. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของ crude enzyme จาก *Streptomyces* sp. E2/22

8.1 ผลของ pH

ตรวจวัด mannanase activity โดยเตรียมส่วนผสม ดังภาคผนวก ค แต่ใช้ buffer ที่ pH ต่างๆ ดังนี้ pH 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5 ใช้ sodium acetate buffer 0.1 M ส่วน pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ใช้ phosphate buffer 0.1M บ่มที่อุณหภูมิ 50 ° C เป็นเวลา 30 นาทีแล้วตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่

8.2 ผลของอุณหภูมิ

ตรวจวัด mananase activity เตรียมส่วนผสม ดังภาคผนวก คใช้ phosphate buffer 0.1 M pH 6.5 เป็นตัวละลายสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 ° C เป็นเวลา 30 นาทีแล้วตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่

8.3 ผลของช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยา

ตรวจวัด mannanase activity เตรียมส่วนผสม ดังภาคผนวก คโดยใช้ phosphate buffer 0.1 M pH 6.5 เป็นตัวละลายสับสเตรทบ่มที่อุณหภูมิ 50° C เป็นเวลา 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 และ 480 นาทีส่วนที่อุณหภูมิ 60° C บ่มเอนไซม์กับสับสเตรทเป็นเวลา 30, 60, 120, 180 และ 240 นาทีแล้วตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่

9. การตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มสับสเตรทกับ crude enzyme

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มสับสเตรทกับ crude enzyme ด้วยวิธี Thin layer chromatography โดยนำ crude enzyme 0.5 ml กับสับสเตรท 0.5 ml ซึ่งเป็น locust bean gum หรือ gum arabic 1 %(w/v) ใน sodium acetate buffer 0.1 M pH 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนำของเหลวที่ได้ 5 μ l หยดลงบนแผ่น silica gel 60F254 (Merck) โดยใช้หลอด capillary แล้วนำไปจุ่มลงในถังที่อิ่มตัวด้วยไอของสารละลายซึ่งประกอบด้วย n-butanol : 2-propane : H_2O : acetic acid ในอัตราส่วน 7 : 5 : 4 : 2 เมื่อสารละลายเคลื่อนที่ไปถึงระดับ solvent front แล้วนำออกมาผึ่งให้แห้งแล้วใช้ develop spot ซึ่งประกอบด้วย ethanol : H_2SO_4 : *p*-anisaldehyde ในอัตราส่วน 18 : 1 : 1 พ่นให้ทั่วแล้วนำแผ่น silica gel นี้ไปอบในตู้อบด้วยอุณหภูมิ 110° C ประมาณ 3 นาที บันทึกระยะทางที่สารเคลื่อนที่เทียบกับสารละลายมาตรฐาน 1% mannose และ galactose