ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Cycloheximide	50	มิลลิกรัม
Agar	15	กรัม
น้ำมันมะกอก	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH	7.0	

ผสมส่วนประกอบทั้งหมด ยกเว้นน้ำมันมะกอกให้เข้ากัน ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย เติมน้ำมันมะกอกผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ที่อัตราเร็ว 18,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งไว้จนอุณหภูมิลดลงประมาณ 50 – 55 องศาเซลเซียส เติม Cycloheximide

2. Nutrient agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH	7.0	

ผสมส่วนประกอบทั้งหมด ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 ฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. **อาหารคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นต้น** (Emulsion Tributyrin Agar)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Tributyrin	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นไตรบิวทิริน ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย เติมไตรบิวทิริน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ที่อัตราเร็ว 18,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. อาหารทดสอบความสามารถในการผลิตกรดขั้นยืนยัน

4.1 Olive oil liquid medium สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น

$(NH_4)_2SO_4$	5.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.3	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Olive oil	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นน้ำมันมะกอก บรรจุหลอดทดลองขนาดกลางปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมน้ำมันมะกอกลงในแต่ละหลอดให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4.2 Olive oil liquid medium ที่เติม bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์

สูตรอาหารเหมือนข้อ 4.1 เติม 1.6 % bromocresol purple ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ในอาหาร 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองขนาดใหญ่ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. อาหารสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสขั้นยืนยัน

5.1 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น

$(NH_4)_2SO_4$	1.3	กรัม
K_2HPO_4	0.9	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Olive oil	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ยกเว้นน้ำมันมะกอก บรรจุอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในฟลาสก์รูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำมันมะกอกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5.2 อาหารสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมเหมือนข้อ 5.1 ยกเว้นให้เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์

6. อาการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Glycerol	150	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	850	มิลลิลิตร
pH 7.0		

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.0 นำไปให้ความร้อนจนวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

1. การเตรียมสับสเตรท

1.1 สับสเตรท ประกอบด้วย

โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) 2 เปอร์เซ็นต์	45	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	45	มิลลิลิตร
น้ำมันมะกอก	10	มิลลิลิตร

ชั่ง PVA 20 กรัม ละลายในน้ำอุ่น (75-85 องศาเซลเซียส) 800 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็กจน PVA ละลายหมด ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดแช่ในเครื่องทำความเย็นอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เมื่อสารละลายทั้งหมดมีอุณหภูมิลดลงจนเกือบถึง 0 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาผสมกันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ที่ความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บสับสเตรทที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 สัปดาห์

1.2 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ในน้ำกลั่นซึ่งผ่านการต้ม และเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ได้สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล จากนั้นแบ่งสารละลายดังกล่าว 50 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นซึ่งผ่านการต้ม และเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปริมาตร 1 ลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล ตามต้องการ สารละลายมาตรฐานนี้ต้องมีการเทียบมาตรฐานกับโพแทสเซียมไฮโดรเจน-พทาเลททุกครั้งก่อนนำไปใช้

การเทียบมาตรฐานสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยการอบโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท ($C_8H_5KO_4$) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้น ชั่งอย่างละเอียดมา 0.10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ (เตรียมโดยต้มน้ำกลั่นให้เดือดประมาณ 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายฟีนอล์ฟธาลีนปริมาตร 50 ไมโครลิตร (2-3 หยด) นำไปไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 นอร์มอลที่เตรียมไว้ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู ทิ้งไว้ 30 วินาที จนสีชมพูไม่จางหายแสดงว่าถึงจุดยุติ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์} = \frac{\text{กรัมของ } C_8H_5KO_4 \times 1000}{\text{ปริมาตรของ NaOH} \times 204.22}$$

1.3 สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่งฟีนอล์ฟธาลีน (Phenolphthalein) 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

1.4 สารยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์

ผสมอะซิโตนกับแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร

1.5 สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์พีเอช 7

สารละลาย A : ชั่งสาร monobasic sodium phosphate 27.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย B : ชั่งสาร dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัม) ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

นำสารละลาย A 39 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 61 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7

2. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์จะทำโดยดัดแปลงวิธีการที่อธิบายไว้โดย Horani (1996)

2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

นำสับสเตรทที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์พีเอช 7 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร. และสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกันในฟลาสก์รูปกรวยขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเริ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมสารยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์ (ภาคผนวก ข ข้อ1.4) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟธาลีน (ภาคผนวก ก ข้อ1.3) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 นอร์มอล (ภาคผนวก ข ข้อ1.2) จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูและไม่จางหายไปภายใน 30 วินาที ถือว่าเป็นจุดยุติ

blank ดำเนินการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปสแต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแทน crude enzyme

2.2 การคำนวณหน่วยเอนไซม์

1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยไขมันได้เป็นกรดไขมันในรูปของกรดโอเลอิก 1 ไมโครโมล ต่อ 1 มิลลิลิตรของเอนไซม์ ต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

$$\text{Enzyme unit} = \frac{M - M0}{\text{Slope}}$$

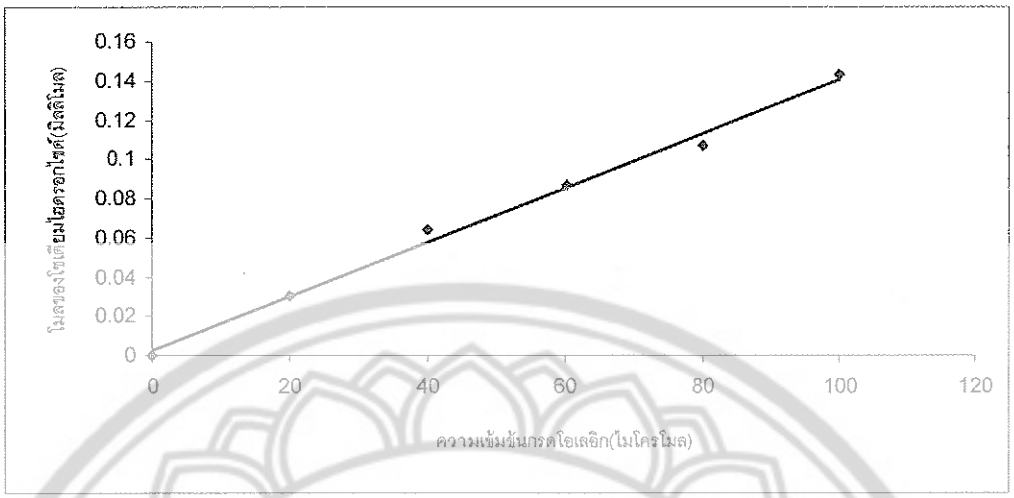
กำหนดให้ M = ไมโครโมลของ NaOH ที่ถูกใช้ในการทำปฏิกิริยา
(คำนวณจากปริมาตรของ NaOH X ความเข้มข้นของ NaOH)

M0 = ไมโครโมลของ NaOH ที่ถูกใช้ในการทำปฏิกิริยากับ blank
(คำนวณจากปริมาตรของ NaOH X ความเข้มข้นของ NaOH)

Slope = ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก

3. กราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก

ชั่งกรดโอเลอิกที่มีความบริสุทธิ์สูงมา 0.2825 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างแอบโซลูทแอลกอฮอล์กับไดเอธิลอีเทอร์ อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร สารละลายที่ได้เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายดังกล่าว 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร (จะได้สารละลายเท่ากับ 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครโมล) ใส่ในฟลาสก์รูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายผสม 50 มิลลิลิตร และสารละลายฟีนอล์ฟธาลีนปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนและไม่จางหายไปภายใน 30 วินาที นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของกรดโอเลอิกกับปริมาณของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท หาค่าความชันเพื่อใช้ในการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส



ภาพ 10 กราฟมาตรฐานกรดโอเลอิกที่มีค่าความชัน 1.4×10^{-3}

ภาคผนวก ค สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry, 1951)

1. สารเคมี

1.1 เตรียม Bovine serum albumin ให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น

1.2 เตรียม Alkaline copper solution จากสารละลาย

A : 2% Na_2CO_3 ใน 0.1 NaOH

B : 1% $CuSO_4.5H_2O$

C : 2% Sodium Potassium Tatrate

อัตราส่วนของ A:B:C: คือ 100 : 1 : 1 โดยปริมาตร

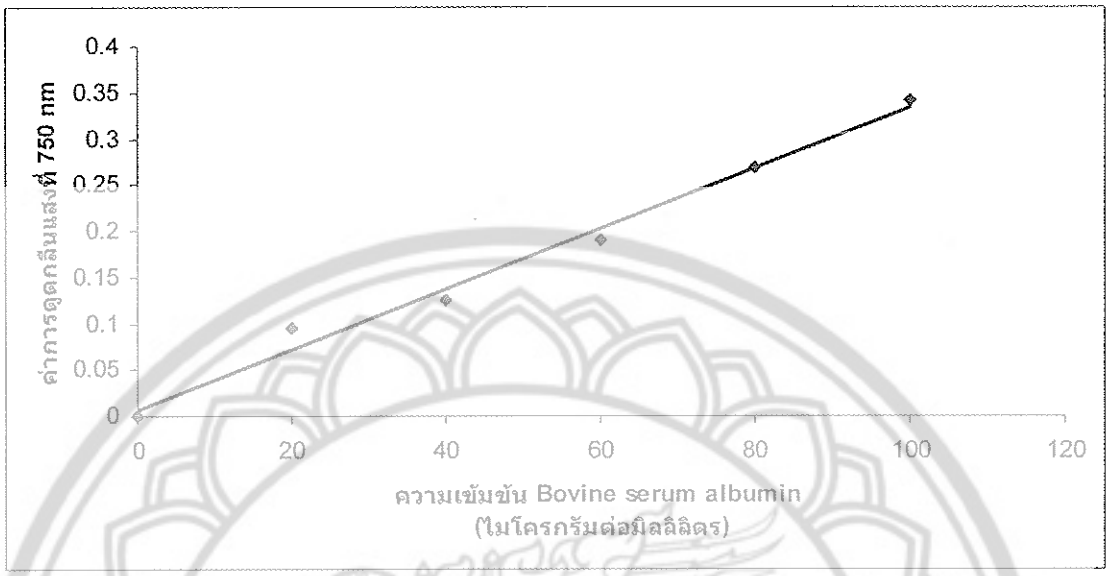
1.3 เตรียมสารละลาย Folinciocalteu (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:1)

1.4 เตรียมสารละลายตัวอย่างดังตาราง

สารละลาย (มิลลิลิตร)	หลอดที่						
	1	2	3	4	5	6	7
น้ำกลั่น	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	-	0.6
สารละลายมาตรฐาน BSA (0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
สารละลายโปรตีนตัวอย่าง	-	-	-	-	-	-	0.4
สารละลาย alkaline $CuSO_4$	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
สารละลาย Folinciocalteu	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

2. กราฟมาตรฐานโปรตีน

นำ Bovine serum albumin (ภาคผนวก ค ข้อ 1.1) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 , 0.4, 0.6 และ 0.8 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.8, 0.6, 0.4 และ 0.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติมสารละลาย Alkaline $CuSO_4$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folinciocalteu ที่เตรียมไว้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วทำการวัดค่า OD_{750} nm จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐานและค่า OD ที่วัดได้เพื่อทำการเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง



ภาพ 11 กราฟมาตรฐานโปรตีนที่มีค่าความชัน 3.3 X 10^{-3}

ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

เก็บตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากอาหาร โดยใช้เครื่องปั่นแยกควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์และค่าปริมาณโปรตีน ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และละลายตะกอนเซลล์กลับด้วยน้ำกลั่นปริมาตรเหมาะสมแล้วเทลงในถ้วยอลูมิเนียม ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นนำมาชั่งจนได้น้ำหนักคงที่ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ค่าที่ได้จากการชั่งน้ำหนักนำไปคำนวณปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจากสูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักหลังอบ}) * 1000}{5}$$