บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือ

1.1 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, CX31, United States)

1.2 กล้องสเตอริโอ (Nikon, Model XN, Japan)

1.3 เครื่องปั่นแยกควบคุมอุณหภูมิ (Beckman, Avanti™ 30 Centrifuge, United States)

1.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick Scientific, Innova™ Incubator Shaker 4340, United States)

1.5 เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (Pharmacia, Novaspec II, Sweden)

1.6 เครื่องวัดค่าพีเอช (Mettler Toledo, SevenEasy, Switzerland)

1.7 เครื่องผสมสาร (Scientific industries, Vortex Genie -2, United States)

1.8 เครื่องชั่งแบบใช้ไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (Precisa, 6100 C, Switzerland)

1.9 เครื่องชั่งแบบใช้ไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Switzerland)

1.10 ตู้แช่แข็ง -50 องศาเซลเซียส (CL Hetofrig, Heto -80 °C, Denmark)

1.11 ตู้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Distar, Dr-490, China)

1.12 ตู้บ่มเชื้อ (Shel-Lab, model 1565, El Salvador)

1.13 ตู้ปลอดเชื้อ (Holten Lamin Air, HVR 2472, England)

1.14 ตู้ดูดควัน (Labcaire, Airone green, United States)

1.15 ตู้อบความร้อน (Memmert, UNB 400, Germany)

1.16 เตาอบไมโครเวฟ (Sanyo, Micro/Convention, Japan)

1.17 เตาไฟฟ้าพร้อมกวนสารด้วยแม่เหล็ก (Bibby, HT2, United Kingdom)

1.18 หม้อนึ่งความดันไอน้ำแบบใช้ไฟฟ้า (Tomy Autoclave, SS-245, Japan)

1.19 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (JS Research, JSSB-30T, South Korea)

1.20 โฮโมจีไนเซอร์ (Kinematica, Polytron TI-10-35, Switzerland)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1 Acetone (Ajack Finechem, Australia)

2.2 Agar-agar (Merck KGaA, Germany)

2.3 Beef extract (Bacton, Dickinson and Company, France)

2.4 Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, United States)

2.5 Bromocresol purple (BCP) (Merck KGaA, Germany)

2.6 Calcium carbonate (Merck KGaA, Germany)

2.7 Copper sulfate (Merck KGaA, Germany)

2.8 Cycloheximide (Sigma, United States)

2.9 Diethyl ether (Merck KGaA, Germany)

2.10 Disodium hydrogen phosphate (Merck KGaA, Germany)

2.11 Folin-Ciocalteu's reagent (Merck KGaA, Germany)

2.12 Hydrochloric acid (Ajack Finechem, Australia)

2.13 Magnesium sulfate (Merck KGaA, Germany)

2.14 Olive oil (Bertolli extra light, Italy)

2.15 Oleic acid (Sigma, United States)

2.16 Peptone (Merck KGaA, Germany)

2.17 Phenolphthalein (Merck KGaA, Germany)

2.18 Polyvinyl alcohol (PVA) (Sigma, United States)

2.19 Potassium sodium tartrate (Sigma, United States)

2.20 Potassium hydrogen phosphate (Merck KGaA, Germany)

2.21 Sodium dihydrogen phosphate (Merck KGaA, Germany)

2.22 Sodium hydroxide (Merck KGaA, Germany)

2.23 Tributyrin (Sigma, United States)

2.24 Yeast extract (Merck KGaA, Germany)

2.25 Ethanol 95% (Merck KGaA, Germany)

การเก็บดินตัวอย่าง

เก็บดินตัวอย่างจากป่าผลัดใบ ป่าไม่ผลัดใบและทุ่งหญ้าของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าเขาค้อ อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว อุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง และอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า ชนิดของป่าและจำนวนดินตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาสรุปในตาราง 2 บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ของบริเวณที่เก็บตัวอย่างด้วยเครื่องจีพีเอช (Global Positioning System, GPS) ดินตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาเก็บจากบริเวณโคนต้นไม้ที่ให้น้ำมันหรือน้ำยาง เช่น สนสองใบ สนสามใบ ยางนา ยางแดง กฤษณา และอบเชย รวมทั้งพืชอื่นอีกหลายชนิด โดยก่อนเก็บดินตัวอย่างต้องแยกส่วนฮิวมัสที่ทับถมกันอยู่ด้านบนออก ขุดและเก็บดินตัวอย่างที่ระดับความลึกไม่เกิน 15 เซนติเมตร เก็บดินตัวอย่างประมาณ 200 – 300 กรัม จากแต่ละจุด ก่อนบรรจุลงในถุงเก็บตัวอย่างภายในถังแช่ตัวอย่าง และจดบันทึกรายละเอียด

ตาราง 2 แสดงแหล่งเก็บดินตัวอย่าง ชนิดของป่า และจำนวนดินตัวอย่าง

ชนิดป่า	อช. น้ำหนาว	อช. ทุ่งแสลงหลวง	อช. ภูหินร่องกล้า	เขตห้ามล่าสัตว์ป่าเขาค้อ
ป่าดิบเขา	4	4	4	4
ป่าดิบแล้ง	–	4	–	4
ป่าดิบชื้น	4	–	–	4
ป่าเต็งรัง	4	–	4	–
ป่าสน	4	4	4	–
ป่าเบญจพรรณ	4	–	–	–
ทุ่งหญ้า	–	4	–	4

หมายเหตุ: อช. คือ อุทยานแห่งชาติ

ตาราง 3 แสดงพื้นที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ บริเวณและชนิดพืชที่เก็บดินตัวอย่าง

พื้นที่และชนิดป่าไม้	พืชที่เก็บดินตัวอย่าง	ระดับความสูง (เมตร)	พิกัดทางภูมิศาสตร์(ละติจูด ลองติจูด)
เขตห้ามล่าสัตว์ป่าเขาค้อ			
ทุ่งหญ้า			
ตำแหน่ง 1	หญ้าคา	993	N 16° 35'18.2" E 100° 59'06.0"
ตำแหน่ง 2	หญ้าพง	985	N 16° 35'25.7" E 100° 59'10.0"
ตำแหน่ง 3	หญ้าอ้อ	980	N 16° 35'28.1" E 100° 59'14.3"
ตำแหน่ง 4	หญ้าเนียม	973	N 16° 35'33.6" E 100° 59'09.5"
ป่าดิบเขา			
ตำแหน่ง 1	หวายหมี	758	N 16° 37'36.9" E 100° 56' 07.2"
ตำแหน่ง 2	ก่อเดือย	768	N 16° 37'38.6" E 100° 55' 58.9"
ตำแหน่ง 3	ยาง	778	N 16° 37' 46.4" E 100° 55' 53.5"
ตำแหน่ง 4	สนเขา	792	N 16° 37' 49.9" E 100° 55' 49.7"
ป่าดิบชื้น			
ตำแหน่ง 1	กระท้อนป่า	744	N 16° 37' 55.3" E 100° 55' 45.3"
ตำแหน่ง 2	สะตือดง	711	N 16° 38' 01.8" E 100° 55' 44.4"
ตำแหน่ง 3	มะกอกหนัง	739	N 16° 38' 03.4" E 100° 55' 48.1"
ตำแหน่ง 4	เลือดควาย	715	N 16° 38' 06.3" E 100° 55' 50.4"
ป่าดิบแล้ง			
ตำแหน่ง 1	ยาง	753	N 16° 33' 37.4" E 100° 57' 32.3"
ตำแหน่ง 2	ยาง	727	N 16° 35' 50.1" E 100° 57' 29.9"
ตำแหน่ง 3	มะเดื่อป่า	760	N 16° 38' 57.9" E 100° 57' 31.0"
ตำแหน่ง 4	ยาง	785	N 16° 39' 03.0" E 100° 57' 36.0"

ตาราง 3 (ต่อ)

พื้นที่และชนิดป่าไม้	พืชที่เก็บดินตัวอย่าง	ระดับความสูง (เมตร)	พิกัดทางภูมิศาสตร์(ละติจูด ลองติจูด)
อุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง			
ป่าสน			
ตำแหน่ง 1	สนสองใบ	896	N 16° 33' 39.1" E 100° 51' 08.7"
ตำแหน่ง 2	สนสองใบ	915	N 16° 34' 13.7" E 100° 51' 01.2"
ตำแหน่ง 3	สนสองใบ	881	N 16° 34' 46.8" E 100° 51' 05.6"
ตำแหน่ง 4	สนสองใบ	755	N 16° 35' 09.1" E 100° 52' 01.9"
ทุ่งหญ้า			
ตำแหน่งที่ 1	หญ้าคมบาง	926	N 16° 31' 25.8" E 100° 50' 16.8"
ตำแหน่งที่ 2	หญ้าคมบาง	921	N 16° 31' 23.9" E 100° 50' 51.9"
ตำแหน่งที่ 3	หญ้าคมบาง	910	N 16° 31' 59.7" E 100° 50' 56.2"
ตำแหน่งที่ 4	หญ้าขน	921	N 16° 32' 36.5" E 100° 50' 46.8"
ป่าดิบเขา			
ตำแหน่ง 1	ก่อเดือย	749	N 16° 39' 18.2" E 100° 52' 52.5"
ตำแหน่ง 2	ก่อหิน	756	N 16° 33' 18.1" E 100° 52' 58.1"
ตำแหน่ง 3	ก่อตาหมู	742	N 16° 38' 25.3" E 100° 53' 06.6"
ตำแหน่ง 4	ก่อเดือย	753	N 16° 37' 59.1" E 100° 53' 37.9"
ป่าดิบแล้ง			
ตำแหน่ง 1	ยางโดน	686	N 16° 37' 08.2" E 100° 53' 31.7"
ตำแหน่ง 2	ยางนา	764	N 16° 36' 39.5" E 100° 53' 26.2"
ตำแหน่ง 3	ก่อข้าว	715	N 16° 35' 54.5" E 100° 52' 56.0"
ตำแหน่ง 4	ก่อข้าว	705	N 16° 35' 25.9" E 100° 52' 36.1"

ตาราง 3 (ต่อ)

พื้นที่และชนิดป่าไม้	พืชที่เก็บดินตัวอย่าง	ระดับความสูง (เมตร)	พิกัดทางภูมิศาสตร์(ละติจูด ลองติจูด)
อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว			
ป่าสน			
ตำแหน่ง 1	สนสองใบ	889	N 16° 43' 26.3" E 101° 35' 08.9"
ตำแหน่ง 2	สนสามใบ	872	N 16° 43' 17.2" E 101° 35' 19.8"
ตำแหน่ง 3	สนสามใบ	873	N 16° 43' 17.0" E 101° 35' 05.1"
ตำแหน่ง 4	สนสามใบ	875	N 16° 43' 16.3" E 101° 34' 54.9"
ป่าดิบเขา			
ตำแหน่ง 1	มหาปราบ	886	N 16° 44' 36.9" E 101° 34' 29.9"
ตำแหน่ง 2	อบเชย	867	N 16° 44' 31.2" E 101° 34' 27.5"
ตำแหน่ง 3	อบเชย	854	N 16° 44' 34.1" E 101° 34' 21.4"
ตำแหน่ง 4	กฤษณา	843	N 16° 44' 30.0" E 101° 34' 22.6"
ป่าเต็งรัง			
ตำแหน่ง 1	เต็ง	775	N 16° 42' 09.4" E 101° 38' 53.8"
ตำแหน่ง 2	เต็ง	784	N 16° 42' 14.9" E 101° 38' 56.4"
ตำแหน่ง 3	รัง	768	N 16° 42' 19.1" E 101° 39' 03.4"
ตำแหน่ง 4	รัง	761	N 16° 42' 15.0" E 101° 39' 05.9"
ป่าเบญจพรรณ			
ตำแหน่ง 1	ยมหอม	446	N 16° 41' 08.0" E 101° 40' 02.0"
ตำแหน่ง 2	ไม้แดง	518	N 16° 41' 12.6" E 101° 39' 59.3"
ตำแหน่ง 3	มะค่า	540	N 16° 41' 16.5" E 101° 40' 06.0"
ตำแหน่ง 4	ไม้แดง	558	N 16° 41' 19.8" E 101° 39' 58.5"

ตาราง 3 (ต่อ)

พื้นที่และชนิดป่าไม้	พืชที่เก็บดินตัวอย่าง	ระดับความสูง (เมตร)	พิกัดทางภูมิศาสตร์(ละติจูด ลองติจูด)
ป่าดิบชื้น			
ตำแหน่ง 1	ยาง	880	N 16° 42' 37.2" E 101° 35' 53.2"
ตำแหน่ง 2	ยาง	880	N 16° 42' 34.3" E 101° 35' 48.3"
ตำแหน่ง 3	ยาง	885	N 16° 42' 31.5" E 101° 35' 48.3"
ตำแหน่ง 4	ตะเคียน	875	N 16° 42' 30.2" E 101° 35' 53.8"
อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า			
ป่าสน			
ตำแหน่ง 1	สนสองใบ	1071	N 17° 00' 45.1" E 100° 59' 53.7"
ตำแหน่ง 2	สนสองใบ	1109	N 17° 00' 29.4" E 100° 59' 52.6"
ตำแหน่ง 3	สนสามใบ	1115	N 17° 00' 28.4" E 100° 59' 43.7"
ตำแหน่ง 4	สนสามใบ	1142	N 17° 00' 18.6" E 100° 59' 35.6"
ป่าดิบเขา			
ตำแหน่ง 1	ก่อ	1645	N 16° 56' 48.0" E 101° 03' 31.4"
ตำแหน่ง 2	ยางแดง	1596	N 16° 56' 37.9" E 101° 03' 13.9"
ตำแหน่ง 3	เมเปิล	1638	N 16° 56' 12.9" E 101° 03' 11.4"
ตำแหน่ง 4	ยางแดง	1650	N 16° 55' 56.5" E 101° 03' 11.8"
ป่าเต็งรัง			
ตำแหน่ง 1	รัง	396	N 17° 01' 57.5" E 100° 56' 49.0"
ตำแหน่ง 2	รัง	388	N 17° 02' 01.7" E 100° 56' 44.5"
ตำแหน่ง 3	เต็ง	380	N 17° 01' 57.5" E 100° 56' 40.9"
ตำแหน่ง 4	เต็ง	327	N 17° 01' 56.1" E 100° 56' 40.0"

หมายเหตุ: ระดับความสูง คือ ความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง

การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส

คัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินตัวอย่างจำนวน 64 ตัวอย่าง โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Jacgues and Fred (1996) และวิธีของ Ko, Wang and Ann (2005) โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างรอยใส (Clear zone) บนอาหารดัดแปลง nutrient agar ที่ใช้ในการคัดแยก (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ตามวิธีการ ดังนี้

เตรียมซัสเพนชันของดิน โดยชั่งดินตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร ทำการเจือจางแบบ serial dilution ก่อนเลือกซัสเพนชันของดินที่มีค่าระดับการเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} เพื่อคัดแยกแบคทีเรียโดยใช้ spread plate technique บนอาหารดัดแปลง nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน ตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารที่ใช้คัดแยก คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีรอยใสรอบโคโลนี ทำให้บริสุทธิ์โดย cross streak technique บนอาหาร nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก ข้อ 2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่ได้เก็บไว้เป็น stock culture เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การติดสีย้อมแบบย้อมแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังษีภานุรัตน์, 2551, หน้า 9-37) แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้เก็บรักษาใน NA ที่มีกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก ข้อ 6) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นต้น

คัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นต้นตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Chappe, et al. (1994) โดยพิจารณาจากขนาดของรอยใส (clear zone) รอบโคโลนีของแบคทีเรียในอาหาร emulsion tributyrin agar คำนวนหาค่าดัชนีเอนไซม์ รายละเอียดของวิธีการคัดเลือกขั้นต้น คือ

$$\text{ดัชนีเอนไซม์} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางรอยใส}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี}}$$

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหาร nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเพาะกล้าเชื้อที่ได้ลงบนอาหาร emulsion tributyrin agar (ภาคผนวก ก ข้อ 3) โดยใช้วิธี point inoculation บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรอยใสและขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี คำนวณค่าดัชนีเอนไซม์ คัดเลือกไอโซเลทที่มีค่าดัชนีเอนไซม์ตั้งแต่ 2 ไปทดสอบในขั้นยืนยันต่อไป

การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นยืนยัน

คัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นยืนยัน ตามวิธีของ Okuda และ Ito (1987) โดยวัดความสามารถในการผลิตกรดไขมันในอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ (ภาคผนวก ก ข้อ 4) สังเกตการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple (BCP) ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในอาหารทดสอบ โดยสังเกตุการเปลี่ยนสีจากสีม่วงอมแดงเป็นสีเหลือง ภายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง ร่วมกับการวัดค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยแบคทีเรียทุกไอโซเลทที่นำมาคัดเลือกในขั้นตอนนี้ ตามวิธีของ Horani (1996)

1. การวัดความสามารถในการผลิตกรดไขมันของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส

เตรียมกล้าเชื้อ โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นต้นบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเพาะกล้าเชื้อที่เตรียมได้ในอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ก่อนเตรียมซัสเพนชันของเซลล์ โดยปรับความขุ่นซัสเพนชันของเซลล์ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 เทียบได้กับ McFarland เบอร์ 0.5 เพื่อใช้เป็นเชื้อทดสอบ

เพาะเชื้อทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบที่เติม BCP เป็นอินดิเคเตอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดสอบขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเอียงหลอดทดสอบทำมุม 45 องศา คัดเลือกไอโซเลทที่สามารถเปลี่ยนสีของ BCP จากสีม่วงอมแดงเป็นสีเหลืองในเวลาที่สั้นที่สุด และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

2. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียในอาหาร olive oil (ภาคผนวก ก ข้อ 5) ตามวิธีการในข้อ 1 จากนั้นเพาะเชื้อทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร olive oil ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์รูปกรวย ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นแยกควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้เพื่อใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Horani (1996) (ภาคผนวก ข) โดย 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit)

หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยไลปิดได้เป็นกรดไขมันในรูปของกรดโอเลอิก 1 ไมโครโมล ต่อ 1 มิลลิลิตรของเอนไซม์ ต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ

3. **การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน**

นำส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงแยกเซลล์ในข้อ 2 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 0.6 มิลลิลิตร เติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ซัลเฟต 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟอลินรีเอเจนต์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันทีตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

4. **การคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์**

ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์คำนวณได้จากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่อปริมาณโปรตีน จากสูตร

$$\text{กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (mg/ml)}}$$

ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในขั้นยืนยัน ดังต่อไปนี้

1. **การเตรียมกล้าเชื้อ**

เพาะเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเพาะกล้าเชื้อดังกล่าวในอาหาร olive oil (ภาคผนวก ก ข้อ 5) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ก่อนเตรียมซัสเพนชันของเซลล์ โดยปรับความขุ่นซัสเพนชันของเซลล์ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 เทียบได้กับ McFarland เบอร์ 0.5 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

2. **อุณหภูมิที่เหมาะสม**

เพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในอาหาร olive oil พีเอช 7 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ง) และค่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ไลเปสที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

3. **พีเอชที่เหมาะสม**

เพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในอาหาร olive oil พีเอช 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 2) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ไลเปสที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

4. **ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม**

เพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในอาหาร olive oil พีเอชเหมาะสม บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 2 และ 3) ความเร็ว 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ไลเปสที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

5. **ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวเซลล์**

เพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในอาหาร olive oil พีเอชเหมาะสม บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิและความเร็วเหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 2-4) วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ไลเปสที่ 0, 24, 36, 42, 48 และ 54 ชั่วโมง

6. **ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน**

เพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในอาหาร olive oil ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์มโอลีน โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม(พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 2-5) วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ไลเปส

7. **ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน**

เพาะกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในอาหาร olive oil ที่มีแหล่งไนโตรเจนในอาหาร คือ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโตน และยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม (พิจารณาจากผลการทดลองตามวิธีการในข้อ 2-6) วิเคราะห์การเจริญจากปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ไลเปส

ในแต่ละทรีทเมนท์ของการทดลองทำ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีวิเคราะห์ทางสถิติ โดยสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลคือ One-way ANOVA และ Two-way ANOVA และการเปรียบเทียบเชิงซ้อน โดยวิธี Duncan's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

การจำแนกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส

จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้ในขั้นยืนยันโดยใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) หรือ 16S rDNA

1. **การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย**

เพาะเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Nutrient Broth ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์รูปกรวยขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2-3 ครั้ง ด้วยการเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

2. **การสกัดดีเอ็นเอ**

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Mantynen & Lincstrom (1998) ด้วยการใช้ lysozyme และ proteinase K สกัดแยกองค์ประกอบไขมันหรือโปรตีนด้วย chloroform และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol เก็บดีเอ็นเอบริสุทธิ์ใน TE buffer เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. **การเพิ่มจำนวน 16S rDNA ด้วยวิธี PCR**

เตรียม DNA ต้นแบบตามวิธีการของ Marmur (1961) โดย DNA บริเวณที่มีรหัสสำหรับการสร้าง 16S rRNA จะเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR อาศัยเอนไซม์ Taq polymerase ตามวิธีการของ Kawasaki, et al.,1993; Yamada, et al., 2000; Katsura, et al., 2001 สำหรับผลิตภัณฑ์ PCR ที่จะนำมาหาลำดับเบสของบริเวณ 16S rDNA เตรียมโดยใช้ primer 2 ชนิด ได้แก่ 20F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3', ตำแหน่ง 9-27 บน 16S rDNA) และ 1500R (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3', ตำแหน่ง 1509-1492 บน 16S rDNA ตาม *E.coli* numbering system (Brosius, et al., 1981, pp. 107-127)

การเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายโดยเทคนิค PCR ใช้เครื่อง DNA Engine Dyad® Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) ในปริมาตร 100 µl ของ reaction mixture

ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 15-20 ng, primer 2 ตัว โดยแต่ละตัวใช้ 2.0 µmole, Taq polymerase 2.5 unit, $MgCl_2$ 2.0 mM, dNTP 0.2 mM และ 10x Taq buffer 10 µl (pH 8.8) โดยใน Taq buffer จะประกอบไปด้วย 750 mM Tris-HCl, 200 mM $(NH_4)_2SO_4$ และ 0.1% Tween 20 โปรแกรมที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR มีดังต่อไปนี้

Initial denatruration	94 องศาเซลเซียส	3 นาที
25 cycles ของ		
Danaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
Annealing	50 องศาเซลเซียส	5 นาที
Elongation	72 องศาเซลเซียส	2 นาที
Final extension	72 องศาเซลเซียส	3 นาที

จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี electrophoresis ด้วย 0.8% agarose gel นำไปทำบริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป QIAquick® (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการทดสอบขั้นต่อไป

4. การหาลำดับเบสโดยตรงของ 16S rDNA

การหาลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR (1500 เบส บน 16S rDNA ตาม *E.coli* numbering system ของ Brosius, et al. (1981) ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว โดยใช้เครื่อง ABI PRISM® BigDye™ Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (version 3.0, Appied Biosystems, Foster City, California, USA) ด้วย primer 20F, 520R (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG-3', ตำแหน่ง 536-519) สำหรับการหาลำดับเบสเป็นบางส่วน (partial sequencing) และ 1500R, 520F (5'-CAG CAG CCG CGG TAA TAC-3', ตำแหน่ง 519-536), 920F (5'-AAA CTC AAA TGA ATT GAC GG-3', ตำแหน่ง 907-926) และ 920R (5'-CCG TCA ATT CAT TTG AGT TT-3', ตำแหน่ง 926-907) สำหรับการหาลำดับเบสเต็มความยาว (full length) ของ 16S rDNA ใน sequencing reaction mixture ปริมาตร 10 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 5-20 ng, BigDye™ terminator ready reaction mixture 2.0 µl, sequencing primer 1.6 pmole และ

5xBigDye™ sequencing buffer ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1.5 µl โดยโปรแกรมของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการหาลำดับเบสมีดังต่อไปนี้

Initial denaturation	96 องศาเซลเซียส	30 วินาที
25 cycles ของ		
Danaturation	96 องศาเซลเซียส	10 วินาที
Annealing	50 องศาเซลเซียส	5 วินาที
Elongation	60 องศาเซลเซียส	4 นาที

สำหรับขั้นตอนการหาลำดับเบสจะเริ่มจากการเติมสารละลาย ethanol/acetate ปริมาตร 80 µl ลงใน sequencing reaction mixture ที่อยู่ในหลอดเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 ml ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาทีและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด (14,500 rpm) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นกำจัดสารละลาย ethanol ออกจากหลอดด้วย espirator ที่ประกอบกับ fine tip ซึ่งจะเหลือ DNA pellet ที่ต้องการ นำ DNA pellets ไปเติม 70% ethanol ปริมาตร 250 µl นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 5 นาที กำจัด ethanol ที่เหลืออยู่ด้วย espirator ที่ประกอบกับ fine tip อีกครั้ง นำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำแห้งด้วย heat box ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่แห้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส

นำดีเอ็นเอที่เก็บไว้มาใช้ในการหาลำดับเบส โดยละลายดีเอ็นเอใน terminator sequencing reagent ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากันด้วย vortex หลังจากนั้น double-stranded DNA จะถูกแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที นำมาแช่ในกล่องน้ำแข็งทันทีเพื่อรอ เครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) พร้อมในการหาลำดับเบส

5. **การวิเคราะห์ลำดับเบส**

นำลำดับเบสมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Cap (contig assembly program) ซึ่งเป็นส่วนประยุกต์เพิ่มเติมของโปรแกรม BioEdit (Biological sequence alignment editor) (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html) สำหรับการหา Homology ของลำดับเบสจะเปรียบเทียบกับลำดับเบสมาตรฐานโดยใช้โปรแกรม BLAST (BLASTn) ของเว็บไซต์ NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ซึ่งสามารถเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank/EMBL/DDBJ