หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled Environment incubator shaker) ของ New Brunswick Scientific Co., U.S.A.

1.2 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Spectronic 21) ของ Bausch & Lomb

1.3 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Digital pH meter) แบบ SP-5A ของ Suntex

1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) แบบ J2-21 ของ Beckman, U.S.A.

1.5 กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope) แบบ JSM-35CF

2. สารเคมี

2.1 ไซแลนจากเปลือกต้นโอ๊ต (xylan from oat spelts) ของบริษัทซิกม่า (Sigma)

2.2 พารา-ไนโตรฟีนิล-บีต้า-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside) ของบริษัทซิกม่า

2.3 ดีออกซีไรโบนิวคลีอิก แอซิด (Deoxyribonucleic acid) จาก calf thymus type I ของบริษัทซิกม่า

2.4 Sephadex G-25 ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, สวีเดน

3. การคัดแยก (Screening) สเตรพโตมัยซีสที่สามารถผลิตไซแลนเนสจากตัวอย่างดิน

3.1 การคัดแยกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (solid medium)

นำตัวอย่างดินมาตัวอย่างละ 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงไป 5 มล. ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) แล้วดำเนินการดังนี้

3.1.1 ใช้ลูป (loop) จุ่มสารแขวนลอยดินในน้ำ (soil suspension) ที่ได้ ลาก (streak) บนอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงเชื้อตามสูตรซึ่งดัดแปลงมาจาก Nakajima และคณะ (13) (ภาคผนวก ก. หมายเลข 1)

3.1.2 นำสารแขวนลอยดินในน้ำจากข้อ 3.1.1 นั่นมาเจือจางลงเป็นลำดับ ใช้ปิเปตที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูดสารแขวนลอยในแต่ละความเข้มข้นมา 1 มล. ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เทอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรในภาคผนวก ก. หมายเลข 1 ที่หลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียสลงไป 15 มล. เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

3.1.3 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดจากข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนมีการเจริญของจุลินทรีย์ เลือกเฉพาะโคโลนีของสเตรพโตมัยซีสที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี โดยศึกษาลักษณะของสเตรพโตมัยซีสตามหลักการจำแนกของ Bergey (45) นำเชื้อที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยลากเชื้อบนอาหารแข็งชนิดเดิมให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ แล้วแยกเอาโคโลนีเดี่ยวไปเก็บไว้ในอาหารแข็งเอียง (agar slant) ในภาคผนวก ก. หมายเลข 1 แต่ไม่เติมไซโคลเฮกซีมีด เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นถึงความสามารถในการผลิตไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามวิธีการในข้อ 3.2

3.2 การคัดแยกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Liquid medium)

โดยวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Nakajima และคณะ (13) โดยเลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากข้อ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) ในขวดแก้วทรงกรวย (Erlenmeyer flask) ตามวิธีการในข้อ 5 แยกเซลและกากอาหารที่เหลือออกโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง whatman no.2 แล้ว

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส โดยส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.1 มล. ของ 1% ไซแลนละลายในน้ำกลั่น 0.8 มล. ของ 0.1 โมลาร์ อะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 และน้ำเลี้ยงเชื้อ 0.1 มล. นำส่วนผสมทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ โดยวิธีการของ Somogyi-Nelson (46,47) ดังวิธีการในข้อ 10 เปรียบเทียบกับตัวควบคุมคือสภาวะที่ไม่มีสับสเตรท โดยใช้ 0.9 มล. ของอะซีเตท บัฟเฟอร์ผสมกับ 0.1 มล. ของน้ำเลี้ยงเชื้อ แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ของสเตรพโตมัยซีสที่ผลิตไซแลนเนสได้สูงสุดในสภาวะดังกล่าวข้างต้น

1 หน่วยของไซแลนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนแล้วได้น้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ตรวจสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

4. <u>การเก็บรักษาเชื้อสเตรพโตมัยซีส</u>

เก็บในอาหารแข็งเอียง ซึ่งปรับปรุงจากสูตรอาหารของ Nakajima และคณะ (13) (ภาคผนวก ก. หมายเลข 2) เลี้ยงเชื้อจนสร้างสปอร์ อายุของเชื้อประมาณ 7-10 วัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

5. <u>การเลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในขวดแก้วทรงกรวย</u>

ใส่น้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 5 มล. ลงในหลอดเก็บเชื้ออายุประมาณ 7-10 วัน ใช้ลูปค่อย ๆ เขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาอยู่ในน้ำ นับสปอร์เริ่มต้นให้ได้ประมาณ 10^6-10^7 สปอร์ต่อ มล. แล้วถ่าย 1 มล. ของสปอร์แขวนลอยในน้ำลงใน 50 มล. ของอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อ ซึ่งดัดแปลงจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Nakajima และคณะ (13) (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบ rotary shaker ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

6. การเตรียมไซแลนเนส

6.1 โดยวิธีผ่าน Sephadex G-25

เป็นการเตรียมเอนไซม์ที่ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่า "crude enzyme" โดยการเลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ดังวิธีการในข้อ 5 แยกเซลและกากอาหารที่เหลือออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 ที่มีปริมาตร 10 มล.โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ 2.5 มล. ชะด้วย 0.1 โมลาร์ อะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 3.5 มล. เก็บลำดับส่วนละ 0.7 มล. 5 ลำดับส่วน นำลำดับส่วนสุดท้ายมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส

6.2 โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก. หมายเลข 4 ดังวิธีการในข้อ 5 เป็นเวลา 3 วัน แล้วแยกเซลและกากอาหารที่เหลือออกจากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนน้ำใสทั้งหมดมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากส่วนน้ำใสที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.1 โมลาร์ อะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 ในปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ตะกอนละลายได้หมด ไดอาไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ดังกล่าว หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนออก ส่วนน้ำใสคือเอนไซม์ไซแลนเนสที่จะนำไปศึกษาต่อไป

7. การเตรียมบีต้า-ไซโลสิเดส

นำเซลของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ที่เลี้ยงดังวิธีการในข้อ 5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อในภาคผนวก ก. หมายเลข 5 แยกเซลออกจากส่วนใสโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำเซลมาเตรียมบีต้า-ไซโลสิเดส โดยวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Nakanishi และคณะ (14) โดยนำเซลมาประมาณ 90 มก. (น้ำหนักแห้ง) ทำให้เซลแตกโดยบดกับผงอลูมินาในโกร่ง โดยวิธีการของ

Marmur (48) แล้วเติม 9.5 มล. ของอะซีเตท บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ และ 0.5 มล. สารละลายโทลูอีน นำส่วนผสมนี้ไปเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบ reciprocal shaker ความเร็ว 210 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แยกส่วนของเซลที่แตกและส่วนน้ำใสออกจากกันโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที นำเฉพาะส่วนน้ำใสไปใช้เป็นสารละลายในการหาแอคติวิตีของ บีต้า-ไซโลสิเดส

8. <u>การตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลนเนสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9</u>

โดยวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakajima และคณะ (13) ดังนี้ ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.3 มล. ของสารละลายไซแลนความเข้มข้น 1% ซึ่งละลายใน 0.1 โมลาร์ อะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 2.4 มล. ของ 0.1 โมลาร์ อะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 และ crude enzyme หรือไซแลนเนสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.3 มล. โดยบ่มสับสเตรทกับบัฟเฟอร์ก่อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมเอนไซม์ นำส่วนผสมทั้งหมดของปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างของส่วนผสมที่เวลา 0 และ 10 นาที ครั้งละ 1 มล. หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ โดยวิธีการของ Somogyi-Nelson (46,47)

1 หน่วยของไซแลนเนส คือปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยไซแลนแล้วได้น้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ตรวจสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

9. <u>การตรวจสอบแอคติวิตีของ บีต้า-ไซโลสิเดส</u>

โดยวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Nakajima และคณะ (13) กับ Nakanishi และคณะ (14) ดังนี้ ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.5 มล. ของ 0.01 โมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนิล-บีต้า-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 โมลาร์ อะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 และ 0.5 มล. ของเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 7 นำส่วนผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม 5 มล. ของสารละลาย

โซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 0.05 โมลาร์ เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำส่วนผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานใช้ พารา-ไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 10-50 ไมโครกรัมต่อ มล.

1 หน่วยของเอนไซม์คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับสเตรทแล้วได้ พารา-ไนโตรฟีนอล 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ตรวจสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

10. <u>การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์</u>

นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์มาปริมาณ 1 มล. เติมอัลคาไลน์-คอปเปอร์ รีเอเจนท์ (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข. หมายเลข 1.1) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็นจัด แล้วเติมเนลสัน รีเอเจนท์ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 1,2) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนผสมนี้ไปปั่นเหวี่ยงแยกกากของไซแลนที่เหลืออยู่ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน ใช้น้ำตาลไซโลส ที่ความเข้มข้น 20-200 ไมโครกรัมต่อ มล.

11. <u>การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน</u>

โดยวิธีการของ Lowry และคณะ (49) โดยนำ 0.5 มล. ของสารละลายที่จะวิเคราะห์มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวก ข. หมายเลข 2.1) 3 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมสารละลาย D (ภาคผนวก ข. หมายเลข 2.2) 0.3 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน ใช้โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อ มล.

12. การวิเคราะห์ปริมาณ DNA

การแยก crude DNA ออกจากเซล โดยทำให้เซลแตกตามวิธีการของ Marmur (48) โดยบดเซลกับผงอลูมินาในโกร่ง ใช้เซลและผงอลูมินาในปริมาณเท่ากัน แล้วเติม 1X เซไลน์ ซิเตรท (ภาคผนวก ข. หมายเลข 3.1) 4 มล. นำส่วนผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลและผงอลูมินาออกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปหาปริมาณ DNA ตามวิธีการของ Clark และคณะ (50) โดยสารผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย crude DNA ใน 3 มล. ของ 1X เซไลน์ ซิเตรท เติม 6 มล. ของไดฟีนิลามีน รีเอเจนท์ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 3.2) ผสมให้เข้ากันดี แล้วต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำเย็นจัด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน ใช้ DNA จาก calf thymus ความเข้มข้น 0-2.0 มก.ต่อ มล.

13. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

13.1 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ตามวิธีการในข้อ 5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) แต่ผันแปรชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น ฟรักโทส อราบิโนส ไซโลส แมนนิทอล แรฟฟิโนส แรมโนส กลูโคส ซูโครส อินโนซิทอล บีต้า-เมทิล-ดี-ไซโลไซด์ เซลลูโลส ไซแลน กากรำข้าวและเปลือกเมล็ดฝ้าย โดยใช้ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน ตามวิธีการในข้อ 8 โดยใช้เอนไซม์ที่เตรียมได้จาก ข้อ 6.1

13.2 การหาปริมาณของสารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับภาคผนวก ก. หมายเลข 3 แต่ใช้สารแหล่งคาร์บอน คือ ไซแลน กากรำข้าว

และเปลือกเมล็ดฝ้าย มาหาปริมาณที่เหมาะสม โดยการผันแปรปริมาณของสารแหล่งคาร์บอนเป็นไซแลน 0 ถึง 4% หรือกากรำข้าว 0 ถึง 10% หรือเปลือกเมล็ดฝ้าย 0 ถึง 5%

13.3 การหาชนิดและปริมาณของสารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยชนิดและปริมาณของสารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมดังต่อไปนี้

13.3.1 การศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนหรือกากรำข้าว หรือเปลือกเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน

โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3 แต่มีไซแลน 3% หรือกากรำข้าว 5% หรือเปลือกเมล็ดฝ้าย 3% เป็นแหล่งคาร์บอน) แล้วผันแปรปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0 ถึง 0.5%

13.3.2 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ต่อการผลิตไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ

เลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3 ยกเว้นมี 5% กากรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน) แล้วผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน เป็น เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท สารสกัดจากมอลท์ และยูเรีย โดยใช้ความเข้มข้น 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากยีสต์ แล้ววัดแอคติวิตีของไซแลนเนสจากจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสารแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน

13.4 การหาปริมาณที่เหมาะสมของไซแลนที่เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบต่อการผลิตไซแลนเนส

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3 ยกเว้นมี 5% กากรำข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน) แล้วเสริมไซแลนในรูปต่าง ๆ ลงไปดังนี้

13.4.1 ไซแลนบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 0 ถึง 2%

13.4.2 ไซแลนในรูปเปลือกเมล็ดฝ้าย ความเข้มข้น 0 ถึง 1%

13.5 การศึกษาผลของกลูโคสต่อการผลิตไซแลนเนส

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3 ยกเว้น มี 5% กากรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน) แล้วเติมกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ความเข้มข้น 0 ถึง 1%

14. การศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส

โดยการผันแปรความเป็นกรดด่างโดยใช้บัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ คือ อะซีเตท บัฟเฟอร์ในช่วง pH 4-6 ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ในช่วง pH 6-8 และทริส-ไฮโดรคลอไรด์ในช่วง pH 8-9 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่เตรียมได้จากข้อ 6.2 โดยวิธีการดังกล่าวในข้อ 8

15. การศึกษาชนิดและปริมาณของเกลือแร่ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส

โดยการเติมเกลือแร่ชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันลงไปในปฏิกิริยาในการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส ดังนี้

15.1 เมอคิวริค คลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้น 0 ถึง 50 ไมโครโมลาร์

15.2 เฟอรัส ซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 0 ถึง 10 มิลลิโมลาร์

15.3 แมกนีเซียม ซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 0 ถึง 10 มิลลิโมลาร์

15.4 แคลเซียม คลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ความเข้มข้น 0 ถึง 10 มิลลิโมลาร์

15.5 แมงกานีส ซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$) ความเข้มข้น 0 ถึง 10 มิลลิโมลาร์

15.6 โคบอลท์ คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) ความเข้มข้น 0 ถึง 10 มิลลิโมลาร์

วัดแอคติวิตีของไซแลนเนสที่เหลือตามวิธีการดังกล่าวในข้อ 8 ในสภาวะเหมาะสม

16. การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไซแลนเนส

16.1 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

บ่มเอนไซม์ในปริมาณเท่า ๆ กัน คือ 40 ไมโครกรัมโปรตีนใน 0.1 โมลาร์ อะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 40, 45, 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดแอคติวิตีของไซแลนเนสที่เหลือตามวิธีการดังกล่าวในข้อ 8 ยกเว้นใช้อะซีเตท บัฟเฟอร์ ที่ pH 6.0 โดยใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

16.2 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มเอนไซม์ในปริมาณ 40 ไมโครกรัมโปรตีนใน 0.1 โมลาร์ของบัฟเฟอร์ ที่ pH ต่าง ๆ กัน คือ อะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 4-6 ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6-8 และทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8-9 เป็นเวลา 30 นาที วัดแอคติวิตีของไซแลนเนสที่เหลือตามวิธีดังกล่าวในข้อ 8 ยกเว้นใช้ อะซีเตท บัฟเฟอร์ ที่ pH 6.0 โดยใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

17. การจัดหมวดหมู่ของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

ศึกษาลักษณะการเจริญ (Culture characteristics) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) และลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiological characteristics) ของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ที่แยกได้ โดยดำเนินการตามวิธีของ International Streptomyces Project (51) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ดังนี้

- ซาเพค อการ์ (Czapek's agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 6)
- ซอลท์ โทเรอแรนท์ อการ์ (Salt Tolerance agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 7)
- สตาร์ช อการ์ (Starch agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 8)
- ยีสต์เอกซ์แทรก-มอลต์เอกซ์แทรก อการ์ (Yeast extract-Malt extract agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 9)
- โอทมิลล์ อการ์ (Oatmeal agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 10)

- อินออร์แกนนิก ซอลท์ สตาร์ช อการ์ (Inorganic Salt Starch agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 11)

- กลีเซอรอล แอสพาราจีน อการ์ (Glycerol Asparagine agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 12)

- ไทโรซีน อการ์ (Tyrosine agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 13)

- ทริปโตน-ยีสต์เอกซ์แทรก บรอท (Tryptone-Yeast extract broth, ภาคผนวก ก. หมายเลข 16)

- ลิทมัสมิลค์ (Litmus milk, ภาคผนวก ก. หมายเลข 17)

- นิวเตรียนท์ เจลาติน (Nutrient gelatin, ภาคผนวก ก. หมายเลข 18)

- ไนเตรท บรอท (Nitrate broth, ภาคผนวก ก. หมายเลข 19)

- นิวเตรียนท์ อการ์ (Nutrient agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 20)

- เบซอล มินเนอรอล ซอลท์ สตาร์ช อการ์ (Basal mineral salt starch agar ภาคผนวก ก. หมายเลข 15) ที่เติมน้ำตาล (เกรดวิเคราะห์) ชนิดต่าง ๆ คือ ดี-กลูโคส (D-glucose) ดี-ฟรักโทส (D-fructose) ดี-ไซโลส (D-xylose) แอล-อราบิโนส (L-arabinose) ดี-กาแลคโตส (D-galactose) ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ซูโครส (Sucrose) แอล-แรมโนส (L-Rhamnose) แรฟฟิโนส (Raffinose) แอล-อินโนซิทอล (L-inositol) ซัลลิซิน (Salicin) และ เซโลไบโอส (Cellobiose) ความเข้มข้น 1%

นอกจากนี้ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Olympus, Japan) และศึกษาลักษณะผิวของสปอร์ (Spore surface) โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope) โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วิธีการเตรียมตัวอย่างดังกล่าวในภาคผนวก ค. แล้วจัดหมวดหมู่ของ สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 จากลักษณะที่ศึกษาโดยวิธีการที่กล่าวมาแล้วตามหลักของ Bergey (45) และ Nonomura (52)