บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-10 แบบ rotary ของบริษัท New Brunwick Scientific Co., USA.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunwick Scientific Co., USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KS-3000P ของบริษัท Kubota , Japan.

เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (Refrigerated Centrifuge) รุ่น JA-14 ของบริษัท Beckman , USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb , USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดลำแสงคู่ (Double beam Spectrophotometer) รุ่น 210-5763 ของบริษัท Hitachi , Japan.

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ø 70 ของบริษัท Beckman, USA.

เครื่องระเหิดแห้ง (Freeze dryer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Eyela , Japan.

เครื่องเก็บลำดับส่วน (Fraction collector) รุ่น FRAC-200 ของบริษัท Pharmacia , Sweden.

การคัดเลือก (screening) แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากตัวอย่างน้ำทะเลและดินเลนตามชายฝั่งทะเลในประเทศไทย

1.)การคัดแยกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (solid medium)

1.1) นำตัวอย่างน้ำทะเล 1 มล.หรือตัวอย่างของดินเลน 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำทะเลเทียมนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 9 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) นำไปเจือจางตามลำดับแล้วดูดสารแขวนลอยในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มล. เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Schroder (80) ด้วยแท่งแก้วงอให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส จนเห็นโคโลนีของแบคทีเรียขึ้นชัดเจน จากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยวมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงชนิดเดิม บ่มไว้จนเห็นโคโลนีของแบคทีเรียเจริญเต็มที่

1.2) นำแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 1.2 มาจุด (spot) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 1.1 ที่เสริมด้วยเดกซ์แทรนลงไป 1.0 % บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วนำมาตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายเดกซ์แทรนเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยการเทราดด้วยเอธานอล 95 % ให้ท่วมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลด้วยการดูบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการย่อยสลายเดกซ์แทรน (โดยปกติเดกซ์แทรนเนสจะมีหน่วยกลูโคสต่อกันมากกว่า 50 หน่วยขึ้นไป เมื่อทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เช่น เอธานอลจะตกตะกอนทำให้เห็นเป็นสีขาวขุ่น แต่หากเดกซ์แทรนถูกย่อยโดยเดกซ์แทรนเนสเป็นหน่วยย่อยเล็กลงแล้วจะไม่ถูกตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ทำให้เห็นเป็นบริเวณใสได้)

2.)การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่คัดเลือกมาจากข้อ 1.2 ที่ให้บริเวณใส ไปจุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตามสูตรในข้อ 1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.)การคัดเลือกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (solid medium)

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่เก็บรักษาไว้ในข้อ 2 มาทำการทดสอบต่อ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตรเดียวกับที่ใช้ในข้อ 1.2 ในปริมาตร 30 มล.ต่อจานเลี้ยงเชื้อ ทำการจุดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนี้ และทำเหมือนในข้อ 1.2 จากนั้นวัดขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้น

4.)การเลี้ยงแบคทีเรียในขวดแก้วทรงกรวย

4.1) การเตรียมเชื้อตั้งต้น

นำเชื้อที่เก็บไว้ตามที่ได้กล่าวในข้อที่ 2 มาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ใช้อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2) การเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อตั้งต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 มาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยเช่นเดียวกับในข้อ 4.1 โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที บนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวออกมา 5 มล. ทำการแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใสมาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสตามวิธีการในข้อ 5

5.)การตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย

นำส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) จำนวน 1 มล.ซึ่งประกอบด้วย 0.7 มล.ของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และ 0.2 มล.ของสับสเตรต บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติม 0.1 มล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งผ่านการแยกเซลล์ออกไปแล้ว จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างของส่วนผสมที่เวลา 0 และ 30 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที แล้วตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีการของ Somogyi-Nelson (81,82)

1 หน่วย(Unit)ของเดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเดกซ์แทรน ที-2000 แล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

5.1) การเตรียมสับสเตรต

ชั่งเดกซ์แทรน ที-2000 (Pharmacia,Sweden) 0.625 กรัม นำไปละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล.ในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)

6.)การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ในปริมาณ 1 มล. เติมสารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข) ลงไป 1 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว เติมเนลสันรีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เติมน้ำ 5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร หาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากผลต่างที่เวลาต่างๆ จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมล.

7.)การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ใช้วิธีการของ Lowry และคณะ (83) นำ 1 มล. ของสารละลายที่ต้องการจะวิเคราะห์มาเติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข) 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมสารละลายผสม Lowry D 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบหาค่าของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่ใช้ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) ความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมล.

8.)การตรวจวิเคราะห์การเจริญของเซลล์

โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

9.)การเตรียมคอลัมน์ของเซฟาโรส 4บี (Sepharose 4B)

นำเซฟาโรส 4บี (Pharmacia,Sweden.) มาล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง แล้วจึงนำมาแช่ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซฟาโรส 4บี อยู่ในสภาพสมดุลย์ จากนั้นจึงบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.5x72 ซม. เพื่อให้ได้ความสูง 60 ซม. ผ่านสารละลายโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ลงในคอลัมน์ประมาณ 2 เท่าของปริมาตรเจล

10.)การเตรียมคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-Cellulose)

แช่ดีอีเออี-เซลลูโลส (Sigma,U.S.A) ประมาณ 5 กรัมในน้ำ 500 มล. ปล่อยให้พองตัวเต็มที่แล้วกำจัดส่วนที่เป็นผงละเอียด (fine particle) ออก จากนั้นแช่ในกรดไฮโดรคลอริคที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล พร้อมกับกวนเป็นเวลา 15 นาที แล้ว

ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้งจนกระทั่งส่วนน้ำใสมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 จึงนำมาปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้งจนได้ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 จากนั้นจึงนำมาแช่ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 นาน 24 ชั่วโมง

บรรจุดีอีเออี-เซลลูโลสที่เตรียมได้นี้ลงในคอลัมน์ขนาด 1x21 ซม. เพื่อให้ได้ความสูง 15 ซม. ผ่านสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ลงในคอลัมน์ซ้ำๆอย่างน้อย 2 เท่าของปริมาตรดีอีเออี-เซลลูโลสในคอลัมน์

11.)<u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส</u>

11.1) การหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ตามวิธีในข้อ 4 ในสูตรอาหารต่างๆดังนี้

สูตรอาหารดัดแปลงของ Schroder (ภาคผนวก ก.)

สูตรอาหารของ Yamaguchi (ภาคผนวก ก.)

สูตรอาหารดัดแปลงของ Okami (ภาคผนวก ก.)

ที่เสริมด้วย 1.0% ของเดกซ์แทรนชนิดอุตสาหกรรม แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

11.2) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเหลวสูตรของ Yamaguchi ตามวิธีในข้อ 4 แปรผันอุณหภูมิที่เลี้ยงเชื้อเป็น 28,37,45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

11.3) ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเหลวสูตรของ Yamaguchi ตามวิธีในข้อ 4 แปรผันความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นตั้งแต่ 3.0 ถึง 11.0 ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

11.4) ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเหลวสูตรของ Yamaguchi ตามวิธีในข้อ 4 แปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็น 0,1.0,2.5,5.0, 10.0,15.0 และ 20.0% ตามลำดับ ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

11.5) ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเหลวสูตรของ Yamaguchi ตามวิธีในข้อ 4 ทำการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ดังต่อไปนี้ คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลเซลโลไบโอส น้ำตาลซูโครส แอลฟา-เซลลูโลส แป้ง (soluble starch) และเดกซ์แทรนชนิดเกรดอุตสาหกรรม (น้ำหนักโมเลกุล 3-50x 10^6 ของบริษัท Sigma,D-5501) โดยให้มีความเข้มข้น 1.0% แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีในข้อ 5 และทำการเปรียบเทียบหาแอคติวิตีสัมพัทธ

11.6) การหาปริมาณของเดกซ์แทรนที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเหลวสูตรของ Yamaguchi ตามวิธีในข้อ 4 ที่มีเดกซ์แทรนชนิดเกรดอุตสาหกรรม (น้ำหนักโมเลกุล 3-50x10^6 ของบริษัท Sigma,D-5501) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นเป็น 0.5,1.0,1.5 และ 2.0% ตามลำดับ แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีในข้อ 5

11.7) การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจน

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเหลวสูตรของ Yamaguchi ตามวิธีในข้อ 4 ที่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจนต่างๆดังนี้

แหล่งอาหารอินทรีย์ไนโตรเจน

ผงยีสต์สกัดและCorn Steep Liquor ความเข้มข้น 0.2,0.5 และ 1.0% โดยน้ำหนัก

กรดคาซามิโนและโพลีเปปโตน ความเข้มข้น 0.2,0.5,1.0,1.5 และ 2.0% โดยน้ำหนัก

แหล่งอาหารอนินทรีย์ไนโตรเจน

โปตัสเซียมไนเตรตและแอมโมเนียมไนเตรต ความเข้มข้น 0.1,0.2 และ 0.3% โดยน้ำหนัก

โซเดียมไนเตรต ความเข้มข้น 0.1,0.3,0.5 และ 1.0% โดยน้ำหนัก

แอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0.2,0.5 และ 1.0% โดยน้ำหนัก

ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

11.8) การหาปริมาณของสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเหลวสูตรของ Yamaguchi ตามวิธีในข้อ 4 ที่มีกรดคาซามิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่แปรผันความเข้มข้นเป็น 1.0,1.5, 2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5 และ 5.0% โดยน้ำหนัก แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์-

แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

11.9) ผลของเกลือแร่ต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเหลวสูตรของ Yamaguchi ตามวิธีในข้อ 4 ที่มีเดกซ์แทรนความเข้มข้น 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน และกรดคาซามิโนความเข้มข้น 3.5% เป็นแหล่งไนโตรเจนและได้มีการแปรผันชนิดและปริมาณของเกลือแร่ดังนี้

ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0 ถึง 1.0% โดยน้ำหนัก
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0 ถึง 1.2% โดยน้ำหนัก
แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0 ถึง 0.05% โดยน้ำหนัก
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 0 และ 6.0×10^{-3} โมลาร์
แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0 และ 8.0×10^{-3} โมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0 และ 2.0×10^{-3} โมลาร์
กรดบอริค ความเข้มข้น 0 และ 3.0×10^{-5} โมลาร์
โซเดียมโมลิบเดต ความเข้มข้น 0 และ 2.0×10^{-6} โมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์ ความเข้มข้น 0 และ 2.0×10^{-6} โมลาร์
ซิงค์ซัลเฟต ความเข้มข้น 0 และ 1.7×10^{-8} โมลาร์
คอปเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 0 และ 1.6×10^{-9} โมลาร์
โคบอลท์คลอไรด์ ความเข้มข้น 0 และ 4.2×10^{-9} โมลาร์
แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

11.10) ผลของผงสกัดยีสต์ต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเหลวสูตรข้างต้น โดยแปรผันความเข้มข้นของผงสกัดยีสต์เป็น 0 ถึง 0.05% โดยน้ำหนัก ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์-แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

11.11) ผลการชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยเดกซ์แทรน

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเหลวสูตรข้างต้นที่ได้ปรับปรุงแล้ว แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากเดกซ์แทรนเป็นน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 2.0% จนเชื้อเข้าสู่ช่วง late log phase จากนั้นเติมเดกซ์แทรนลงไปให้มีความเข้มข้น 0.25% ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

12.)การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

12.1)การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 มาตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีการในข้อ 5 วัดปริมาตรไว้ เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดลงไปช้าๆ พร้อมทั้งกวนเบาๆตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 70 ถึง 80 กวนเบาๆต่ออีก 3 ถึง 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนที่ได้ไปละลายใน 0.05 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 โดยใช้บัฟเฟอร์ให้น้อยที่สุด นำมาตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่เหลืออยู่เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสก่อนตกตะกอนตามวิธีในข้อ 5

12.2)การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี

ก.)การทำโครมาโตกราฟฟีบนเซฟาโรส 4บี (Sepharose 4B) โดยนำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 12.1 มาผ่านลงในคอลัมน์ของเซฟาโรส 4บี (ขนาด 2.5x60 ซม.) และทำการชะเอาโปรตีนออกด้วยอัตราเร็ว 30 มล.ต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 3 มล. นำมาวัดปริมาณโปรตีนโดยดูค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

ข.)การทำโครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-Cellulose) โดยนำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ ก.มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการระเหิดแห้ง แล้วจึงนำมาผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลส (ขนาด 1x21 ซม.)ทำการชะเอาโปรตีนอื่นๆออกด้วยสารละลาย 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ด้วยอัตราเร็ว 15 มล.ต่อชั่วโมง จากนั้นจึงชะล้างคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรง (linear gradient) ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-300 มิลลิโมลาร์ ใน 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 3 มล.นำมาวัดปริมาณโปรตีนโดยดูค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำมาตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

13.)การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

13.1)ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาที่ความเป็นกรด-ด่างในช่วงต่างๆ โดยการแปรผันความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ดังนี้

ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	4.0-7.0
ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	6.0-8.0

ทริส-(ไฮดรอกซีมีเทน) ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5-9.0
อะมิโนมีเทน บัฟเฟอร์

ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในการตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5 และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับที่สภาวะมาตรฐาน คือ ที่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0

13.2)ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่างดังนี้ คือ

ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	4.0-7.0
ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	6.0-8.0
ทริส-(ไฮดรอกซีมีเทน) อะมิโนมีเทน บัฟเฟอร์	ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	7.5-9.0

เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5 และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับที่สภาวะมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 13.1

13.3)อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาในอ่างน้ำที่ปรับอุณหภูมิเป็น 30,37,45,55, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในการตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรน-เนสตามวิธีในข้อ 5 และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับที่สภาวะมาตรฐาน คือ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

13.4)ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 30,37,45,55,60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำเอนไซม์นี้มาตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5 และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

13.5)ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาที่มี 0.05 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0,1.0,2.5, 5.0,10.0 และ 20.0% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในการตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5 และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับที่สภาวะ

มาตรฐาน คือ ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0%

13.6)ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางใน 0.05 โมลาร์ ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0,1.0,2.5,5.0,10.0 และ 20.0% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำเอนไซม์มาตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5 และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับสภาวะไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์

13.7)ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และมีความเข้มข้นต่างๆกัน ตั้งแต่ 0 ถึง 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในการตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5 และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับสภาวะที่ใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

13.8)ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเข้มข้นของบัฟเฟอร์

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 และความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำเอนไซม์นี้มาตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5 และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับที่สภาวะที่ใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

13.9)การศึกษาชนิดและปริมาณของเกลือแร่รวมทั้งสารบางชนิดที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีเกลือแร่และสารที่ใช้ทดสอบซึ่งมีความเข้มข้น 0 ถึง 15 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในการตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีการในข้อ 5 สำหรับเกลือแร่และสารที่จะใช้ทดสอบมีดังนี้

ซิสเตอีน,ซิสเตอีน-ไฮโดรคลอไรด์,ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA),dithiothreiol (DTT),แมกนีเซียมซัลเฟต,แมกนีเซียมคลอไรด์,แมงกานีสคลอไรด์,แคลเซียมไฮดรอกไซด์,คอปเปอร์ซัลเฟต,คอปเปอร์คลอไรด์,โคบอลท์คลอไรด์,เมอคิวริคคลอไรด์,นิเกิลคลอไรด์,ซิงค์คลอไรด์,เฟอริคคลอไรด์,เฟอรัสซัลเฟต,โปตัสเซียมคลอไรด์,ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับที่สภาวะมาตรฐานเมื่อไม่เติมสารเหล่านี้ลงไป

13.10)ความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบน้ำตาลบางชนิดของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางใน 0.05 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 กับสับสเตรตชนิดต่างๆที่มีความเข้มข้น 0.625 % ที่อุณหภูมิ 55 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสลายตามวิธีในข้อ 5 สับสเตรตที่ใช้มีดังนี้ เดกซ์ทริน,แป้ง,แอลฟา-เซลลูโลส,ไซแลน,อะไมโลส, เซฟาเดกซ์ จี-100,คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส,เดกซ์แทรน ที-70 ,เดกซ์แทรนคุณภาพอุตสาหกรรมน้ำหนักโมเลกุล 17,200 , 153,000 , 487,000 และ 5-40x10^6

13.11)การตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายเดกซ์แทรน

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางกับสับสเตรตที่สภาวะมาตรฐานเป็นเวลา 0 ถึง 120 นาที เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆกัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์น้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยโครมาโตกราฟีบนกระดาษกรอง Whatman No.1 แบบ ascending เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของกลูโคส ไอโซมอลโตส และไอโซมอลโตไทรโอสที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมล. ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร บรรจุในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยสารละลายผสมของ n-propanol ต่อ น้ำในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 เมื่อสารละลายซึมถึงตำแหน่งใกล้ขอบบนมากที่สุดแล้วนำกระดาษกรองนี้ออกมาทำให้แห้ง และทำให้เกิดสีโดยวิธี อัลคาไล-ซิลเวอร์ไนเตรต (84)(ภาคผนวก ข)

13.12)การหาค่า Km ของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ที่อยู่ในรูปกึ่งบริสุทธิ์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต รวมทั้งผ่านคอลัมน์ของ เซฟาโรส 4บี (Sepharose 4B) และ ดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) แล้วความเข้มข้น 0.334 หน่วยต่อมล.บ่มกับเดกซ์แทรน T-2000 ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 5.0 M. ในสภาวะมาตรฐาน ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่เวลาต่างๆ แล้วนำผลที่ได้มาเขียนให้อยู่ในรูปไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk Plot)

14.)<u>การตรวจสอบสกุลของเชื้อแบคทีเรีย Z-10</u>

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiological characteristics) และลักษณะการเจริญ (Culture characteristics) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆเพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกเชื้อตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (85)

14.1 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar,nutrient agar slant และ nutrient broth (ภาคผนวก ก.)

มาศึกษารูปร่าง ขนาด สี ความโปร่งใสหรือความทึบแสงของโคโลนี ลักษณะของโคโลนีบนหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

14.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การติดสีแกรม ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมาย้อมสีแกรม

การติดสี acid-fast ใช้แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ที่มีอายุ 2-3 วันมากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง หยดสี Ziehl Nelson's carbol fuchsin ให้ท่วมบริเวณที่กระจายไว้ ลนไฟอ่อนๆใต้แผ่นสไลด์ พอให้มีควันระเหยออกมาเล็กน้อย เป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเติมสีลงไปอย่าให้สีแห้ง นำไปล้างน้ำและล้างสีออกด้วย acid alcohol แล้วล้างน้ำอีกครั้ง ย้อมสี methylene blue 5-10 นาที ล้างและซับน้ำให้แห้ง นำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าเซลล์ติดสีแดง แสดงว่า เชื้อนี้เป็นเชื้อที่ทนต่อกรด หรือ เป็นacid-fast และถ้าเซลล์ติดสีฟ้า แสดงว่า เชื้อเป็น non acid-fast

การย้อมสีเอนโดสปอร์ นำแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth มีอายุ 7 วัน มากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หยดสารละลายสี malachite green เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข.) ให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ระวังอย่าให้สีแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็น ล้างน้ำและย้อมด้วยสี safanin (ภาคผนวก ข.) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า สปอร์จะติดสีเขียว ส่วนเซลล์จะติดสีแดง

การเคลื่อนที่ นำแบคทีเรียมาปลูกแบบปักตรง (stab inoculation) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SIM (ภาคผนวก ก.) ถ้าเชื้อเจริญออกนอกรอยที่ปลูกเชื้อแสดงว่าเชื้อเคลื่อนที่ได้

14.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

นำแบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar จนกระทั่งมีอายุ 48 ชั่วโมง มาทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

การสร้างเอนไซม์คาตาเลส หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 3% (ภาคผนวก ข.)ลงบนโคโลนีของแบคทีเรีย ถ้ามีฟองกาซเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีฟองกาซเกิดขึ้นให้ผลเป็นลบ

การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส นำกระดาษกรอง whatman No.1 ที่ชุบสารละลาย tetramethyl paraphenylenediamine dihydrochloride ที่มีความเข้มข้น 1% (ภาคผนวก ข.) พอหมาด นำมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่สะอาด ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะ

เชื้อมาขีดลงบนกระดาษกรองดังกล่าว สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงใน 1 นาที ถ้ามีสีม่วงเกิดขึ้นตามรอยขีด แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีเอนไซม์ออกซิเดส

การสร้างเอนไซม์ยูริเอส ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลวยูเรีย (ภาคผนวก ก.) สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของฟีนอลเรดในอาหารซึ่งจะเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นชมพู แสดงว่า แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ยูริเอสย่อยยูเรียแล้วได้แอมโมเนียทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่าง บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงบันทึกผลเป็นลบ

การรีดิวซ์ไนเตรท ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว tryptic nitrate medium (ภาคผนวก ก.) ตรวจผลโดยใช้สารละลายทดสอบไนไตรท์ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย ก.และสารละลาย ข. (ภาคผนวก ข.) โดยหยดสารละลายดังกล่าวชนิดละ 5 หยด ตามลำดับ เขย่าให้ผสมกัน ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีแดง แสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรท์ บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงให้เติมผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย ถ้าเกิดสีแดง แสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวซ์ด้วยผงสังกะสีให้ผลเป็นลบที่แท้จริง ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้น บันทึกผลเป็นบวก เพราะไนเตรทถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์โดยแบคทีเรีย และไนไตรท์ถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซไนโตรเจนในที่สุด

การสร้างอินโดล ทำการปลูกแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SIM (ภาคผนวก ก.) ตรวจหาสารอินโดลที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายโคแวค (Kovac's reagent) (ภาคผนวก ข.) โดยหยดสารละลายโคแวค 2-3 หยด ลงในหลอดทดสอบที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ถ้าเกิดสีแดงลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีความสามารถในสร้างอินโดลได้ บันทึกผลเป็นบวก

การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ทำการปลูกแบคทีเรียแบบปักตรงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ triple sugar iron agar (ภาคผนวก ก.) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบเมธิลเรด ทำการปลูกแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MR-VP (ภาคผนวก ก.) เป็นเวลา 2-3 วัน โดยแบ่งอาหารมาประมาณ 2-3 มล. แล้วเติมสารละลายเมธิลเรด (ภาคผนวก ข.) ลงไป 2-3 หยด ถ้าเกิดสีแดงในอาหารให้บันทึกผลเป็นบวก ถ้าเกิดสีเหลืองในอาหารบันทึกผลเป็นลบ

การทดสอบเมธิลคาร์บินอล (Voges-Proskauer test) ทำการปลูกแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MR-VP (ภาคผนวก ก.) เป็นเวลา 2-3 วัน โดยแบ่งอาหารมาประมาณ 2-3 มล. เติมน้ำยาทดสอบสารละลาย ก. และสารละลาย ข.(ภาคผนวก ข.) ลงไปอย่างละ 2-3 หยด ถ้าอาหารที่สีชมพูเกิดขึ้นภายใน 10 นาที บันทึกผลเป็นบวก ส่วนหลอดที่ไม่เกิดสีชมพูให้ตั้งทิ้งไว้เพื่อดูผลภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าไม่เกิดสีชมพูขึ้น บันทึกผลเป็นลบ

การทดสอบการย่อยแป้ง ทำการปลูกแบคทีเรียแบบจุด ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

ทดสอบการย่อยแป้ง (ภาคผนวก ก.) ในจานเพาะเชื้อ เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจดูการย่อยแป้งโดยราดสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข.) ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้ บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบการใช้ซิเตรต ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียและปลูกแบบปักตรงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง simmon citrate agar slant (ภาคผนวก ก.) เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจดูว่าสีของอาหารเปลี่ยนสีหรือไม่ ถ้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่า เชื้อสามารถใช้ซิเตรตได้

การทดสอบการผลิตแอมโมเนีย ทำการปลูกแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว nutrient broth (ภาคผนวก ก.) เป็นเวลา 2-3 วัน หยด Nessler's reagent (ภาคผนวก ข.) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 มล. ถ้ามีแอมโมเนียจะมีสีเหลืองเกิดขึ้น

การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต ปลูกแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ phenol red agar base (ภาคผนวก ก.) คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ กลูโคส ไซโลส แมนโนส แรมโนส แลคโตส ซูโครส มอลโตส และแมนนิทอลโดยเติมลงไป 1 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการสร้างกรด ถ้าแบคทีเรียใช้คาร์โบไฮเดรตได้จะสร้างกรดขึ้นมาทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟีนอลเรดเปลี่ยนสี จากสีแดงเป็นสีเหลือง