บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์หลักที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ KF-4 Incubator Shaking Cabinet (Controlled Environmental) รุ่น KF-4 ของ Infors HT, Switzerland.

1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (Bench-Top Centrifuge) รุ่น Minor 35 ของ MSE England.

1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น MC-15 ของบริษัท Tomy Seiko Co., Ltd., Japan.

1.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Spectronic 21) ของ Bausch & Lomb, U.S.A.

1.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Aquatherm water bath shaker) รุ่น G-86 New Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A.

1.6 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CHA ของ Olympus Optical Co. Ltd., Japan.

1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Digital pH Meter) รุ่น PHM 82 Standard pH meter บริษัท Radiometer Copenhagen, Denmark.

1.8 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น KT-30SD บริษัท Alp Co. Ltd., Tokyo, Japan.

1.9 ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar Flow รุ่น PES PD. 2428 H ของ Dwyer Instruments, Inc. Mich. City, IND. U.S.A.

2.0 ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave) รุ่น NE-7670 ของ National, Japan.

2. สารเคมี

2.1 ไลโซไซม์ (Lysozyme grade 1) ของ Sigma, U.S.A.

2.2 TES [N-tris (Hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane Sulfonic acid ของ Sigma, U.S.A.

2.3 โพลีเอทธิลีนไกลคอล (Polyethylene Glycol 1,500) ของ Fluka, Switzerland.

2.4 เตตราซัยคลิน (Tetracycline), แอมพิซิลิน (Ampicillin), และ อีริโทรมัยซิน (Erythromycin) ของ Sigma, U.S.A.

3. เชื้อ *Streptomyces*

เชื้อ *Streptomyces* ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

3.1 เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *Streptomyces coelicolor M 124* (arg pro cys)

เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *Streptomyces coelicolor M 130* (his ura str^R)

3.2 เชื้อที่ใช้ในการศึกษา *Streptomyces sp. 190-1* (tet^R)

Streptomyces sp. 42-9 (amp^R)

Streptomyces sp. 42-9/pIJ 4027 (ery^R)

4. การเก็บรักษาเชื้อ *Streptomyces*

เขี่ยสปอร์ลงในอาหารแข็งเอียง MS (ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 7-10 วันจนเชื้อแก่ให้สปอร์เต็มที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ. จนกว่าจะนำมาใช้

017435

5. การเตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ของ *Streptomyces* เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

นำสปอร์แขวนลอยที่ได้จากการขูดสปอร์จากหลอดอาหารแข็งเอียงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 0.1 มล. ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MS อยู่ เกลี่ยให้ทั่วด้วยที่เกลี่ยเชื้อ (spreader) นำไปบ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 7-10 วัน จนเชื้อสร้างสปอร์มากเต็มที่ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มล. ใช้ลูปขูดสปอร์ที่อยู่บริเวณผิวหน้าให้หลุดออกมาอยู่ในน้ำ แล้วนำไปกรองผ่านสำลีด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (ภาคผนวกที่ 3) แล้วแยกน้ำออกโดยปั่นเหวี่ยง ในเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แขวนลอยสปอร์ใน 20% กลีเซอรอลในน้ำ โดยให้ได้ความหนาแน่นของสปอร์ประมาณ $1x10^9$ สปอร์ต่อมล. แบ่งเก็บเป็นปริมาตรเล็กๆ ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่ -20°ซ.

6. การเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* เพื่อเตรียมโปรโตพลาสท์

เติมสปอร์แขวนลอย 0.1 มล.ลงในอาหารเหลว YEME (ภาคผนวกที่ 1.2) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. นำไปบ่มที่ 30°ซ. บนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชม.เก็บส่วนที่เป็นไมซีเลียม โดยดูด broth มา 5 มล. ลงในหลอดที่มีฝาเกลียวปิดและปลอดเชื้อ แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป 5 มล.นำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติม 0.3โมลาร์ของซูโครสลงไป 10มล. ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นไมซีเลียมไว้ใช้ต่อไป

7. การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ

อบกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ในตู้อบไมโครเวฟ 10 นาที โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ defrost ทิ้งไว้ให้เย็น 20 นาที ในเดสิคเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองละเอียดถึง 0.1 มก. จากนั้นนำไปกรองเซลล์ โดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มล. ผ่านชุดกรองแบบมิลลิพอร์ (millipore) ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปอบแห้งในตู้ไมโครเวฟอีก 10 นาที ชั่งน้ำหนักละเอียดถึง 0.1 มก. คำนวณหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ โดยนำไปหักออกจากน้ำหนักกระดาษกรอง

8. การหาความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของ *Streptomyces*

ทดสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของ *Streptomyces* ที่จะศึกษาตามวิธีการดังนี้

ลาก (streak) เชื้อ *Streptomyces* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal media (ภาคผนวกที่ 1.5) ที่เติมยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ลงไป ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

กานามัยซิน	เข้มข้น	5,10,20	ไมโครกรัมต่อมล.
สเตรพโตมัยซิน	เข้มข้น	5,10,20	ไมโครกรัมต่อมล.
อิริโทรมัยซิน	เข้มข้น	10,20,30	ไมโครกรัมต่อมล.
คลอแรมเฟนิคอล	เข้มข้น	10,20,30	ไมโครกรัมต่อมล.
เตตราซัยคลิน	เข้มข้น	10,20,30	ไมโครกรัมต่อมล.
แอมพิซิลิน	เข้มข้น	10,20,30	ไมโครกรัมต่อมล.

บ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 7 วัน ตรวจดูการเจริญของเชื้อ

9. การเตรียมและการรีคอมบิเนชันของโปรโตพลาสท์

9.1 การทำโปรโตพลาสท์

ตามวิธีการของ Hopwood และคณะ (32) ดังนี้

นำไมซีเลียมที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีการในข้อ 6 มาเติมสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 1 มก.ต่อมล.ในบัฟเฟอร์ P (ภาคผนวกที่ 2.2) ปริมาตร 4 มล.บ่มที่ 37° ซ.ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว ตรวจดูการเกิดโปรโตพลาสท์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเวลาผ่านไป 15,20,30 นาที จนเกิดโปรโตพลาสท์เป็นจำนวนมากพอ ขั้นตอนต่อ ๆไป จะต้องรักษาโปรโตพลาสท์ไว้โดยการแช่ในน้ำแข็งเสมอ นำโปรโตพลาสท์ที่ได้ไปเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P 5 มล. กรองผ่านสำลีโดยวิธีปลอดเชื้อ เพื่อเอากากเซลล์และส่วนของไมซีเลียมที่ยังเหลืออยู่ออก แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างโปรโตพลาสท์ 2 ครั้ง โดยเติมบัฟเฟอร์ P ลงไปครั้งละ 5 มล. แยกเก็บโปรโตพลาสท์โดยการปั่นเหวี่ยง และเทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง ปรับปริมาตรด้วยบัฟเฟอร์ P นับจำนวนโปรโตพลาสท์ด้วย Haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ให้มีความเข้มข้นของโปรโตพลาสท์ประมาณ 5.0×10^{8} โปรโตพลาสท์ต่อมล.

9.2 การรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์

นำโปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้จากข้อ 9.1 มาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P หรือ 0.01% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ให้มีความเข้มข้นเจือจางช่วงละ 10 เท่า ดูดมา 0.1 มล.ใส่ลงในจานอาหารวุ้น R_2 (ภาคผนวกที่ 1.3) ที่ได้ผ่านการกำจัดความชื้นออกไปบางส่วน โดยการเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และผ่านลมในตู้ Laminar Flow เป็นเวลา 2 ชม.เกลี่ยให้ทั่ว นำไปบ่มที่30°ซ.เป็นเวลา 7 วัน จนเชื้อเจริญเต็มที่ นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ R_2 เมื่อเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P เทียบกับเมื่อเจือจางด้วย 0.01% SDS นำไปคำนวณหาเปอร์เซนต์ในการรีเจนเนอเรท

ความถี่ในการรีเจนเนอเรท (%) =

$$\frac{\text{จำนวนโคโลนีเมื่อเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P-จำนวนโคโลนีเมื่อเจือจางด้วย0.01\%SDS}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสท์ต่อ มล.ที่นับได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์}} \times 100$$

9.3 การเชื่อมโปรโตพลาสท์ (Protoplast Fusion) ของ *Streptomyces*

นำโปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้จากข้อ9.1 มาเชื่อมโปรโตพลาสท์ตามวิธีการของ Hopwood และคณะ (32) โดยปรับความขุ่นของโปรโตพลาสท์ให้มีความขุ่นเท่ากันด้วยบัฟเฟอร์ P นำมาผสมกันอย่างละ 0.5 มล. ปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ P 5 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง เขย่าส่วนที่เหลือในหลอดเพื่อให้โปรโตพลาสท์กระจาย แล้วเติม 50%โพลีเอทธิลีนไกลคอล 1,500 ในบัฟเฟอร์ P (ภาคผนวกที่ 2.3)ลงไป 0.8 มล. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำ 0.1 มล. ของโปรโตพลาสท์ไปเพาะบนอาหารวุ้น R_2 ที่เตรียมใหม่ๆ เพื่อให้เกิดการรีเจนเนอเรทตามวิธีการในข้อ 9.2

10. การคอนจูเกชัน(Conjugation) ของ *Streptomyces*

นำสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* ที่จะทำการคอนจูเกตมาอย่างละ 0.05 มล. ใช้ลูปเขี่ยให้ผสมกันบนผิวหน้าของอาหารแข็งเอียง MS บ่มที่ 30°ซ. จนสปอร์เจริญเต็มที่ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป 5 มล. ใช้ลูปขูดให้สปอร์หลุดออกมาในน้ำ ถ่ายใส่หลอดใหม่ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แขวนลอยสปอร์ในสารละลายปลอดเชื้อ 20% กลีเซอรอล นำไปเพาะบน selective media ต่อไป

11. การวิเคราะห์ลูกผสม (Recombinant) ที่ได้

11.1 ลูกผสมที่ได้จาก *Streptomyces* สายพันธุ์มาตรฐาน

นำสปอร์แขวนลอยที่ได้จากการทำคอนจูเกชัน และการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของเชื้อ *Streptomyces coelicolor sp. M124* (arg pro cys)และ *Streptomyces coelicolor sp.M130* (his ura str^R) มาเพาะเชื้อโดยวิธี spread plate บนminimal media ที่เสริมด้วยองค์ประกอบต่างๆ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เสริมด้วย อาร์จินีน โพรลีน ซิสเทอีน กลุ่มที่ 2 เสริมด้วย ฮิสติดีน ยูราซิล สเตรพโตมัยซิน กลุ่มที่ 3 เสริมด้วย อาร์จินีน โพรลีน ซิสเตอีน ยูราซิล และสเตรพโตมัยซิน บ่มไว้ที่ 30 °ซ.เป็นเวลา 7 วัน จนเชื้อเจริญเต็มที่ นับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด คำนวณหาความถี่ในการรีคอมบิเนชัน และทำการตรวจสอบผลที่ได้อีกครั้ง โดยเลือกโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มที่ 3 มาแบบสุ่ม (random) ทำเป็น master plate โดยวางจานอาหารวุ้น MS ที่เตรียมใหม่ๆ บนแผ่นตารางที่ทำขึ้น (ภาคผนวกที่ 4) เพาะเชื้อโดยวิธีการ spot ทำเครื่องหมายบอกตำแหน่งที่แน่นอนไว้ บ่มไว้ที่30°ซ.เป็นเวลา 7วัน จนเชื้อเจริญเต็มที่ จากนั้นถ่ายเชื้อแบบ replica plating ไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยองค์ประกอบต่างๆสำหรับคัดเลือกลูกผสมอีกครั้ง

ความถี่ในการรีคอมบิเนชัน =

$$\frac{\text{จำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มที่ 3}}{\text{จำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มที่ 2 + จำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มที่ 1}}$$

11.2 ลูกผสมที่ได้จาก *Streptomyces* sp.190-1 และ *Streptomyces sp.42-9*

นำสปอร์แขวนลอยที่ได้จากการทำคอนจูเกชัน และการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของเชื้อ *Streptomyces sp. 190-1* (Tet^R) และ *Streptomyces sp.42-9* (Amp^R) มาทำการวิเคราะห์ตามวิธีการเช่นเดียวกับในข้อ11.1 แต่เปลี่ยนองค์ประกอบที่ใช้เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับคัดเลือกลูกผสม คือ กลุ่มที่ 1 เสริมด้วย เตตราซัยคลิน 30 ไมโครกรัมต่อมล. กลุ่มที่ 2 เสริมด้วย แอมพิซิลิน 30 ไมโครกรัมต่อมล. กลุ่มที่ 3 เสริมด้วย เตตราซัยคลิน และ แอมพิซิลิน อย่างละ 30 ไมโครกรัมต่อมล.

11.3 ลูกผสมที่ได้จาก *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9/pIJ4027*

นำสปอร์แขวนลอยที่ได้จากการทำคอนจูเกชัน และการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของเชื้อ *Streptomyces sp. 190-1* (Tet^R) และ *Streptomyces sp.42-9* ซึ่งได้ทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ 4027 เข้าไป (Ery^R) (ภาคผนวกที่ 5) มาทำการวิเคราะห์ตามวิธีการเดียวกับในข้อ 11.1 แต่เปลี่ยนองค์ประกอบที่ใช้เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับคัดเลือกลูกผสม คือ กลุ่มที่ 1 เสริมด้วย เตตราซัยคลิน 30 ไมโครกรัมต่อมล. กลุ่มที่ 2 เสริมด้วย อีริโทรมัยซิน 10 ไมโครกรัมต่อมล. กลุ่มที่ 3 เสริมด้วยเตตราซัยคลิน 30 ไมโครกรัมต่อมล. และ อีริโทรมัยซินอย่างละ 10 ไมโครกรัมต่อมล.

12. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ในลูกผสมที่ได้

12.1 การหาแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

เลี้ยงเซลล์ลูกผสม โดยเขี่ยเชื้อ 2-3 ลูป จากอาหารแข็งเอียง MS ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (ภาคผนวกที่1.7) บ่มที่ 30°ซ. บนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลล์ด้วยความร้อน โดยนำเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70°ซ. เป็นเวลา 10 นาที กรองเซลล์ด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง แบ่งเซลล์ส่วนหนึ่งไปหาน้ำหนักแห้งตามวิธีการในข้อ 12.2 และชั่งเซลล์อีกส่วนหนึ่งประมาณ 20 มก. ใส่ลงในส่วนผสมของปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย 1มล. ของ 0.1โมลาร์ กลูโคส, 0.6 มล.ของ 0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, 0.1 มล. ของ 0.1 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต, 0.2 มล. ของ 0.001 โมลาร์ โคบอลท์คลอไรด์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 2 มล. ต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80° ซ. เก็บสารละลายตัวอย่างที่เวลา 10,17และ25 นาที ทำให้เจือจาง 300 เท่า ด้วยน้ำกลั่น นำ 0.5 มล. ของสารละลายนี้ไปหาปริมาณฟรักโทสที่เกิดขึ้น ตามวิธีการของ Marshall และ Kooi (43) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Dische และ Borenfreund (44) โดยเติมสารละลายตัวอย่างลงใน 3 มล.ของ 70% กรดซัลฟุริคเกรดวิเคราะห์ (analytical grade ของ Mallinckrodt,U.S.A.) ที่แช่เย็นในอ่างน้ำแข็ง ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม 0.1 มล. ของซิสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ (cysteine-HCl) ผสมให้เข้ากัน เติม 0.1 มล. ของอัลกอฮอลิค คาร์บาโซล (alcoholic carbazole) ผสมให้เข้ากันทันที บ่มที่ 60° ซ. ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานฟรักโทส จากกราฟมาตรฐานของฟรักโทสที่สร้างขึ้นในช่วงความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อ มล.

1 หน่วยของเอนไซม์ (unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยน กลูโคสเป็นฟรักโทส 1 ไมโครโมล (u mole) ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ กำหนดข้างต้น

12.2 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

อบแผ่นอลูมินัมในตู้อบแห้งที่ 80°ซ.1 คืน ทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักแน่นอนจนถึง 0.1 มก. ชั่งเซลล์ที่ต้องการหาน้ำหนักแห้งบนแผ่นอลูมินัม นำไปอบแห้งอีกครั้ง ชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาน้ำหนักแห้ง และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

12.3 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสเบื้องต้น

นำเชื้อที่ได้ตรวจสอบเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสแล้วว่ามีแอคติวิตีค่อนข้างสูงมาเพาะบนอาหารวุ้น xylan complex medium (ภาคผนวกที่ 1.6) โดยวิธี spot บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 7 วัน นำมาตรวจดูวงใสรอบโคโลนีเทียบกับเชื้อ *Streptomyces sp. 42-9* และ *Streptomyces sp.190-1*

12.4. การหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส

ใส่น้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อลงในหลอดเก็บเชื้ออายุประมาณ 7 วัน ใช้ลูปค่อยๆเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาอยู่ในน้ำ นับสปอร์เริ่มต้นให้ได้ประมาณ 1.0×10^{7} สปอร์ต่อมล. แล้วถ่าย 1 มล. ของสปอร์แขวนลอย ลงใน 50 มล. ของอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อ2ชนิด คือ อาหารเหลวที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ ตามสูตรของกาญจนา (42) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakajima และคณะ (45) (ภาคผนวกที่ 1.8) และอาหารเหลวชนิด defined medium ที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ตามสูตรของ Morosoli และคณะ (46) (ภาคผนวกที่ 1.9) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทรงกรวยก้นบุบเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 30° ซ. ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 มล.ที่เวลา 4, 5, 6,7,8และ 9 วัน นำไปปั่นแยกเอาเซลล์และส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปนอยู่ออก โดยใช้เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ผ่านการเจือจางให้ได้เอนไซม์ในปริมาณที่เหมาะสม มา 0.3 มล. เติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย 0.3 มล. ของ 1% ไซแลน, 2.4 มล.ของ 0.1 M. อะซีเตตบัฟเฟอร์

pH 5.5 บ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55° ซ. เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 10 นาที วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้น จากการที่ไซแลนเนส ย่อยสลายไซแลนเป็นไซโลส ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson (47-48) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานไซโลสที่สร้างขึ้นในช่วงความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อ มล.

1 หน่วยของเอนไซม์ (unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยน ไซแลนเป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนดข้างต้น