

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลอง

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 Yeast extract Peptone medium

Yeast extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Xylose	10	เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ก.2 Basal medium

Yeast extract	1	กรัม
NaCl	3	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.05	กรัม
Xylose	10	เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7.0 ± 0.2 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ก.3 Basal Agar

นำ Basal broth ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรมาเติม Agar จำนวน 20 กรัม ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7.0 ± 0.2 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและวิธีวิเคราะห์

ข.1 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

หลักการ น้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสในสารตัวอย่าง จะรีดิวซ์คอปเปอร์ในสารละลายต่างได้ cuprous oxide ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารละลายอาซิโนโมลิบเดท ทำให้เกิดสีเขียวแกมน้ำเงินและวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

สารเคมี

1. Somogyi

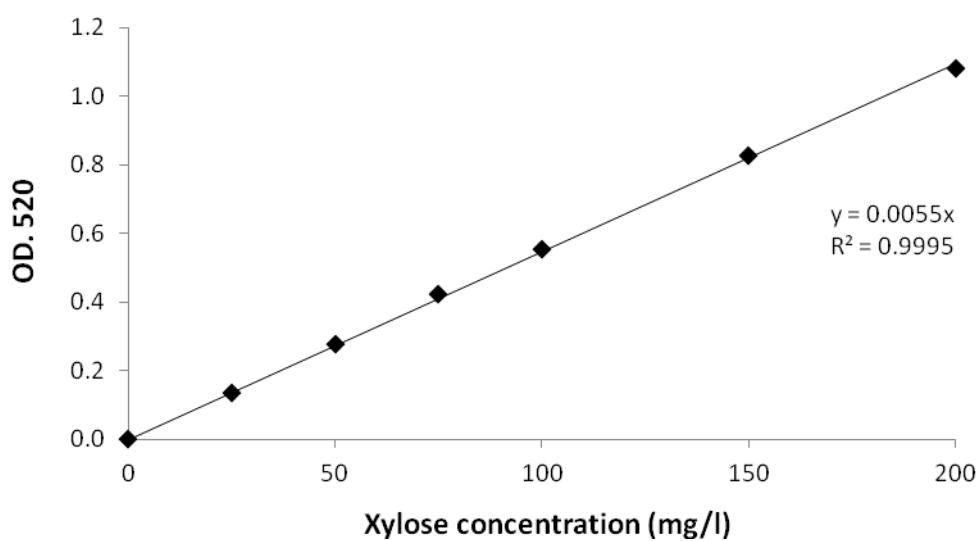
Somogyi I : ละลาย Na_2SO_4 288 กรัม ในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดแล้ว ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เติมโปตัสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 24 กรัม Na_2CO_3 48 กรัม และ NaHCO_3 32 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ต้มเดือดแล้วให้เป็น 1600 มิลลิลิตร

Somogyi II : ละลาย Na_2SO_4 72 กรัม ในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดแล้ว ปริมาตร 300 มิลลิลิตร และเติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 8 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 400 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ต้มเดือดแล้ว

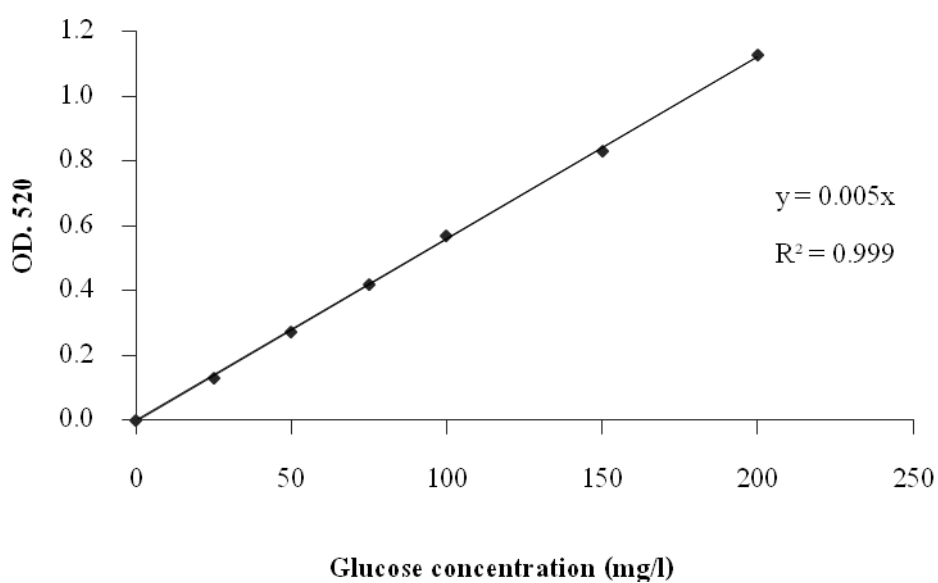
2. Nelson : ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท 100 กรัม ในน้ำกลั่น 1800 มิลลิลิตร เติมกรซัลฟูริกเข้มข้น 84 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายของโซเดียมไฮโดรเจนอาซิเนท ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 12 กรัม ที่ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตรลงไป เก็บสารละลายนี้ในขวดแก้วสีชา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

วิธีทดลอง

1. ใส่สารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย Somogyi 0.1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที
2. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติม Nelson ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. เติมน้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงแล้วนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยวัดเปรียบเทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง
4. อ่านค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้จากการทดลองเดียวกันโดยใช้สารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ข. 2 การหาปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

1. สำหรับตัวอย่างที่เป็น Unknown

Column : Aminex ® HPX-87H Column (300x7.8 mm)

Flow rate : 0.6 ml/min

Temperature : 30 °C

Mobile phase : 0.005 M H₂SO₄

UV detector: 210 nm

Time: 45 min

วิธีทำการทดลอง

นำสารละลายตัวอย่าง 1 ml ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาวิเคราะห์หาค่าปริมาณกรดอินทรีย์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี โดยการฉีดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร

ข.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

นำ cell cultures มาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนที่เป็นตะกอนทิ้ง และเก็บส่วนใสไว้เพื่อนำมาวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง ด้วยกระดาษวัด pH แล้วบันทึกผลการทดลอง จากนั้นนำส่วนใสที่เหลือนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรดอินทรีย์

ข.4 การเจริญของจุลินทรีย์ (Log CFU/ml)

หลังจากเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ จากนั้นตรวจวัดการเจริญโดยตรวจนับเซลล์ที่มีชีวิต ที่เจริญในช่วงเวลาต่างๆ ด้วยวิธี Total plate count (spread plate) บนอาหาร Basal medium ที่มีน้ำตาลไซโลส 10% เป็นแหล่งคาร์บอนตามข้อ 2.1.2 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 – 48 hr นับเซลล์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในจานที่มีเซลล์เจริญประมาณ 25 - 250 โคโลนี

ข.5 การหากิจกรรมของไซลานเนส (Xylanase activity)

หลักการ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ต่อการย่อยสลายสับสเตรท

อุปกรณ์

1. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์
2. เครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง
3. เตาให้ความร้อน

สารเคมี

1. Birchwood xylan
2. sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0
3. สารละลาย Somigyi และ Nelson

วิธีการทดลอง

1. เติมเอนไซม์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายไซแลน (บริษัท Sigma) ความเข้มข้น 1% (w/v) ใน sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ใช้เป็นสับสเตรท)
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที ปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง แล้วนำส่วนใสมาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในข้อ 2
4. ทำ substrate blank โดยเติมเฉพาะสับสเตรท 0.5 มิลลิลิตร แล้วใช้น้ำกลั่นแทนเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีในข้อ 2
5. ทำ enzyme blank โดยเติมเฉพาะเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นแทนสับสเตรท 0.5 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีในข้อ 2
6. นำปริมาณน้ำตาลเมื่อเริ่มต้น (ข้อ 4 และ ข้อ 5) หักออกจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข้อ 3) จะได้ปริมาณน้ำตาลที่เอนไซม์ผลิตได้ภายในเวลา 10 นาที
7. หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส

ข.6 การหาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

หลักการ วัสดุที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของโปรตีนกับคอปเปอร์ไอออน ในสารละลายที่เป็นด่าง และปฏิกิริยารีดักชันของ phosphomolybdate-phosphotungstic acid ใน Folin

reagent โดย aromatic amino acid

อุปกรณ์ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. Reagent

Reagent A โซเดียมคาร์บอเนต 10 กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1

นอร์มอล ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Reagent B คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม ในสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทราเครท (ร้อยละ

1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Reagent C ผสม reagent A กับ reagent B ในอัตราส่วน 50:1 (เมื่อต้องการใช้ภายใน 1 วัน)

2. Folin reagent นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1

3. bovine serum albumin (BSA)

วิธีทดลอง

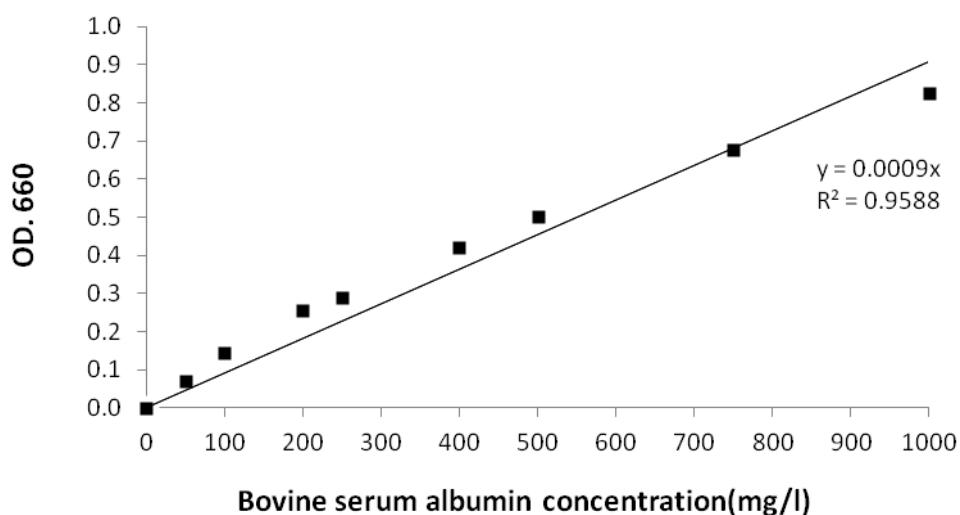
1. นำสารตัวอย่างปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

2. เติม Reagent C ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

3. เติม Folin reagent ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยวัดเปรียบเทียบกับ blank ที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง อ่านค่าความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

5. สร้างกราฟมาตรฐาน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกัน โดยใช้สารละลาย BSA (Bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 250, 400, 500, 750 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของโปรตีน

ข.6 การย้อมสีแกรม

อุปกรณ์

1. แผ่นสไลด์
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์
3. ก่อจตุรศร

สารเคมี

- Ammonium oxalate crystal violet solution

Solution A :

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol 95 เปอร์เซนต์	20.0	มิลลิลิตร

Solution B :

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
Distilled water	80	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกันและทำการเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

- Lugol' solution (Iodine solution)

Iodine	1	กรัม
KI	2	กรัม
Distilled water	300	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายเข้าด้วยกันและทำการเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

- Couterstain solution (safranin-O)

Safranin-O (2.5% solution in 95% ethanol)	10	มิลลิลิตร
Distilled water	100	มิลลิลิตร

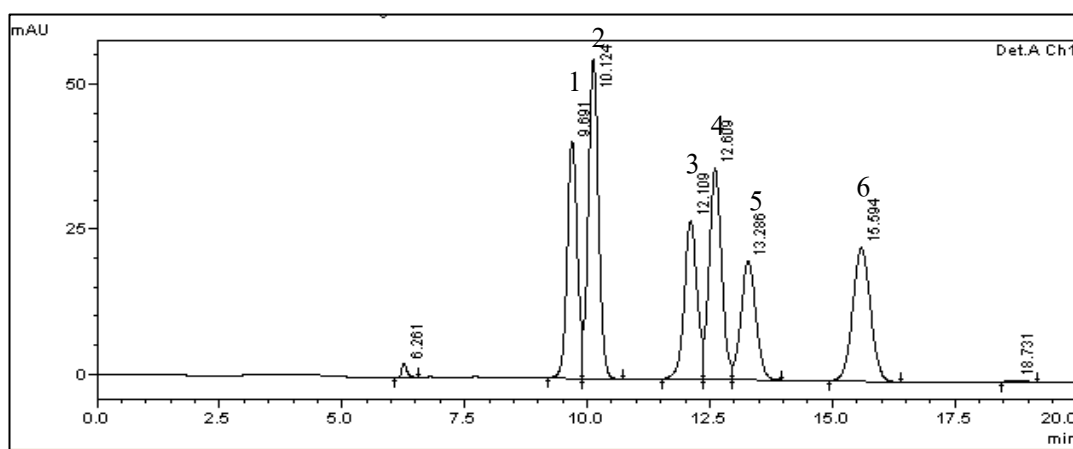
วิธีทำ

นำโคโลนีมาเกลี่ย (smear) บนแผ่นไสลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วทำการ heat fix โดยการนำแผ่นกระจกไสลด์ผ่านเปลวไฟ 2 – 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปย้อมสีโดยหยดสี crystal violet ให้ทั่วมรอยจุลินทรีย์เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างน้ำแล้วหยดสี Gram's iodine ให้ทั่วมรอยจุลินทรีย์เป็นเวลา 1 นาที ล้างน้ำแล้วล้างสีออกด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที ล้างน้ำแล้วย้อมทับด้วยสี safranin เป็นเวลา 1 นาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำ จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปตรวจสอบการติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบ

ค.1 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของกรดอินทรีย์มาตรฐาน โดยพีคที่ 1. คือกรดมาลิก 2. คือกรดมาโลนิก 3. คือกรดซัคซินิก 4. คือกรดแล็กติก 5. คือกรดอิทาโคนิก 6. คือกรดฟูมาลิก



ค.2 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตรที่ไม่เติมจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นชุดควบคุม (control)

