

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Carboxymethylcellulose agar (Hankin and Anagnostakis, 1977)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	กรัม
Carboxymethylcellulose	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลาย carboxymethylcellulose ในน้ำอุ่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร คนจนละลายหมด แล้วละลายส่วนที่เหลือเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทลงในจานอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย congo red test

2. Carboxymethylcellulose broth

ดัดแปลงจาก carboxymethylcellulose agar ซึ่งมีส่วนประกอบเช่นเดียวกัน แต่ไม่เติมน้ำ

3. Nutient agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Indole Test

Tryptone broth

Tryptone	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลาย tryptone ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

นำยาทดสอบ

Kovac's reagent

วิธีทดสอบ

เพาะเชื้อทดสอบลงใน tryptone broth ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจ indole โดยหยดน้ำยา Kovac ลงไป 1-2 หยด เขย่าเบาๆ สังเกตการเกิดสีแดงเข้ม ซึ่งเกิดอยู่ชั้นบนของอาหารเหลว แสดงว่ามี indole เกิดขึ้น หมายความว่าเชื้อสามารถผลิต tryptophanase

5. Voges-Prokauer Test

MR-VP broth	7	กรัม
Poypeptone	5	กรัม
K ₂ HPO ₄	5	กรัม
Glucose	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมด ปรับ pH เป็น 7 ตวงใส่หลอดทดลองปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผ่านเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

น้ำยาทดสอบ

5% alpha naphthol in absolute alcohol

20% aqueous potassium hydroxide

วิธีการทดสอบ

เพาะเชื้อลงในหลอดอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่นิ่งมาเชื้อแล้ว เติม alpha naphthol 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม potassium hydroxide 0.2 มิลลิลิตร เขย่าตรวจผลการเกิดสีแดงเข้มที่ผิวอาหารเหลวภายใน 1 ชั่วโมง ปฏิกริยาเป็นบวก นั้นคือเชื้อสามารถผลิต acetone ตรวจสอบโดย potassium hydroxide และ alpha naphthol เกิดเป็น diacetyl ซึ่งทำปฏิกริยากับสารกัวนาดีนในเปปโตเน ในสภาพด่างเกิดสีแดงสด ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าเกิดปฏิกริยาเป็นลบ

6. Citrate Utilization

Simmon citrate agar	2	กรัม
Sodium citrate	5	กรัม
NaCl	0.2	กรัม
MgSO ₄	1	กรัม
NH ₄ H ₂ PO ₄	1	กรัม
Bromthylmol blue	0.08	กรัม
Agar	15	กรัม

น้ำกลั่น

1

ลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.9 ต้มจนวุ้นละลาย ใส่หลอดทดลอง นึ่งฆ่าเชื้อ แล้ววางเอียง (slant) ให้อาหารแข็งตัว

วิธีการทดสอบ

เพาะเชื้อโดยขีดเป็นเส้นตรงยาวบนผิวอาหาร บ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบสีของอาหาร แบคทีเรียที่ใช้ citrate ได้จะเกิดปฏิกิริยาทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ปฏิกิริยาเป็นบวก และแบคทีเรียที่ไม่ใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน อาหารจะมีสีเขียวดังเดิม ปฏิกิริยาเป็นลบ

7. Nitrate reduction

Nitrate broth

กรัม

Potassium nitrate

0.2

กรัม

Peptone

5

กรัม

Agar

1

กรัม

น้ำกลั่น

1

ลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ใส่หลอดทดลองปริมาตร 15 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Solution A

ละลาย sulfanilic acid 0.8 กรัม ในกรด 5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร

Solution B

ละลาย alpha naphthylamine 0.5 กรัม ในกรด 5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร

5 N acetic acid

ใช้ glacial acetic acid 294 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่น 706 มิลลิลิตร

วิธีการทดสอบ

เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบโดยหยด solution A และ solution B ลงในหลอดอย่างละ 1 หยด ถ้าเกิดสีแดง แสดงว่าเกิดไนไตรท์ นั่นคือเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ nitrate reductase ได้

8. Gelatin Liquefaction Test

Nutrient gelatin

Beef extract

3

กรัม

Peptone

5

กรัม

Gelatin

120

กรัม

น้ำกลั่น

1

ลิตร

แช่เกลตาตินในน้ำ 15-30 นาที ต้มให้ละลายแล้วเติมส่วนประกอบอื่นๆ ปรับ pH เป็น 7.0 นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการทดสอบ

ใช้เข็มเย็บเชื้อและเชื้อแบคทีเรีย แท่งลงตรงๆ กลางอาหารในหลอดอาหารจนเกือบถึงก้นหลอด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำหลอดอาหารใส่ตู้เย็น 2-3 ชั่วโมง ถ้าเกิดการสลายของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบรอยเข็มปลูกเชื้อ แสดงว่าเกิดการสลายเกลตาติน การทดสอบได้ผลบวก

9. Catalase Test

วิธีการทดสอบ

เพาะเชื้อในหลอดอาหาร nutrient agar slant บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หยด 3% H_2O_2 ลงไป 1 มิลลิลิตร ให้ท่วมเชื้อบน slant ถ้าเกิดฟองอากาศ แสดงว่าแบคทีเรียมี catalase หรือใช้ H_2O_2 หยดลงบนโคโลนีในจานแก้ว หรือผสม H_2O_2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร กับเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว ก็เกิดฟองอากาศ

10. Carbohydrate Media for Fermentation Test

10.1 อาหารพื้นฐานใช้ nutrient broth ซึ่งประกอบด้วย

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Bromthylmol blue	0.03	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

10.2 น้ำตาลที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ glucose arabinose xylose และ manitol เตรียมสารละลายน้ำตาลให้เข้มข้น 5 หรือ 10% ขึ้นกับความสามารถในการละลายของน้ำตาล ผสมลงในอาหารพื้นฐาน ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% เทลงในหลอดอาหารพร้อมหลอดดักก๊าซ เป็นการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลแล้วเกิดกรด ถ้ามีการสร้างกรดอาหารจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นเหลือง บางกรณียังเกิดก๊าซด้วย ก๊าซที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ของเหลวในหลอดดักก๊าซ

11. การย้อมสีกรัม

น้ำยาทดสอบ

crystal violet

decolourizer (90% ethanol)

iodine solution (mordant)

safranin O solution

วิธีเตรียมสไลด์

ใช้ loop ไล่น้ำไปและเชื่อมมาผสมในน้ำบนสไลด์ที่สะอาด ละเลงเชืบนสไลด์ให้กระจายออกเป็นบริเวณบางๆ ปล่อยให้สไลด์แห้งในอากาศให้แห้ง (air dry) แล้วนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อนๆ จากตะเกียงเบนเสน เพื่อให้เชืติดแน่นบนสไลด์ (heat-fixed) ปล่อยให้สไลด์เย็นลงก่อนนำไปย้อมสีกรัม

วิธีย้อมสี

1. หยคน้ำยา crystal violet ทิ้งไว้ 1 นาที
2. เทสีออกล้างน้ำก๊อกที่ไหลอ่อนๆ แล้วใส่น้ำยาไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาทีเพื่อให้สีติดดีขึ้น
3. ล้างด้วยน้ำก๊อกที่ไหลอ่อนๆ สักจนน้ำออกจากสไลด์ทั้งหมด
4. ใช้น้ำยาล้างสี (decolourizer) หยดให้ไหลผ่านสไลด์จนน้ำยาที่หยดผ่านไม่มีสีติดออกมาด้วย ใช้เวลา 3-10 วินาที ขึ้นอยู่กับความหนาบางของเชื้อที่เคลือบบนสไลด์
5. ล้างด้วยน้ำอย่างรวดเร็ว
6. ย้อมควบคู่ด้วย counter stain คือ safranin O เป็นเวลา 30-60 วินาที
7. ล้างออกด้วยน้ำ
8. ซับออกด้วยกระดาษทิชชูและปล่อยให้สไลด์แห้งสนิท แล้วตรวจดูด้วยหัวน้ำมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียที่เป็นกรัมบวกจะติดสีม่วงหรือน้ำเงินของ crystal violet ส่วนที่เป็นกรัมลบจะติดสีแดงหรือชมพูของ safranin O

ภาคผนวก ข
วิธีเตรียมน้ำยาเคมี และบัฟเฟอร์

1. 0.1% Congo red

congo red	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย congo red ในน้ำกลั่นคนให้เข้ากัน

2. 1 M NaCl

NaCl	58.44	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่นแล้วคนให้เข้ากัน

3. Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent

3,5-dinitrosalicylic acid	1	%
phenol	0.2	%
sodium sulfite	0.05	%
sodium hydroxide	1	%
sodium potassium tartrate	40	%

ละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid 1 กรัม ในสารละลายของ NaOH ซึ่งมี NaOH 1 กรัม ละลายอยู่ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนให้ละลายจนหมด จากนั้นเติม phenol 0.2 กรัม และ sodium sulfite 0.05 กรัม แล้วคนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

เตรียม 40% sodium potassium tartrate โดยชั่งสารหนัก 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4. Citrate buffer

4.1 0.5 M citrate buffer pH 4.8

citric acid	21	กรัม
tri-sodium citrate	29.41	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลาย citric acid และ tri-sodium citrate ในน้ำกลั่นอย่างละ 200 มิลลิลิตร นำสารละลาย citric acid 120 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย tri-sodium citrate 180 มิลลิลิตร จะได้ pH 4.8 ซึ่งอาจจะใช้ 1 M NaOH ในการปรับ ถ้าจำเป็น

4.2 0.05 M citrate buffer pH 4.8

ละลาย 0.5 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 4.8

5. Carboxymethylcellulose solution

Carboxymethylcellulose	1	กรัม
0.05 M citrate buffer	80	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

ละลาย carboxymethylcellulose ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 อุณหภูมิให้ carboxymethylcellulose ละลายจนหมด แล้วเติม 0.05 M citrate buffer ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

6. Solution C

Solution A : 2% w/v Na_2CO_3 ใน 0.1 M NaOH

ชั่ง Na_2CO_3 1 กรัม ละลายในสารละลาย 0.1 M NaOH ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ชั่ง NaOH 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

Solution B₁ : 1% w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

ชั่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ หนัก 0.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร

Solution B₂ : 2% w/v $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

ชั่ง $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ หนัก 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร

Solution C : solution A 50 มิลลิลิตร ผสมกับ solution B₁ และ solution B₂ อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร

7. 1 N Phenol

เจือจาง Folin reagent ด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 : 1 เก็บใส่ขวดสีชา

ภาคผนวก ค

การคำนวณหาค่า enzyme activity และ specific activity

1. การคำนวณปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามหลักของ The International Union of Biochemistry

$$\begin{aligned} 1 \text{ enzyme unit} &= 1 \text{ ไมโครโมลของสับสเตรตที่ถูกย่อยสลายใน 1 นาที} \\ &= 1 \text{ ไมโครโมลของกลูโคสที่ถูกปล่อยใน 1 นาที} \\ &= 0.180 \text{ มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยใน 1 นาที} \end{aligned}$$

ถ้า 0.180 มิลลิกรัมกลูโคสปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า	1	หน่วย
ดังนั้น 1.000 มิลลิกรัมกลูโคสที่ปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า	1	หน่วย
	0.180	
ถ้าปลดปล่อยกลูโคส x มิลลิกรัม ใน 30 นาที ค่า	0.185 x	หน่วย

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร

$$\text{ถ้าใช้เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร มีค่าหน่วยเอนไซม์} = \frac{(0.185) (\text{มิลลิกรัมกลูโคส})}{0.5}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

ถ้าวัดค่า OD ได้ 1.15

นำมาคำนวณหาค่ามิลลิกรัมกลูโคสจากสมการ (ภาคผนวก ง)

$$\begin{aligned} y &= 3.213x \\ x &= y/3.213 \\ &= 1.15/3.213 \\ &= 0.358 \quad \text{มิลลิกรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้นจะมีค่า

$$\begin{aligned} \text{Enzyme activity} &= \frac{0.185 \times 0.358}{0.5} \\ &= 0.132 \quad \text{หน่วย/มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

2. การคำนวณปริมาณโปรตีน

นำค่า OD ที่วัดได้ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA ได้เป็นค่าความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml) นำมาคำนวณหาค่ามิลลิกรัมโปรตีนจากสมการ (ภาคผนวก ง)

$$y = 1.811$$

$$x = y / 1.811 \quad \text{มิลลิกรัม}$$

ถ้าวัด OD ได้ 0.215

นำมาคำนวณหาค่าปริมาณโปรตีนจากสมการ

$$\begin{aligned} x &= 0.215 / 1.811 \\ &= 0.119 \quad \text{มิลลิกรัม} \end{aligned}$$

จากการทดลองใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.3 มิลลิกรัม

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น จะมีค่าปริมาณโปรตีน} &= 0.119 / 0.3 \\ &= 0.397 \quad \text{มิลลิกรัม} \end{aligned}$$

3. การคำนวณค่า specific activity

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{enzyme activity (U/ml)}}{\text{protein (mg/ml)}} \quad \text{U/mg protien}$$

ภาคผนวก ง

การทำเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสและโปรตีน

1. กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

- 1.1 เตรียม glucose stock solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยละลายกลูโคส 100 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร
- 1.2 เตรียมสารละลายกลูโคสจาก stock solution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05-0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- 1.3 เติม DNS reagent 2 มิลลิลิตร ในแต่ละความเข้มข้น ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ยกออก เติม 40% Na-K tartrate ที่ให้เอ็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุม ที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายกลูโคส นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับปริมาณกลูโคส

จากกราฟนำมาคำนวณสมการเส้นตรงได้ความสัมพันธ์เป็น

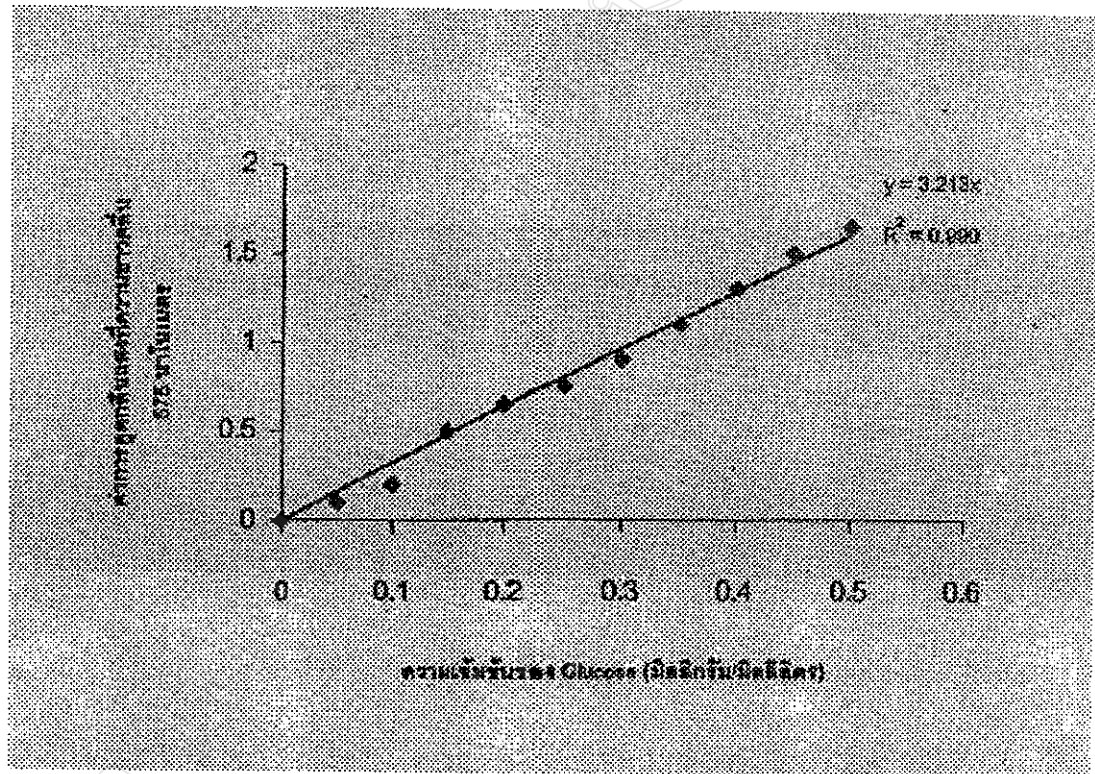
$$y = 3.213 x$$

y คือ ค่าการดูดกลืนแสง

x คือ ปริมาณกลูโคสเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตาราง 11 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคส
ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร

ความเข้มข้นที่ต้องการ ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาณที่นำมาจาก stock (ml)	ปริมาณน้ำกลั่นที่เติม (ml)	OD ₅₇₅
0	0	1.00	0
50	0.05	0.95	0.110
100	0.10	0.90	0.212
150	0.15	0.85	0.505
200	0.20	0.80	0.651
250	0.25	0.75	0.752
300	0.30	0.70	0.908
350	0.35	0.65	1.116
400	0.40	0.60	1.321
450	0.45	0.55	1.524
500	0.50	0.50	1.650



ภาพ 7 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

2. กราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin (BSA)

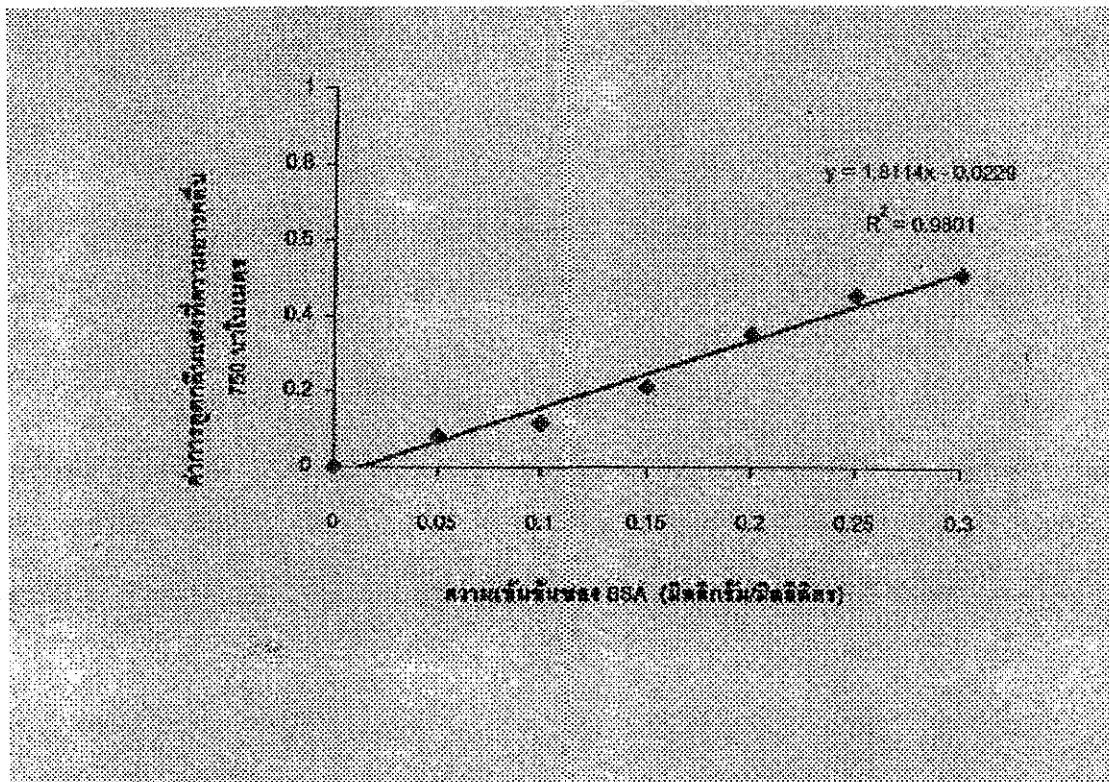
1.4 เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่ง BSA 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1.5 เติมสารละลาย reagent C ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที

1.6 เติมสารละลาย Folin-Phenol reagent ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

ตาราง 12 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSA ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ความเข้มข้นที่ต้องการ ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาณที่นำมาจาก stock (ml)	ปริมาณน้ำกลั่นที่เติม (ml)	OD_{750}
0	0	1.00	0
50	0.05	0.95	0.082
100	0.10	0.90	0.117
150	0.15	0.85	0.215
250	0.25	0.75	0.459
300	0.30	0.70	0.515



ภาพ 8 กราฟมาตรฐานสารละลาย BSA