บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อ Streptomyces sp. จากดินตัวอย่าง

นำตัวอย่างดินมาตัวอย่างละประมาณ 1 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงไป 5 มล. ปั่นให้เข้ากัน ใช้ลูป (loop) จุ่มสารแขวนลอยดินในน้ำ (soil suspension) ที่ได้ลาก (streak) บนอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Chen และคณะ (32) ซึ่งอยู่ในภาคผนวกหมายเลข 1 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนมีการเจริญของเชื้อและมีการสร้างสปอร์

นำเชื้อที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยลากเชื้อบนอาหารแข็งให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ แล้วแยกเอาโคโลนีเดี่ยวไปเก็บไว้ในอาหารแข็งเอียง (agar slant) ซึ่งปรับปรุงจากสูตรอาหารของ Kasumi และคณะ (42) กับ Chen และคณะ (32) ซึ่งอยู่ในภาคผนวกหมายเลข 2.

2. การจัดหมวดหมู่ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

ศึกษาลักษณะการเจริญ (Cultural characteristics) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) และลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiological characteristics) ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ที่แยกได้จากดินตัวอย่าง โดยดำเนินการทดสอบตามวิธีของอินเตอร์เนชั่นแนลสเตรปโตไมซิสโปรเจค (67) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ คือ

- ซาเพค อการ์ (Czapek's agar, ภาคผนวกหมายเลข 3)
- ซอลท์ โทเรอแรนซ์ อการ์ (Salt Tolerance agar, ภาคผนวกหมายเลข 4)
- สตาร์ช อการ์ (Starch agar, ภาคผนวกหมายเลข 5)
- ยีสต์ เอกซแทรก-มอลท์ เอกซแทรก อการ์ (Yeast extract-malt extract agar, ภาคผนวกหมายเลข 6)
- โอทมิลล์ อการ์ (Oatmeal agar, ภาคผนวกหมายเลข 8)
- อินออร์แกนนิค ซอลท์-สตาร์ช อการ์ (Inorganic salts-starch agar, ภาคผนวกหมายเลข 9)

- กลีเซอรอล-แอสพาราจีน อการ์ (Glycerol-asparagine agar, ภาคผนวกหมายเลข 10)

- เปปโตน-ยีสต์ เอกซแทรก ไอร์ออน อการ์ (Peptone-yeast extract iron agar, ภาคผนวกหมายเลข 11)

- ไทโรซีน อการ์ (Tyrosine agar, ภาคผนวกหมายเลข 12)

- ทริปโตน-ยีสต์ เอกซแทรก บรอท (Tryptone-yeast extract broth, ภาคผนวกหมายเลข 13)

- เบซอล มินเนอรอล ซอลท์ อการ์ (Basal-mineral salts agar, ภาคผนวกหมายเลข 15) ที่เติม 1 % ของน้ำตาลเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) ต่อไปนี้ชนิดใดชนิดหนึ่งคือ ดี-กลูโคส (D-glucose), ดี-ฟรุคโตส (D-fructose), ดี-ไซโลส (D-xylose),แอล-อราบิโนส (L-arabinose), ดี-กาแลคโตส (D-galactose), ดี-แมนนิทอล (D-mannitol),ซูโครส (sucrose), แอล-แรมโนส (L-rhamnose), ซัลลิซิน (salicin),แรฟฟิโนส (raffinose) หรือไอ-อินโนซิทอล (i-inositol)

นอกจากนี้ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทัศน์แบบธรรมดา (Olympus, Japan) และศึกษาลักษณะของผิวสปอร์ (Spore surface) ด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบสแกนนิง (Scanning electron microscope, Hitachi, รุ่น S-430, Japan) โดยบ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน แล้วจัดหมวดหมู่ของเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ตามหลักของ Bergey (68)

3. การเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าว (H_2SO_4 hydrolysate of rice straws)

วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chen และ Anderson (32) โดยนำฟางข้าวแห้งมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งมา 3 กรัมใส่ลงใน 100 มล.ของ 0.1 N H_2SO_4 นำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 30 นาที นำมากรองเอากากออก ปรับ pH ของสารละลายที่ได้ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย 10 N NaOH

ส่วนการเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของแกลบ, เปลือกข้าวโพด และซังข้าวโพด ใช้วิธีการเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้นนี้

4. การเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจหาเอนไซม์

4.1 การเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทรงกรวย (Erlenmeyer flask)

ใส่น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 มล. ลงในหลอดเก็บเชื้อ (stock culture) อายุประมาณ 7-10 วัน ใช้ลูปค่อย ๆ เขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาอยู่ในน้ำ นำไปถ่ายลงใน 50 มล. ของอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (starter) ตามสูตรของ Chen (27 ; ภาคผนวก หมายเลข 16) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick Scientific, Co. Inc., U.S.A. รุ่น G-27) ด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. นำหัวเชื้อมาถ่ายลงใน 80 มล. ของอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย 3 % ของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าว, 1 % เปปโตน, 0.5 % ยีสต์ เอกซแทรก และ 0.1 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (pH 7.0) อาหารนี้บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. โดยใช้หัวเชื้อปริมาตรประมาณ 6 % ของอาหารเหลวทั้งหมด นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. กรองเซลที่ได้ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างเซลด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง นำเซลที่ได้ไปตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลโดยใช้ความร้อนดังจะกล่าวไว้ในหัวข้อที่ 5

4.2 การเลี้ยงเชื้อในถังหมัก (Fermentor)

เตรียมอาหารเหลวซึ่งประกอบด้วย 3 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด (H_2SO_4 hydrolysate of corn hull), 1 % มอลท์ เอกซแทรก, 0.3 % ยีสต์ เอกซแทรก และ 0.01 % $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (pH 8.0) ปริมาตร 4 ลิตร ใส่ลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วใส่หัวเชื้อซึ่งเตรียมตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 4.1 ลงไปให้ได้ปริมาตรเป็น 6 % ของอาหารเหลวทั้งหมด กวนด้วยใบพัดความเร็ว 400 รอบ/นาที ความดันอากาศที่ให้ 3.5 กก./ตร.ซม. ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชม. เก็บเซลโดยนำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (Sorval RC-5B, Du Pont Instruments) ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลที่ได้ไปตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลโดยใช้ความร้อน ตามวิธีที่จะกล่าวในหัวข้อต่อไป

5. การตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลโดยใช้ความร้อน

วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Takasaki และคณะ (45) โดยนำเซลที่กรองได้

ใส่ลงใน 0.025 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) คนให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปกรอง เก็บเซลที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. การหาน้ำหนักแห้งของเซล

นำอะลูมินัมฟอยล์ที่จะใช้หาน้ำหนักแห้งของเซลไปอบในตู้อบแห้ง 105 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เย็นในเดซซิเคเตอร์ (dessicator) นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งที่ชั่งละเอียด ถึง 0.01 มก. จนได้น้ำหนักที่คงที่ ชั่งเซลที่ต้องการหาน้ำหนักแห้งในภาชนะดังกล่าวข้างต้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักที่คงที่ แล้วคำนวณหาน้ำหนักแห้ง

7. การตรึงเซล Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

7.1 การตรึงเซลโดยใช้โซเดียมอัลจิเนท (Sodium alginate)

วิธีการตรึงเซลโดยใช้โซเดียมอัลจิเนทดัดแปลงมาจากวิธีของ Takata และคณะ (48) โดยผสม 50 มล.ของ 2 % โซเดียมอัลจิเนท (500 cps., Nakarai Chemicals, Ltd., Japan) กับ 50 มล.ของ 10 % สารแขวนลอยของเซลในน้ำ (cell suspension) คนให้เข้ากัน แล้วนำไปทำให้เป็นหยดโดยใช้ peristaltic pump ดึงสารละลายผสมที่ได้ผ่านหลอดแก้วปลายแหลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.7 มม. หยดลงใน 1 ลิตรของสารละลายแคลเซี่ยมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีแท่งแม่เหล็กกวนอยู่ (magnetic stirrer) จะได้เม็ดเจล (gel bead) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5-2.0 มม. นำเม็ดเจลที่ได้ซึ่งมีเซลตรึงอยู่ภายในแช่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 2 ชม. โดยมีแท่งแม่เหล็กกวนอยู่ตลอดเวลา แล้วกรองเม็ดเจลนำมาแช่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

7.2 การตรึงเซลโดยใช้ไคโตแซน (chitosan)

วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hiroshi และคณะ (50) โดยชั่งไคโตแซน (จาก crab shells, practical grade, Sigma Chemical, U.S.A.) 0.25 กรัมใส่ใน 25 มล.ของ 20 % กรดอะซิติค (ปริมาตร/ปริมาตร) นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ กวนให้ละลาย ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.0 โดยใช้ 40 % NaOH เติมน้ำให้ได้ปริมาตรเป็น 50 มล. นำไปผสมกับ 100 มล. ของ 10 % สารแขวนลอยของเซลในน้ำ (น้ำหนัก/ปริมาตร) กวนให้เข้ากันแล้วกรอง เอาตะกอนที่ได้มาทำให้เป็นเส้นโดยใช้เครื่องบีบ ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางของรูประมาณ 1.5 มม. ตัดเป็นท่อน

เล็ก ๆ ยาวประมาณ 2.0 มม. นำไปใส่ตะแกรงร่อน เป่าด้วยเครื่องเป่าแห้ง (dryer) พร้อมทั้งเขย่าแรง ๆ จนกระทั่งแห้ง

8. การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

8.1 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ภายในเซล

ทำได้โดยการวัดปริมาณของฟรุคโตสที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกลูโคสโดยเอนไซม์ดังกล่าว ขั้นตอนดำเนินการคือ บ่มเซล 50 มก. (น.น.ชื้น) ซึ่งผ่านขบวนการตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลดังได้กล่าวมาแล้วในข้อ 5 ใน 0.2 มล.ของ 0.5 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, 1.0 โมลาร์ กลูโคส 0.6 มล., 0.1 โมลาร์ $MgSO_4.7\ H_2O$ 0.1 มล., 0.01 โมลาร์ $CoCl_2.6H_2O$ 0.1 มล. และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 2.0 มล. บ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายตัวอย่างที่เวลา 1 นาที และทุก ๆ 10 นาทีเป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจาง 300 เท่าด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปหาปริมาณของฟรุคโตสโดยวิธีของ Marshall และ Kooi (13) ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Dische และ Borenfreund (69)

8.2 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ภายในเซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนท หรือไคโตแซน

ชั่งเซลที่ถูกตรึงโดยคำนวณให้มีปริมาณเซลประมาณ 100 มก. (น.น.ชื้น) นำมาบ่มใน 0.8 มล. ของ 1.0 โมลาร์ Tris (hydroxymethyl) aminomethane (pH 9.0), 1.0 โมลาร์ กลูโคส 2.0 มล., 0.1 โมลาร์ $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 มล. และ 0.001 โมลาร์ $CoCl_2.6H_2O$ 0.4 มล. เติมน้ำให้ได้ปริมาตรเป็น 4.0 มล. นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม. เก็บตัวอย่างไปหาปริมาณฟรุคโตสที่เวลา 1 นาที และทุก ๆ 20 นาที เป็นเวลา 1 ชม. โดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 8.1

ในที่นี้ 1 หน่วยของเอนไซม์ (unit) หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตส 1 ไมโครโมล (umole) ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะของวิธีการตรวจสอบเอนไซม์ดังกล่าวมาข้างต้น

9. การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของน้ำตาลฟรุคโตส

การหาปริมาณของฟรุคโตสในที่นี้ใช้ตามวิธีของ Marshall และ Kooi (13)

ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Dische และ Borenfreund (69) ขั้นตอนการดำเนินการมีดังนี้ เตรียมสารละลายของน้ำตาลฟรุคโตสที่มีความเข้มข้น 1,3,5,8,10,15,20,30,40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมล. บรรจุในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มล. โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ (blank) เติม 1.5 % Cysteine HCl ลงไป 0.2 มล., 70 % ของสารละลายกรดซัลฟูริคเกรดวิเคราะห์ 6.0 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม 0.12 % alcoholic carbazole 0.2 มล. ลงไปทันที เขย่าแล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง (ice bath) ทันที เป็นเวลาประมาณ 5 นาที นำไปวัดค่า optical density (OD.) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Double beam spectrophotometer, รุ่น 210-5763, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนมิเตอร์ (nm)

เขียนกราฟระหว่างปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสและค่า OD.

10. การหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิตหัวเชื้อของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

เลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ซึ่งประกอบด้วย 1 % เปปโตน, 0.5 % ยีสต์ เอกซแทรก และ 0.1 % $MgSO_4.7H_2O$ (pH 7.0) โดยผันแปรสารแหล่งคาร์บอนดังนี้คือ

ก. 1 % ไซโลส

ข. 3 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าวและ 0.5 % ไซโลส

ค. 3 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าวและ 1.0 % ไซโลส

โดยบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. แล้วถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์ตามสูตรที่กล่าวไว้ในข้อ 4.1 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. นำเซลที่ได้ไปตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลโดยใช้ความร้อนดังกล่าวไว้ในข้อ 5 แล้วนำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 8.1

11. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

11.1 การหาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวกหมายเลข 17) บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. แล้วถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์ตามสูตรที่กล่าวไว้ในข้อ 4.1 ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนต่างกันดังต่อไปนี้ คือ

ก. สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของฟางข้าว

ข. สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของแกลบ

ค. สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด

ง. สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของซังข้าวโพด

โดยผันแปรปริมาณของสารแหล่งคาร์บอนเป็น 1 %, 2 %, 3 % และ 4 % (ปริมาตร/ปริมาตร) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. วัดเอนไซม์แอคติวิตีของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน

11.2 การหาชนิดและปริมาณของสารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

11.2.1 การหาชนิดของสารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 3 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด, 1 % ของสารแหล่งไนโตรเจน, 0.5 % ยีสต์ เอกซแทรก, 0.1 % $MgSO_4.7H_2O$ (pH 7.0) ขั้นตอนและวิธีการในการเลี้ยงเชื้อกระทำเช่นเดียวกับในข้อ 11.1 สารแหล่งไนโตรเจนที่ใช้มีดังนี้

- ทริปโตน (tryptone)
- เปปโตน (peptone)
- โพลีเปปโตน (polypeptone)
- โปรตีโอสเปปโตน (proteose peptone)
- บีฟ เอกซแทรก (beef extract)
- มอลท์ เอกซแทรก (malt extract)
- พีนัท เคก ไฮโดรไลเซท (peanut cake hydrolysate) จากโรงงานไทยชูรส

วัดเอนไซม์แอคติวิตีของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11.2.2 การหาปริมาณของสารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

สารแหล่งไนโตรเจนที่นำมาหาปริมาณที่เหมาะสม คือ มอลท์-เอกซแทรก โดยผันแปรปริมาณของมอลท์ เอกซแทรก ให้เป็น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับข้อ 11.2.1 เมื่อได้ปริมาณของมอลท์ เอกซแทรก ที่เหมาะสมแล้ว จึงผันแปรปริมาณของยีสต์ เอกซแทรกดังนี้ 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 และ 1.5 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับข้อ 11.2.1 แต่สารแหล่งไนโตรเจนคือ มอลท์ เอกซแทรก ที่ปริมาณที่เหมาะสม

11.3 การหาชนิดและปริมาณของเกลือแร่ที่เหมาะสม

ดำเนินการทดลองเหมือนกับในข้อ 11.1 และ 11.2 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับข้อ 11.2.1 แต่ใช้ 0.3 % ยีสต์ เอกซแทรก และ 1 % มอลท์ เอกซแทรก เป็นสารแหล่งไนโตรเจน แล้วผันแปรชนิดและปริมาณของเกลือแร่ดังต่อไปนี้

ก. $MnSO_4.7H_2O$ 0.005 %, 0.01 % และ 0.03 %

ข. $MgSO_4.7H_2O$ 0.01 %, 0.03 %, 0.05 % และ 0.1 %

ค. $CoCl_2.6H_2O$ 0.001 %, 0.005 %, 0.01 %, 0.02 % และ 0.03 %

เมื่อได้ปริมาณที่เหมาะสมของเกลือแร่แต่ละชนิดแล้ว ศึกษาเอนไซม์แอคติ-วิตีของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีเกลือแร่อยู่ 2 ชนิดได้แก่ $MnSO_4.7H_2O$ กับ $MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.7H_2O$ กับ $CoCl_2.6H_2O$ หรือ $MgSO_4.7H_2O$ กับ $CoCl_2.6H_2O$

11.4 การหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp สายพันธุ์ 190-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 3 % สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกข้าวโพด, 1 % มอลท์ เอกซแทรก, 0.3 % ยีสต์ เอกซแทรก, 0.01 % $CoCl_2.6H_2O$ ซึ่งปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้เป็น 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 โดยใช้ 1 N HCl และ 1 N NaOH ที่ปราศจากเชื้อ แล้ววัดเอนไซม์แอคติวิตีตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 8.1