หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยทรัพยากร

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) ของ New Brunswick Co., U.S.A.

2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer,spectronic 21) ของ Bausch and Lomb)

3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) รุ่น 240 ของ Corning, U.S.A.

4. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และ A200S ของ Sartorius, U.S.A.

5. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของ Kokusan, Japan

6. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-Top Centrifuge) รุ่น H-103 N series ของ Kokusan, Japan

7. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของ Beckman, U.S.A.

8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของ Memmert, Germany

9. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar Flow ของ ISSCO รุ่น BV-124, U.S.A.

10. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep Freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของ Sanyo Electronic Co., Ltd., Japan

11. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHK ของ Olympus, Japan

12. กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน (scanning electron microscope) รุ่น JSM-T220A, Japan, ในศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน (Kjeldatherm) ของ Gerhardt, Germany

สารเคมี (บริษัทซิกมา, U.S.A.)

1. ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (xylan from oat spelts)

2. พารา-ไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (p-nitrophenyl-β-D-xylo pyranoside)

3. พาราไนโตรฟีนิล-แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ (p-nitrophenyl-α -L-arabinofuranoside)

4. พารา-ไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol)

5. ดีออกซีไรโบนิวคลีอิค แอซิด (deoxyribonucleic acid) จาก Calf Thymus Type 1

6. ไดฟีนิลลามีน (diphenylamine)

7. โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA)

8. อลูมินา (alumina type A5)

การแยก (isolation) *Streptomyces* spp. จากตัวอย่างดิน

1. นำตัวอย่างดินประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 10 มล. ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) ใช้ลูป (loop) จุ่มสารแขวนลอยดินในน้ำกลั่น (soil suspension) ที่ได้ ลาก (streak) บนฮิวมิค แอซิด-วิตามิน อการ์ มีเดียม (Humic Acid-Vitamin Agar Medium, HV agar) (Hayakawa and Nonomura, 1987, ภาคผนวก ก. หมายเลข 1)

2. นำสารแขวนลอยดินจากข้อ 1. มาเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงเป็นลำดับ ใช้ปิเปตที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูดสารแขวนลอยในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มล. ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ HV agar ที่มีผิวหน้าแห้งพอเหมาะ จากนั้นกระจาย (spread) สารแขวนลอยดินให้ทั่วผิวหน้าอาหาร

3. นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 1. และ 2. ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซล-

เซียส นานประมาณ 7 วัน จะพบการเจริญของ Streptomyces spp. เลือกเขี่ยโคโลนีของ Streptomyces spp. ที่เจริญขึ้นมาทำให้บริสุทธิ์ โดยลากเชื้อบนอาหารแข็งชนิด MS (MS agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 2 ที่เติมไซโคลเฮกซิมีด ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. แยกเอาโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นไปเก็บในอาหารแข็งเอียง (agar slant) ชนิด MS (ภาคผนวก ก. หมายเลข 2) เพื่อใช้ในการตรวจสอบขั้นต่อไป

4. นำ Streptomyces spp. ที่แยกได้จากข้อ 3. ปลูก(point inoculation) บนอาหารแข็งชนิดเบนเนท (Bennet agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 วัน จึงนำมาศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิด และคัดเชื้อที่มีลักษณะเหมือนกันออกไป

<u>การเก็บรักษาเชื้อ Streptomyces spp.</u>

เก็บในอาหารแข็งเอียงชนิด MS (ภาคผนวก ก. หมายเลข 2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 วัน จึงนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

<u>การเตรียมสปอร์</u>

ปลูกเชื้อ Streptomyces sp. ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน จึงนำมาขูดสปอร์ออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นตัวทำละลาย ดูดสารแขวนลอยของสปอร์ออกมากรองผ่านชุดกรองสปอร์ (ภาคผนวก ค. หมายเลข 2.1) และนำสารแขวนลอยสปอร์ที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จึงเทส่วนของน้ำใสทิ้งไป จากนั้นใช้ 20 % กลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง เป็นตัวทำละลายและเจือจางให้มีความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ 10^{8} สปอร์ต่อมล. นำไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

การเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน บนอาหารแข็ง (solid medium)

นำเชื้อ Streptomyces spp. ที่แยกได้ปลูก (point inoculation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรในภาคผนวก ก. หมายเลข 4 (ซึ่งมีวุ้นผง 20 % และมีไซแลน 0.5 %) นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จึงนำมาวัดขนาดของวงใส (clearzone) และขนาดโคโลนี เทียบเป็นอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส

การเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างบีตาไซโลซิเดสในอาหารเหลว(liquid medium)

1. ขั้นการคัดแยกเชื้อที่สามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้

เลี้ยง Streptomyces spp. ที่คัดแยกได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Nakanishi และคณะ (1984) โดยเขี่ยเชื้อ Streptomyces spp. ที่มีอายุประมาณ 7-10 วัน จำนวน 1-2 ลูป ใส่ลงในขวดแก้วทรงกรวย (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มล. ที่บรรจุขดลวดสปริงอยู่ภายในและมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามภาคผนวก ก. หมายเลข 4 ปริมาตร 25 มล. บรรจุอยู่ นำไปบ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิชนิด rotary shaker ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน กรองแยกเซลด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ล้างเซลล์อีกครั้งด้วยน้ำกลั่น ส่วนเซลล์ที่ได้นำมาเตรียมและวิเคราะห์ปริมาณบีตาไซโลซิเดส เปรียบเทียบและคัดเลือกสายพันธุ์ของ Streptomyces spp. ที่ให้บีตาไซโลซิเดสสูงสุด

2. ขั้นการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์

ปลูกสปอร์ Streptomyces sp. ที่มีความหนาแน่นประมาณ 10^{8} สปอร์ต่อมล. ซึ่งเตรียมได้จากวิธีการในหน้า 29 ปริมาตร 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด ทริพติค ซอย บรอท (Tryptic Soy Broth, TSB) ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 บรรจุอยู่ใน

ขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. และมีขดลวดสปริงบรรจุอยู่ภายใน นำไปบ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิชนิด rotary shaker ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่งโมง จึงนำมาใช้เป็นหัวเชื้อ (inoculum) ในการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมในการสร้างบีตาไซโลซิเดสโดยใช้ 10 % ของหัวเชื้อใส่ลงในสูตรอาหารที่ต้องการศึกษา ปริมาตร 25 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. และมีขดลวดสปริงบรรจุอยู่เช่นกัน จากนั้นนำไปบ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบ rotary shaker ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ กัน

<u>การเตรียมบีตาไซโลซิเดส</u>

กรองเซลล์ *Streptomyces* sp. ด้วยกระดาษกรองชนิด Whatman เบอร์ 4 ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำเซลล์มาเตรียมบีตาไซโลซิเดส ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Nakanishi และคณะ (1987) โดยนำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกโดยการบดกับผงอลูมินา (alumina) ในโกร่ง ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นเติม 10 มล. ของ 0.1 โมลาร์ อะซิเทตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ลงไปเป็นตัวทำละลาย นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดส และวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) เพื่อติดตามการเจริญ รวมทั้งเป็นส่วนที่ใช้ศึกษาแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส

<u>การเตรียมไซแลเนส</u>

1. <u>การเตรียมที่ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์</u> (crude enzymes)

เตรียมโดยกรองเอาส่วนน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ได้จากการปลูกเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4 ในสูตรอาหารที่ต้องการศึกษา นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้จะเป็น crude enzyme

2. การเตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์

เตรียมโดยเลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก. หมายเลข 5 ดังวิธีการในข้อ 2. หน้า 30 ยกเว้นให้บ่มเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นระยะเวลา และอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการสร้างบีตาไซโลซิเดสที่ศึกษาได้ ดังนั้นเมื่อกรองแยกเซลล์ และกากอาหารออกไปศึกษาสมบัติของบีตาไซโลซิเดส จะเหลือส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลเนสเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสทั้งหมดมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 % ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากน้ำใส ด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ pH 5.5 ในปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปปั่นแยกส่วนตะกอนออกด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาที ส่วนใสที่ได้คือไซแลเนสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว

การตรวจสอบแอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดส

เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Nakanishi และคณะ (1987) ซึ่งส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.5 มล. ของ 10 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside) ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ pH 6.5 และสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 0.5 มล. นำส่วนผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จึงเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มล. ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา ปั่นผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้พาราไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-50 ไมโครกรัมต่อมล.

1 หน่วยของบีตาไซโลซิเดสเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์แล้วได้พาราไนโตรฟีนอล เกิดขึ้น 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

<u>การตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส</u>

เป็นวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Nakajima และคณะ (1984) ซึ่งส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

ก. สารละลายไซแลนความเข้มข้น 10 มก.ต่อมล. ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 0.3 มล.

ข. 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 2.4 มล.

ค. crude enzyme หรือไซแลเนสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่เจือจางด้วย 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ pH 5.5 จนมีความเข้มข้นเหมาะสม ปริมาตร 0.3 มล.

นำส่วนผสมทั้งหมดนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที เก็บตัวอย่างของส่วนผสมที่เวลา 0 และ 10 นาที ครั้งละ 1 มล. หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที จากนั้นจึงนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีการของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952; Nelson, 1944)

1 หน่วยของไซแลเนสเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนแล้วได้น้ำตาลไซโลส เกิดขึ้น 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

<u>การตรวจสอบแอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส</u>

เป็นวิธีการที่ดัดแปลงจาก Mackenzie และคณะ (1987) ซึ่งมีวิธีการทดลองเป็นไปตามการตรวจสอบแอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดส ยกเว้นซับสเทรตที่ใช้จะเปลี่ยนจากพารา-ไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ เป็น พารา-ไนโตรฟีนิล-แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์

1 หน่วยของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดสเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟีนิล-แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ แล้วได้พาราไนโตรฟีนอล เกิดขึ้น 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

<u>การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์</u>

นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติม อัลคาไลด์-คอปเปอร์ รีเอเจนท์ (Alkali Copper Reagent, วิธีเตรียมในภาคผนวก ข. หมายเลข 1.1) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที และทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำเย็นจัด จากนั้นเติมเนลสัน รีเอเจนท์ (Nelson Reagent, ภาคผนวก ข. หมายเลข 1.2) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จึงเติมน้ำกลั่น 5 มล. นำส่วนผสมที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 520 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้น้ำตาลไซโลส ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-200 ไมโครกรัมต่อมล.

<u>การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน</u>

เป็นวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) โดยนำสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ที่มี ปริมาณโปรตีนความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย C (ภาคผนวก ข. หมายเลข 2.3) ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็น เวลานาน 20 นาที จึงเติมสารละลายผสม D (ภาคผนวก ข. หมายเลข 2.4) ปริมาตร 0.5 มล. ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที จึงนำส่วนผสมนี้ไปวัดความสามารถ ในการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้ โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) ที่ความ เข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล.

การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ

เป็นวิธีการที่ดัดแปลงจาก Clark และ Switzer (1977) โดยนำส่วนใสที่ได้จากการเตรียมบีตาไซโลซิเดสซึ่งมีความเข้มข้นเหมาะสม ปริมาตร 1.5 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติม ไดฟีนิลามีน รีเอเจนท์ (Diphenylamine Reagent, ภาคผนวก ข. หมายเลข 3) ปริมาตร 3 มล. ลงไป ผสมให้เข้ากันดี นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลานาน 10 นาที จึงนำมาทำให้เย็นทันทีในน้ำเย็นจัด นำส่วนผสมนี้ไปวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้ ดีเอ็นเอ จาก Calf Thymus ความเข้มข้นในช่วง 0-2.0 ไมโครกรัมต่อมล.

การปรับสภาพแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

1. การปรับสภาพด้วยด่าง (NaOH, Detroy et al., 1981)

เตรียมโดยแช่แหล่งคาร์บอนที่ต้องการศึกษา ความเข้มข้น 10 % ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 % เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง นำมากรองและล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 จึงนำไปอบแห้งเก็บไว้ใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

2. การย่อยด้วยกรดซัลฟูริค (H_2SO_4)

เตรียมโดยใช้กรดซัลฟูริค 1 นอร์มอล ปริมาตร 600 มล. เติมลงในแหล่งคาร์บอน หรือไนโตรเจนที่ต้องการศึกษา ปริมาณ 200 กรัม นำไปนึ่งที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที จึงนำมาเติมน้ำกลั่น 1200 มล. ผสมให้เข้ากันและกรองด้วยผ้าขาวบาง เอาส่วนน้ำใสมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล จากนั้นกรองอีกครั้งด้วยกระดาษ

I16459184

กรอง Whatman เบอร์ 4 ส่วนใสที่ได้นำไปหาปริมาณไนโตรเจน ด้วยวิธี Kjeldahl และแบ่งบางส่วนไปหาน้ำหนักแห้งเพื่อเทียบเป็นน้ำหนักต่อปริมาตร

<u>การหาปริมาณไนโตรเจน (nitrogen content) ด้วยวิธี Kjeldahl</u> (Stayermark, 1951)

นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษาปริมาตร 1-3 มล. ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มล. เติมซอลท์ มิกเจอร์ (salt mixture) 7 กรัม (ซึ่งประกอบด้วยไดโปแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) และ คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ในอัตราส่วน 19:1) ค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นปริมาตร 15 มล. ลงไป จากนั้นนำไปย่อยบนเตาหลุม (digester)ในตู้ควัน จนได้สารละลายใส นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนจึงค่อยๆ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มล. ลงไป จากนั้นนำไปกลั่นบนเตากลั่นโดยดักจับแอมโมเนีย (NH_3) ที่เกิดขึ้นด้วยกรดบอริค (H_3BO_3) เข้มข้น 4 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มล. ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 4) ผสมอยู่ 3 หยด กลั่นจนสารละลายบอริคมีปริมาตร 200 มล. จึงนำสารละลายที่ได้มาไตเตรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริค (HCl) มาตรฐาน ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว และคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{A \times B \times 1.4}{C}$$

A = ปริมาตรกรด HCl (มล.)

B = ความเข้มข้นของกรด HCl (M)

C = ปริมาตรสารตัวอย่าง (มล.)

การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4

1. การศึกษาผลของไซแลน (xylan) ไซโลส (xylose) และกลูโคส(glucose) ต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดส

เลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4 ตามวิธีการในข้อ 2. หน้า 30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก. หมายเลข 4 แต่แปรชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น ไซแลน ไซโลส และกลูโคส ความเข้มข้น 0-2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) วัดแอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสที่เกิดขึ้นตามวิธีการในหน้า 32

2. การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกเพื่อทดแทนการใช้ไซแลน

เลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4 ตามวิธีการใน 2. หน้า 30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก. หมายเลข 4 ที่ไม่เติมไซแลน แต่ทดแทนและแปรชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น กากเมล็ดฝ้าย (ขนาด 50 mesh) กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง (ขนาด 50 mesh) กากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรด เปลือกข้าวโพดบด (ขนาด 50 mesh) เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่าง (ขนาด 50 mesh) รำข้าว (ขนาด 50 mesh) รำข้าวย่อยด้วยกรด ชานอ้อย (ขนาด 50 mesh) แกลบ (ขนาด 50 mesh) และฟางข้าว (ขนาด 50 mesh) โดยใช้ความเข้มข้น 0-4 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) วัดแอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดส ที่สร้างขึ้นจากการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ตามวิธีการในหน้า 32

3. การหาชนิด และปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน เพื่อเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลซิเดส

เลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4 ในสูตรอาหารตามภาคผนวก ก. หมายเลข 4 แต่ใช้ 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแกลบ เปลือกข้าวโพดบด หรือรำข้าวลงไปด้วยโดยแปรความเข้มข้นในช่วง 1-4 %

4. การหาปริมาณที่เหมาะสมของไซแลนที่เสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง และ 3 % เปลือกข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอน ในการสร้างบีตาไซโลซิเดส

เลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับภาคผนวก ก. หมายเลข 4 ยกเว้นมี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างและ 3 % เปลือกข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรปริมาณไซแลนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 0-0.5 % ลงไปด้วย เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำไปหาปริมาณบีตาไซโลซิเดส

5. การหาชนิด และปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพาะเลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

เลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวก ก. หมายเลข 4 ยกเว้นมี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างและ 3 % เปลือกข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นแปรแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆลงไปแทนคอร์นสตีพ ลิเคอร์ (cornsteep liquor) และพอลิเพปโตน (polypeptone) แต่ยังคงสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ไว้เพื่อใช้เป็นแหล่งวิตามิน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์สาร (organic nitrogen) ที่นำมาศึกษาได้แก่ เพปโตน (peptone) สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากมอลท์ (malt extract) กากถั่วเหลืองที่ย่อยแล้ว (soybean hydrolysate, SBH) และรำข้าวที่ย่อยแล้ว (rice band hydrolysate, RBH) ความเข้มข้น 0-3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนแหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรีย์สาร (inorganic nitrogen) ที่นำมาศึกษาได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ยูเรีย ($(NH_4)_2CO$) และ แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ความเข้มข้น 0-0.3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 2. หน้า 30 เป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาวิเคราะห์หาปริมาณบีตาไซโลซิเดส

6. การศึกษาชนิดและปริมาณของเกลือแร่ต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดส

เลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่ง

คาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม จากนั้นแปรเกลือแร่ที่มีชนิด และปริมาณ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังต่อไปนี้

6.1 ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ความเข้มข้น 0-1 %

6.2 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ความเข้มข้น 0-1 %

6.3 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ความเข้มข้น 0-1%

6.4 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 0 -0.1 %

6.5 โพแทสเซียมเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 0-0.1 %

6.6 เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 0-0.01 %

6.7 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$) ความเข้มข้น 0-0.01 %

เพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 2. หน้า 30 เป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาวิเคราะห์หาบีตาไซโลซิเดส

<u>การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4</u>

1. การศึกษาความเป็นกรดด่าง (pH) เริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และเกลือแร่ ที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้างต้น โดยผันแปรความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่า 2.0-12.0 บ่มเขย่าตามวิธีการในข้อ 2. หน้า 30 เป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดส

2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และเกลือแร่ที่เหมาะสมและมีความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 แปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในช่วง 20-50 องศาเซลเซียส บ่มเขย่าตามวิธีการในข้อ 2. หน้า 30 เป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดส

การศึกษาสมบัติของบีตาไซโลซิเดส จาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

1. ความเข้มข้นของซับสเทรต (p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside) ต่อการทำงานของเอนไซม์

โดยใช้เอนไซม์ปริมาณเท่า ๆกัน คือ 6.75 ไมโครกรัมโปรตีน บ่มกับซับสเทรตที่มีความเข้มข้น 0-28 มิลลิโมลาร์ ในการหาแอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสตามวิธีการในหน้า 32 ซึ่งจะได้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของซับสเทรตขณะทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0-14 มิลลิโมลาร์

2. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มบีตาไซโลซิเดส 6.75 ไมโครกรัมโปรตีน กับซับสเทรตที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ตามวิธีการในหน้า 32 ซึ่งจะได้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของซับสเทรตขณะทำปฏิกิริยาเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ โดยผันแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มช่วง 35-70 องศาเซลเซียส

3. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

หาแอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดส ตามวิธีการในหน้า 32 แต่ใช้ซับสเทรตที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และผันแปรค่าความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการทำงานของเอนไซม์ ให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ดังนี้

อะซิเทต บัฟเฟอร์ (acetate buffer) ในช่วง pH 4.0-6.0

ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ในช่วง pH 6.0-8.0

ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ (tris-hydrochloride buffer) ในช่วง pH 8.0-9.5

4. ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

บ่มบีตาไซโลซิเดส 6.75 ไมโครกรัมโปรตีนใน 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์

(acetate buffer) pH 6.5 ที่อุณหภูมิในช่วง 35-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จึงนำมาหาแอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในหน้า 32 แต่ใช้ซับสเทรตที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และมีเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

5. ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มบีตาไซโลซิเดส 6.75 ไมโครกรัมโปรตีนในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆที่ใช้ในข้อ 3. เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำมาหาแอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสที่เหลืออยู่ตามวิธีการในหน้า 32 โดยใช้ซับสเทรตที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และมีเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

การศึกษาสมบัติของไซแลเนส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

1. ความเข้มข้นของซับสเทรต (xylan) ต่อการทำงานของเอนไซม์

ใช้เอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณเท่าๆ กัน คือ 28.5 ไมโครกรัมโปรตีนบ่มกับซับสเทรตที่มีความเข้มข้น 0 ถึง 24 มก.ต่อมล. ในปฏิกิริยาการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในหน้า 33 ซึ่งจะได้ค่าความเข้มข้นของซับสเทรตขณะทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0-2400 ไมโครกรัมต่อมล.

2. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มไซแลเนสปริมาณ 28.5 ไมโครกรัมโปรตีน กับซับสเทรตที่มีความเข้มข้น 15 มก.ต่อมล. ตามวิธีการในหน้า 33 ซึ่งจะมีค่าความเข้มข้นของซับสเทรตขณะทำปฏิกิริยาเท่ากับ 1500 ไมโครกรัมต่อมล. โดยผันแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มในช่วง 40- 80 องศาเซลเซียส

3. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มไซแลเนสปริมาณ 28.5 ไมโครกรัมโปรตีน กับซับสเทรตที่มีความเข้มข้น 15 มก.ต่อมล. ตามวิธีการในหน้า 33 ยกเว้นเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเป็น 60 องศาเซลเซียส แปรความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการทำงานของเอนไซม์ให้มีความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ดังนี้

อะซิเทต บัฟเฟอร์ (acetate buffer) ในช่วง pH 4.0-6.5

ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ในช่วง pH 6.5-8.0

ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ (tris-hydrochloride buffer) ในช่วง pH 8.0-9.5

4. ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

บ่มไซแลเนสที่เตรียมได้จากวิธีในหน้า 32 ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ (acetate buffer) pH 6.0 ที่อุณหภูมิในช่วง 40 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงนำมาหาแอคติวิตีของไซแลเนสที่เหลืออยู่ตามวิธีการในหน้า 33 ยกเว้นเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเป็น 60 องศาเซลเซียส โดยใช้เอนไซม์ปริมาณ 28.5 ไมโครกรัมโปรตีนที่ผ่านการบ่มแล้ว ทำปฏิกิริยากับซับสเทรตที่มีความเข้มข้น 15 มก.ต่อมล. และมีเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

5. ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มไซแลเนสที่เตรียมได้จากวิธีการในหน้า 32 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในข้อ 3. เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำมาหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ตามวิธีการในหน้า 33 ยกเว้นเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเป็น 60 องศาเซลเซียส ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ (acetate buffer) pH 6.0 โดยใช้เอนไซม์ 28.5 ไมโครกรัมโปรตีน กับซับสเทรตที่มีความเข้มข้น 15 มก.ต่อมล. และใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

การจัดหมวดหมู่ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

ศึกษาลักษณะการเจริญ (Cultural Characteristics) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics) ลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiological Characteristics) ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 โดยดำเนินการตามวิธีของ Bergey's Manual Systematic of Bacteriology (Locci, 1989) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ดังนี้

1. เบซอล มิเนอรอล ซอลท์ สตาร์ช อการ์ (Basal Mineral Salt Starch Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 6 ที่เติมแหล่งคาร์บอน (เกรดวิเคราะห์) ความเข้มข้น 1 % ชนิดต่าง ๆ ดังนี้

: ดี-กลูโคส (D-glucose)

: แอล-อราบิโนส (L-arabinose)

: เซลโลไบโอส (cellobiose)

: เดกแทรน (dextran)

: ดี-ฟรุกโตส (D-fructose)

: ดี-กาแลคโตส (D-galactose)

: มายโอ-อิโนซิทอล (myo-inositol)

: ดี-แลคโตส (D-lactose)

: แมนนิทอล (manitol)

: ดี-แมนโนส (D-mannose)

: ดี-เมลิไบโอส (D-melibiose)

: แรฟฟิโนส (raffinose)

: ซาลิซิน (salicin)

: ซูโครส (sucrose)

: ทรีอาโลส (trehalose)

: ดี-ไซโลส (D-xylose)

: โซเดียมอะซิเทต (sodium acetate)

: โซเดียมซิเตรต (sodium citrate)

2. เบนเนท อการ์ (Bennet Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 3 ที่ไม่เติมไซโคลเฮซิมีด)

3. คอลลอย ไคติน อการ์ (Colloidal Chitin Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 8)

4. ซาเพค อการ์ (Czapek's agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 9)

5. เอ๊กโย้ค อการ์ (Egg Yolk Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 10)

6. กลีเซอรอล แอสพาราจีน อการ์ (Glycerol-Asparagine Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 11)

7. อินออแกนิค ซอลท์ สตาร์ช อการ์ (Inorganic Salt Starch Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 12)

8. แมนนิทอล ซอยบีน อการ์ (Manitol Soybean Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 2)

9. นิวเตรียน อการ์ (Nurient Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 13)

10. เพปโตน ยีสต์ เอกแทรกซ์ ไอรอน อการ์ (Peptone Yeast Extract Iron Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 14)

11. สตาร์ช อการ์ (Starch Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 15)

12. ไทโรซีน อการ์ (Tyrosine Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 16)

13. ไซแลน อการ์ (Xylan Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 4 ที่เติมวุ้นผง 20 กรัมต่อลิตร)

14. ยีสต์ เอกแทรกซ์ มอลท์ เอกแทรกซ์ อการ์(Yeast Extract Malt Extract Agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 17)

15. อาหารทดสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน (ภาคผนวก ก. หมายเลข 18)

นอกจากนี้ยังศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Olympus, Japan) และศึกษาลักษณะผิวของสปอร์ (spore surface) โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope รุ่น JSM-T220A) ซึ่งมีวิธีการเตรียมตัวอย่างดังกล่าวในภาคผนวก ค. ข้อ 1. และจัดหมวดหมู่ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ตามลักษณะที่ศึกษา โดยวิธีการที่กล่าวมาแล้ว ตามหลักของ Bergey's Manual Systematic of Bacteriology (Locci, 1989)