สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan

2 ลูปเขี่ยเชื้อ

3 กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 10 มิลลิลิตร บริษัท นิโปร (ประเทศไทย) จำกัด

4 เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง รุ่น Soronex RK 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany

5 เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA

6 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA

7 เครื่องชั่ง รุ่น PG 2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG 285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland

8 เครื่องดูดอากาศ รุ่น A3-S บริษัท Eyela, Japan

9 เครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA

10 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25, บริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan

11 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น Mikro 20 บริษัท Hettich Zentrifugen, Germany

12 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, Germany

13 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich zentrifugen, Germany

14 เครื่องผสมสาร รุ่น Vortex-Genies 2 G-560E บริษัท Scientific Industries, Inc., USA

15 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA

16 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (Digital pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland

17 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA และรุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer บริษัท PerkinElmer, Inc., USA

18 ชุดเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan

19 ชุดเครื่องเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส mini Gel migration trough รุ่น i-mupid บริษัท Cosmo Bio, Japan

20 ตู้เขี่ยเชื้อ ISSCO รุ่น BV-124, บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand

21 ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็งต่ำ -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sanyo Electric, Japan

22 ตู้บ่มเชื้อ รุ่น INE 500 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany

23 ตู้อบความร้อน รุ่น UE 600 และรุ่น UL 80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany

24 แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20 x 20 ซม. หนา 0.2 มม. บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

25 ภาชนะปิด (chromatographic tank) สำหรับใส่แผ่น TLC

26 โถดูดความชื้น (desiccator)

27 ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France

28 หัวกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดความกว้างของรูกรอง 0.20 ไมครอน รุ่น SF-W13 บริษัท Gat Asia, Ltd., Hong Kong

29 ฮีมาไซโทมิเตอร์ บริษัท Schott Duran, Germany

30 ชุดเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) สำหรับวิเคราะห์น้ำตาล กรดออร์แกนิค และแอลกอฮอล์ บริษัท Bio-Rad.

31 คอลัมน์ชนิด HPX-42C ขนาด 300 x 7.8 มิลลิเมตร บริษัท Bio-Rad.

32 เครื่องตรวจสอบ รุ่น 410 บริษัท Water, Australia.

33 เครื่องบันทึก รุ่น 746 ของบริษัท Water, Australia.

34 กระบอกฉีดยา ขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น EXMSR 100 บริษัท ITO Corporation, Japan.

3.2 เคมีภัณฑ์

1 กลูโคส (Glucose) บริษัท Merck, Germany

2 ซูโครส (Sucrose) บริษัท Sigma Chemical Co., USA และ บริษัท Merck, Germany

3 ไซโลส (Xylose) บริษัท Difco, USA และ บริษัท Fluka, Switzerland

4 ฟรุกโทส (Fructose) บริษัท Fluka, Switzerland

5 ฟูโคส (Fucose) บริษัท Sigma Chemical Co., USA

6 มอลโทส (Maltose) บริษัท Difco, USA

7 แมนโนส (Mannose) บริษัท Sigma Chemical Co., USA และ บริษัท Fluka, Switzerland

8 แมนนิทอล (Mannitol) บริษัท Fluka, Switzerland

9 ดิวซิทอล (Dulcitol) บริษัท Difco, USA

10 ซอร์บิทอล (Sorbitol) บริษัท Fluka, Switzerland

11 อินโอซิทอล (Inositol) บริษัท Fluka, Switzerland

12 แรมโนส (Rhamnose) บริษัท Difco, USA

13 ไรโบส (Ribose) บริษัท Sigma Chemical Co., USA และ บริษัท Fluka, Switzerland

14 แลคโทส (Lactose) บริษัท Merck, Germany

15 ทรีฮาโลส (Trehalose) บริษัท Difco, USA

16 ราฟฟิโนส (Raffinose) บริษัท Difco, USA

17 อะราบิโนส (Arabinose) บริษัท Fluka, Switzerland

18 กาแลคโทส (Galactose) บริษัท Difco, USA

19 กาแลคทิวโรนิคแอซิด (Galacturonic acid) บริษัท Sigma Chemical Co., USA

20 กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Merck, Germany

21 อินนูลิน (Inulin) บริษัท Sigma Chemical Co., USA

22 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck, Germany

23 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany

24 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany

25 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland

26 ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA

27 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany

28 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck, Germany

29 ผงสังกะสี (Zn) บริษัท Difco Laboratories, USA

30 เอทานอล บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland

31 กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) บริษัท Merck, Germany

32 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany

33 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany

34 บิวทานอล (Butanol) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland

35 ไพริดีน (Pyridine) บริษัท Merck, Germany

36 ไดฟีนิลเอมีน (Diphenylamine) บริษัท Sigma Chemical Co.,USA

37 อะซีโตน (Acetone) บริษัท Merck, Germany

38 อะนีลีน (Aniline) บริษัท Merck, Germany

39 กรดฟอสฟอริก (Orthophosphoric acid) บริษัท Sigma Chemical Co.,USA

40 น้ำ HPLC grade บริษัท Lab-Scan, Thailand

41 สารละลายโฟลิน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin phenol reagent) บริษัท Merck, Germany

42 โบวีนซีรัมอัลบูมิน บริษัท Sigma Chemical Co.,USA

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.1.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างอ้อย ซึ่งเป็นพืชที่ให้ความหวานที่เก็บมาจากสวนผลไม้ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และอุทยานแห่งชาติกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยนำตัวอย่างอ้อยมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย จากนั้นนำลูปเขี่ยบริเวณตัวอ้อยมาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตามวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยสังเกตจากลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าของอาหารแข็งที่มีเมือกเยิ้ม และมีความหนืด นำแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเป็นเมือกเยิ้มเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิดเดียวกับข้างต้น เพื่อแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์

3.3.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และการหาองค์ประกอบเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) โดยเตรียมหัวเชื้อได้เท่ากับ 0.8-1.0 ถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรข้างต้น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ส่วนน้ำใสนำมาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำในอัตราส่วนเอทานอลต่อส่วนน้ำใสเท่ากับ 2:1 (18-24 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที (Kumar และคณะ, 2004) และนำตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นนำผลผลิตที่ได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) (Chaplin และ Kennedy, 1986)เพื่อทดสอบดูชนิดของน้ำตาลในผลผลิต ตามวิธีในข้อ 3.3.4.2

3.3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

ถ่ายแบคทีเรียที่คัดแยกได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนแบคทีเรียเจริญเต็มที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองต่อไป และถ่ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงใหม่ทุกๆ 30 วัน

3.3.3 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย

ถ่ายแบคทีเรียที่คัดแยกได้สายพันธุ์บริสุทธิ์จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงจากข้อ 3.2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการกระตุ้นการเจริญของเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเดียวกับข้างต้น (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในเคลตขวดแก้วทรงกรวย (klett flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.8-1.0 ซึ่งนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการวิจัยต่อไป

3.3.4 การคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อข้างต้นปริมาณ 5 %โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร(ทำ 2 ซ้ำ) โดยมีชุดควบคุมซึ่งไม่ใส่เชื้อ ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ติดตามประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เปรียบเทียบกันแต่ละเชื้อ คัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยที่ให้น้ำหนักมากที่สุด

3.3.4.1 การติดตามประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับเขย่าขวด

3.3.4.1.1. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเติมน้ำกลั่นลงไปจนความข้นหนืดลดลง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของเซลล์ออกโดยควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และรายงานในหน่วยของมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำใสนำไปสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

3.3.4.1.2. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรีย

นำส่วนน้ำใสที่แยกได้จากข้อ 3.3.4.1.1 มาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% โดยปริมาตร ปริมาณ 2 เท่าของปริมาตรของส่วนน้ำใส ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน (18-24 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที (Kumar และคณะ, 2004) แล้วนำส่วนของตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เพื่อช่วยในการละลายและทำลายเซลล์แบคทีเรียที่ปะปนมากับพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นเวลา 3 นาที (นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ, 2545) ตกตะกอนซ้ำด้วยวิธีเดิม และนำตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ และรายงานในหน่วยของ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เพื่อใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในการทดลองต่อไป

3.3.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.4.2.1. การย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากข้อ 3.3.4.1.2ไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรด โดยชั่งตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ของแต่ละไอโซเลตปริมาณ 50 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรในหลอดทดลองแต่ละหลอด จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อสลายพอลิแซ็กคาไรด์เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ (Chaplin และ Kennedy, 1986)

3.3.4.2.2. การวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

ดัดแปลงจากวิธีของ Takeda และคณะ (1994) โดยนำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์มาจุดบนแผ่น TLC (แผ่นซิลิกาเจล 60, บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany ขนาด 20 x 20 ซม. หนา 0.2 มม.) จุดละ 1 ไมโครลิตร ซึ่งใช้เป็นเฟสคงที่ จากนั้นนำไปใส่ในภาชนะปิด (chromatographic tank) ที่บรรจุสารละลาย S2 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นสารละลายตัวพา ทิ้งไว้จนเคลื่อนที่ไปเกือบสุดแผ่น แล้วนำแผ่น TLC มาผึ่งให้แห้ง และตรวจหาตำแหน่งของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยการสเปรย์ด้วย detection reagent D1 (ภาคผนวก ข) แล้วนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สังเกตแถบที่เกิดขึ้นแล้ววัดระยะทางของแต่ละจุด เพื่อหาค่า R_f (retardation factor) (ภาคผนวก ค) และเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

3.3.5 การศึกษาทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง

3.3.5.1 การจำแนกสกุลของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธาน

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่ได้ทำการคัดเลือกจากข้อ 3.4 มาศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยา การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี อ้างอิงตาม Clinical and pathogenic microbiology (Howard, 1994) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology และ Biochemical tests for identification of medical bacteria (MacFaddin, 1980)

3.3.5.1.1. **การศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา**

ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง ที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) โดยสังเกตลักษณะและสีของโคโลนี เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รวมทั้งศึกษาลักษณะการติดสีแกรม รูปร่าง วัดขนาดของเซลล์ด้วยไมโครมิเตอร์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ศึกษาการเจริญบนอาหารแข็ง MacConkey (ภาคผนวก ก) และ Eosin methylene blue (EMB) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และศึกษาการเจริญในอุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ ที่ 20 25 30 37 40 และ 45 องศาเซลเซียส

3.3.5.1.2. **การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี**

โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็งที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเพาะเชื้อลงในอาหารต่างๆ เพื่อทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ดังนี้

1 ความต้องการออกซิเจนของแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient broth (NB) สองหลอด หลอดแรกใช้พาราฟินปิดทับในอาหารเหลว หลอดที่สองไม่ปิดทับด้วยพาราฟิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อ

2 ความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test)

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 12-18 ชั่วโมง ลงใน Motility test medium (ภาคผนวก ก) โดยปักเชื้อตรง ๆ เพียงครั้งเดียว ประมาณ 2/3 ของส่วนลูปของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผล ถ้ายังให้ผลลบ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 1-2 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ

ผลบวก : เห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอบรอยปักเชื้อ หรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณปักเชื้อ แต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหลอดขุ่นกว่าเดิม ผลลบ : เห็นการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจนที่บริเวณรอยปักเชื้อ โดยเห็นขอบเขตของเชื้อที่เจริญอย่างชัดเจน แม้จะบ่มเชื้อต่ออีก 2 สัปดาห์ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

3 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)

การผลิตเอนไซม์ Cytochome oxidase ของแบคทีเรีย ตรวจสอบการมีเอนไซม์ Cytochome oxidase โดยใช้รีเอเจนต์ที่ปกติไม่มีสี ซึ่งมีสีเมื่อถูกออกซิไดส์ รีเอเจนต์ที่ใช้มีสองชนิด คือ tetramethel-*p*-phenylenediamine dihydrochloride และ dimethyl -*p*-phenylenediamine dihydrochloride รีเอเจนต์ทั้งสองชนิดปกติไม่มีสี แต่จะมีสีม่วงหรือสีน้ำเงินเมื่อถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ oxidase จะสามารถออกซิไดซ์รีเอเจนต์เหล่านี้ ทำให้เห็นเป็นมีน้ำเงินเข้ม โดยเตรียมสารละลายรีเอเจนต์ 1 % tetramethel-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (ภาคผนวก ข) ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ แล้วหยดสารละลายบนแผ่นกระดาษกรองปราศจากเชื้อ ขีดเชื้อที่เลี้ยงบน Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก) อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนแผ่นกระดาษกรอง

ผลบวก : เกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มบนกระดาษกรองภายใน 10 วินาที ผลลบ : ไม่เกิดการเปลี่ยนสีเกิดขึ้นให้เห็น

4 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลส (Catalase test)

เป็นการจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลส ขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลส เพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์แตกออก ให้เกิดก๊าซออกซิเจน และน้ำ ดังสมการข้างล่าง

$$2(H_2O_2) \xrightarrow{\text{แคทาเลส}} 2(H_2O) + O_2$$

แบคทีเรียผลิตเอนไซม์แคทาเลส หรือไม่ทำได้โดยการใส่ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อตรงกลางโคโลนีที่เลี้ยงบน Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก) อายุ 24 ชั่วโมง แตะบนสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด 3%H_2O_2 (ภาคผนวก ข) ลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์ดูฟองก๊าซที่เกิดขึ้นในทันที

ผลบวก : มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที ผลลบ : ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

5 การทดสอบ IMVIC Test มีด้วยกัน 4 การทดสอบ คือ

5.1 ความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต indole (Indole test)

เป็นการทดสอบหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยทริปโตเฟน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Indole broth เมื่อทริปโตเฟนในเพปโตนถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรียแล้วให้ indole (โดยเอนไซม์ tryptophanase) โดยเลี้ยงเชื้ออายุ 12-18 ชั่วโมงที่ต้องการทดสอบลงใน Tryptophan broth (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยหยดสาร Kovac's reagent (ภาคผนวก ข) ลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หยด จากนั้นเขย่าเบาๆ สังเกตสีที่เกิดขึ้น

ผลบวก : สีของรีเอเจนต์เปลี่ยนไปเป็นสีแดง ผลลบ : สีของรีเอเจนต์ไม่เปลี่ยนแปลง

Methyl Red–Vogesprokauer tests (MR-VP test) เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตกรดปริมาณมากๆ จากน้ำตาลกลูโคสและให้ผลผลิตที่เรียกว่าอะเซโตอีน (acetoin) หลักการทดสอบนี้ใช้ในการจำแนกชนิดแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae อะเซโตอีนมีชื่อทางเคมีว่า acetymethyl carbinol

5.2 ความสามารถในการผลิตกรดปริมาณมากๆ (MR test)

Methyl red (MR) ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มที่ให้กรดมากจากการย่อยน้ำตาลกลูโคสใน MR-VP medium (ภาคผนวก ก) ทำโดยการหยด methyl red reagent (ภาคผนวก ข) 5 หยด ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นปริมาณกรดที่แบคทีเรียผลิตจำนวนมาก สามารถเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีแดง (อินดิเคเตอร์จะเป็นสีแดง ถ้า pH <4.4 และจะมีสีเหลือง ที่ pH > 6.0)

ผลบวก : MR-test เปลี่ยนเป็นสีแดง ผลลบ : MR test เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

5.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของสารอะเซโตอีน (อะเซทิลmethyl carbinol หรือ acetoin) (VP test)

Voges-Proskauer (VP) เป็นการทดสอบหาว่าเชื้อย่อยน้ำตาลกลูโคสใน MR-VP medium แล้วให้ acetoin product ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิต butylene glycol การทดสอบใส่รีเอเจนต์ 2 ชนิด คือ α-naphtol และ 40% potassium hydroxide (KOH) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบ เขย่าให้เข้ากัน และเพื่อให้ออกซิเจนจากอากาศเข้าไปผสมด้วย ถ้ามีอะเซโตอิน อะเซโตอินจะถูกออกซิไดซ์ในสภาพที่มีออกซิเจน และ KOH ได้ผลผลิตเป็น di อะเซทิล และ diอะเซทิล นี้จะทำปฏิกิริยากับกลุ่ม guanidine ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเพปโตน (peptone) ในสภาพที่เป็นเบส (KOH) โดยมี α-naphtol เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และให้ผลเป็นสารประกอบสีแดง โดยเพาะเชื้อที่มีอายุ 12-18 ชั่วโมง ลงใน MR-VP broth (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารออกมา 1 มิลลิลิตร จากนั้นหยด 5% α-naphtol (ภาคผนวก ข) ลงไป 0.6 มิลลิลิตร ตามด้วย 0.2 มิลลิลิตรของ 40% KOH (ภาคผนวก ข) จากนั้นเขย่าแรงๆ เพื่อให้ออกซิเจนเข้าไปผสมในอาหาร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที สังเกตการเกิดสีแดง ถ้ายังไม่มีสีแดงเกิดขึ้นทิ้งไว้ต่อไปอีก 45 นาที

ผลบวก : VP test เกิดสีแดงให้เห็น ภายใน 15-45 นาที ผลลบ : VP test ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

5.4 ความสามารถในการใช้ซิเตรต (Citrate utilization test)

ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียแกรมลบ โดยอาศัยการใช้ซิเตรต (citrate) เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยซิเตรต จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินของ indicator bromthymol blue ในอาหาร เพราะเมื่อซิเตรตถูกใช้ไปจะทำให้ความเป็นกรดด่างของอาหารเป็นด่างมากกว่าเดิม ทำการเพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 12-18 ชั่วโมง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmon citrate agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญ เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญไม่เปลี่ยนสี สีคงเดิม

6 การทดสอบ TSI reaction

Triple Sugar Iron (TSI) agar ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน โดยใช้ความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโทส และซูโครส ทำให้ได้กรดและอาจให้ก๊าซ เป็นผลผลิตสุดท้าย นอกจากนั้นยังเป็นการทดสอบถึงความสามารถของแบคทีเรียในการให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ด้วย

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 12-18 ชั่วโมง โดยการขีดเชื้อบนหน้าวุ้นของ TSI agar (ภาคผนวก ก) ให้ทั่วโดยปัก ปลายลูปที่ขีดเชื้อในตอนแรกลงลึกประมาณ 2 ใน 3 ของในอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึงก้นหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล

1 ผลการหมักย่อยน้ำตาลต่างๆ

1.1 ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียวบนผิววุ้น (stant) ที่มีสีแดงส้มซึ่งเป็นสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปเป็นสีแดงเข้ม (alkaline หรือ K) ส่วนที่ก้นหลอดเปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลือง (acid หรือ A) หรืออ่านผลว่า K/A

1.2 ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยทั้งน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแลคโทส หรือสามารถย่อยน้ำตาลกลูโคสร่วมกับน้ำตาลซูโครส หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลทั้งสามชนิด ทั้งบนผิว (slant) และที่ก้น (butt) ของหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลืองทั้งหลอด หรืออ่านผล A/A

1.3 หากแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดใดๆเลย มีอยู่ 3 แบบ คือ N/N K/N K/K) (N : ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ K : เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม)

2 การเกิดก๊าซ จะเห็นเป็นรอยแตก หรือสังเกตเห็นฟองอากาศ

3 การเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) จะเห็นสีดำตะกอนเฟอร์รัสซัลไฟด์อยู่ที่ก้นหลอด ถ้าเห็นสีดำบนผิวของวุ้น (slant) เป็นสีแดงของโคโลนีมากกว่า

7 ความสามารถในการย่อยสลาย esculin (Bile esculin test)

เพื่อคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในน้ำดี 40% และสามารถย่อยสลาย esculin ให้ esculetin และน้ำตาลเด็กโตรส (dextrose) โดยการขีดเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 12-18 ชั่วโมง ลงบน Blue esculin agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลบวก : เกิดตะกอนสีดำบริเวณ slant หรือทั่วทั้งหลอด ผลลบ : ไม่เกิดสีดำขึ้น

8 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส (urease) (Urease test)

หาเอนไซม์ urease โดยดูผลจากการย่อยยูเรีย (urea) ให้ได้แอมโมเนีย ซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้น และเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ คือ phenol red จากสีเหลืองเป็นสีแดง เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน Urea agar slant (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง

ผลบวก : เปลี่ยนเป็นสีชมพู ผลลบ : ไม่มีการเปลี่ยนสี

9 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) (Gelatin test)

ตรวจสอบสมบัติความแข็งของเจลาติน เจลาตินจะอยู่ในสภาพเป็นของเหลวที่อุณหภูมิสูงกว่า 300 องศาเซลเซียส แต่จะมีสภาพเป็นของแข็งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังนั้น เมื่อเจลาตินถูกย่อยด้วยเอนไซม์ genlatinase แล้ว เจลาตินจะไม่มีสภาพเป็นเจล หรือแข็งตัวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 12-18 ชั่วโมง ลงใน Nutrient gelatin tall (ภาคผนวก ก) ด้วยวิธีปักลงทางตรง บ่มเชื้อไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 48 ชั่วโมง ก่อนอ่านผลนำ Nutrient gelatin tall แช่ตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที

ผลบวก : Nutrient gelatin broth ยังเป็นของเหลวเหมือนเดิมไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็น gel (solid state) ไม่ได้เกิดการแข็งตัวเหมือนหลอดที่ไม่มีเชื้อ ผลลบ : Nutrient gelatin broth แข็งตัวเช่นเดียวกับหลอดที่ไม่มีเชื้อ

10 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (amylase) (Starch hydrolysis test)

ความสามารถของแบคทีเรียในการใช้แป้ง (starch) สามารถตรวจสอบโดยใช้สารละลายไอโอดีน โดยเมื่อใส่สารละลายไอโอดีนลงบนแป้งจะเกิดตะกอนสีน้ำเงิน และควรอ่านปฏิกิริยาหลังจากใส่สารละลายไอโอดีนทันที เพราะสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจะจางลงอย่างรวดเร็ว ถ้าแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ amylase เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar เอนไซม์จะย่อยแป้งจนกระทั่งได้น้ำตาลกลูโคสรอบๆโคโลนีของแบคทีเรีย และเมื่อหยดสารละลายไอโอดีนลงไปทดสอบ แป้งที่ถูกย่อยไปแล้วจะไม่มีสี เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 12-18 ชั่วโมง ลงบน starch agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการย่อยของแป้งโดยการหยดสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข) ลงบนโคโลนีที่ตรวจสอบ

ผลบวก : รอบๆ โคโลนีแบคทีเรียไม่มีสี แต่บริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญมีสีน้ำเงิน
ผลลบ : รอบๆ โคโลนีมีสีน้ำเงินเหมือนกับบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญ

11 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ nitrate reductase (Nitrate and Nitrite test)

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการที่จะรีดิวส์ไนเตรตให้เป็นไนไตรท์หรือก๊าซไนโตรเจน การรีดิวส์ของไนเตรตแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก เป็นการตรวจสอบการรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตรท์ หลังจากเพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Nitrate broth แล้วทดสอบการมีไนไตรท์โดยการเติม sulfanilic acid และ α-naphthylamine ลงไป รีเอเจนต์ทั้งสองจะทำปฏิกิริยากับไนไตรท์เกิดสารประกอบสีแดงเรียก red azo dye ถ้าในขั้นตอนแรกนี้ให้ผลแสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวส์ให้ไนไตรท์ แต่ถ้าการทดสอบขั้นแรกไม่เกิดสีแดงดังกล่าว อธิบายได้ 2 ทาง ไนเตรตไม่ได้ถูกรีดิวส์ หรือไนเตรตถูกรีดิวส์ให้เป็นไนไตรท์แล้ว ไนไตรท์ถูกรีดิวส์ต่อไปเป็นแอมโมเนียหรือก๊าซไนโตรเจน จึงทำให้ตรวจหาไนไตรท์ไม่พบ ดังนั้นต้องตรวจสอบต่อว่าเป็นกรณีไหน โดยเติมผงสังกะสี (zinc dust) ลงไปใน broth ซึ่งเป็นการทดสอบขั้นตอนที่สอง ผงสังกะสีสามารถรีดิวส์ไนเตรตไปเป็นไนไตรท์ ดังนั้นถ้าไนเตรตไม่ถูกรีดิวส์จากการทดสอบในขั้นตอนที่ 1 และเกิดสีแดงในการทดสอบขั้นตอนที่สองแสดงว่าเป็นผลลบ คือ แบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรตและยังคงมีไนเตรตอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เกิดสีแดงจากการทดสอบขั้นตอนแรกและไม่เกิดสีแดงเมื่อทดสอบครั้งที่สองแสดงว่า แบคทีเรียชนิดนี้สามารถรีดิวส์ไนไตรท์ต่อเป็นแอมโมเนียหรือก๊าซไนโตรเจนแสดงว่า ให้ผลบวก เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ

12-18 ชั่วโมง ลงบน Nitrate broth (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาเติม 0.5% alpha-naphthylamine (ภาคผนวก ข) และ 0.8% sulfanilic acid solution (ภาคผนวก ข) อย่างละ 5 หยด อ่านผลการเปลี่ยนสีของอาหาร

ผลบวก : มีสีแดงเกิดขึ้น หรือไม่มีสีแดงเกิดขึ้นในการทดสอบในตอนแรก และเมื่อเติมสังกะสีลงไปก็ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง ผลลบ : ไม่มีสีแดงเกิดขึ้นในขั้นตอนแรก และจะมีสีแดงเกิดขึ้น เมื่อเติมผงสังกะสีลงไป

12 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Lysine Ornithine และ Arginine (Decarboxylase test)

ขีดเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 12-18 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ decarboxylase medium (ภาคผนวก ก) ทั้งในหลอดที่มีกรดอะมิโนและไม่มีกรดอะมิโน หยดพาราฟินหรือ mineral 0il ลงไปให้สูงจากอาหารเชื้อ 1 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

ผลบวก : หลอดควบคุมเป็นสีเหลือง หลอดที่มีกรดอะมิโนเป็นสีม่วง ผลลบ : หลอดควบคุมเป็นสีเหลือง หลอดที่มีกรดอะมิโนเป็นสีเหลือง

13 ความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีโพแทสเซียมไซยาไนด์ (Potassium cyanide test)

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่จะมีชีวิต และเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโพแทสเซียมไซยาไนด์ (KCN) ผสมอยู่ เพื่อจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ออกจากแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลในสภาพที่ไม่มีอากาศ (Nonfermentative bacteria) โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อ Potassium cyanide broth ที่โพแทสเซียมไซยาไนด์ (KCN) เป็นส่วนผสมอยู่ในบัฟเฟอร์ โพแทสเซียมไซยาไนด์เป็นตัวการจับธาตุเหล็ก ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส (cytochrome oxydase) ทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้แบคทีเรียที่หายใจโดยอาศัยออกซิเจนเจริญทวีจำนวนไม่ได้ มีaerobic bacteria บางชนิดที่ทนต่อโพแทสเซียมไซยาไนด์ โดยไม่ต้องผ่านการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว เพราะแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์มีความสามารถในการทนต่อไซยาไนด์ต่างกัน ดังนั้น Potassium cyanide broth (ภาคผนวก ก) จึงใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้ โดยการเพาะเชื้อ 1 ลูป (loop) ลงใน

อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งชนิดที่มีโพแทสเซียมไซยาไนด์ และที่ไม่มีโพแทสเซียมไซยาไนด์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญทั้งสองหลอด

มีความไวต่อ KCN : แบคทีเรียในหลอดที่ไม่มี KCN เจริญ แต่หลอดที่มีไม่เจริญ ไม่มีความไวต่อ KCN : แบคทีเรียในหลอดทั้งสองเจริญเท่าๆกัน

14 ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (Oxidation-fermentation (OF) test)

โดยการเพาะเชื้ออายุ 12-18 ชั่วโมง ลงในอาหารออกซิเดชัน-เฟอร์เมนเตชัน (ภาคผนวก ก) แต่ละหลอด (2 หลอด) หลอดหนึ่งคลุมอาหารที่เพาะเชื้อแล้วนั้นด้วยพาราฟิน แต่อีกหลอดไม่คลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญทั้งสองหลอด สำหรับแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลในภาวะที่มีออกซิเจน หรือเกิดออกซิเดชันซึ่งต้องการออกซิเจนร่วมปฏิกิริยาด้วย แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถให้กรดในหลอดที่เปิดอยู่ แต่จะไม่สามารถให้กรดในหลอดที่มีพาราฟินคลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลได้ จะให้กรดทั้งสองหลอด แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถใช้น้ำตาลทั้งในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจนเลย จะไม่ให้กรดในหลอดทั้งสอง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเดิม ไม่เปลี่ยนแปลง

15 ศึกษา metabolic reaction ของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเมื่อเจริญใน litmus milk medium

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยานมที่มีลิสมัส (litmus) ผสมอยู่ ลิสมัสทำหน้าที่ทั้งเป็น pH อินดิเคเตอร์ และออกซิเดชั่น-รีดักชั่น อินดิเคเตอร์ เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 12-18 ชั่วโมง ลงใน litmus milk (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

การอ่านผล ปฏิกิริยาจาก litmus milk สามารถอ่านได้หลายแบบ ได้แก่

1 No change : ไม่เกิดปฏิกิริยาใดๆ เกิดขึ้น สีเหมือนเดิม

2 Acid, no clot : อาหารเปลี่ยนจากสีน้ำเงิน-ม่วง เป็นสีแดง

3 No acid, clot : อาหารแข็งตัวแต่สีไม่เปลี่ยนเป็นแดง มักไม่ค่อยพบเพราะเป็นปฏิกิริยาช่วงกลางก่อนเกิดปฏิกิริยาต่อไป

4 Acid,clot : อาหารเปลี่ยนเป็นสีแดง และมีการแข็งตัว

5 "stomy clot" (acid, clot, gas) : อาหารแข็งตัว เปลี่ยนเป็นสีแดง-ชมพู เป็นก้อน ไม่เรียบเต่ขรุขระมากเนื่องจากมีก๊าซเกิดขึ้น

6 peptonization หรือ Digestion : นมถูกย่อยสลายเหลือแต่น้ำใสๆ สีม่วงอยู่ข้างบน และเศษของนมที่ยังถูกย่อยไม่หมดตกตะกอนอยู่ก้นหลอด

16 ความสามารถในการสร้าง β-D-galactosidase (Beta-D-galactosidase test)

ตรวจความสามารถในการสร้างβ-galactosidase สามารถตรวจสอบโดยการใช้ซับสเตรต ortho-nitrophenyl β-D-galactoside (ONPG-P) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาลแลคโทส ONPG-P สามารถแทรกเข้าเซลล์แบคทีเรียอย่างรวดเร็ว โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ permease ถ้ามีการย่อยสลายซับสเตรตโดยเอนไซม์ β-D-galactosidase เกิดขึ้น ทำให้ได้น้ำตาลแลคโทส และ ortho-nitrophenol ซึ่งมีสีเหลืองเมื่ออยู่ในภาวะเป็นเบส ดังนั้น เมื่อเกิดสีเหลืองในการทดสอบดังกล่าว แสดงว่า แบคทีเรียชนิดนั้นสร้าง หรือมีเอนไซม์ β-D-galactosidase นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบซึ่งเจริญบน TSI agar (ภาคผนวก ก) เขี่ยลงในสารละลายน้ำเกลือ0.85% (ภาคผนวก ก) ปริมาณมากๆแล้วใส่โทลูอีน (toluene) 1 หยด ลงในสารละลายดังกล่าวผสมให้เข้าด้วยกัน เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียปล่อยเอนไซม์ β-D-galactosidase เพิ่มขึ้น หยดสารละลาย ONPG (ภาคผนวก ข) 0.2 มิลลิลิตร และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สังเกตผลหลังจากนำไปอุ่นในอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนกระทั่งละลาย แล้วจึงใส่ Sodium phosphate buffer pH เท่ากับ 7.0 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

ผลบวก : ONPG เปลี่ยนเป็นสีเหลืองภายใน 20 นาที ถึง 24 ชั่วโมง ผลลบ : ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ ONPG เมื่อบ่มไว้จนครบ 24 ชั่วโมง

ตรวจผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

17 ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส กาแลคโทส ฟรุคโทส ไรโบส อะราบิโนส แมนโนส ไซโลส แรมโนส แมนนิทอล กลีเซอรอล ดิวซิทอล ซอร์บิทอล ไอโนซิทอล มอลโทส ซูโครส แลคโทส เมลลิไบโอส ทรีฮาโลส แรฟฟิโนส และอินนูลิน

เพาะเชื้อที่มีอายุ 12-18 ชั่วโมง ลงใน Carbohydrate fermentation broth (ภาคผนวก ก) แต่ละชนิด เหลือ 1 หลอด ไม่ใส่เชื้อ เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

ผลบวก : มีกรดเกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือมีทั้งกรดและก๊าซเกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเดิม ไม่เปลี่ยนแปลง

3.3.5.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16SrDNA

3.3.5.2.1. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ตามวิธีของ Ausube และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก) 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กระจายตะกอนเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) 517 ไมโครลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกับบัฟเฟอร์ เติมสารละลายไลโซไซม์ เข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) เข้มข้น 10% (ภาคผนวก ข) 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 120 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) 220 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับ

ปริมาตรของสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายชั้นบนมาเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเดิม นำสารละลายชั้นบนมาเติมไอโซโพรพานอล 0.6 เท่าของปริมาตรสุดท้าย กลับหลอดให้เข้ากันจนปรากฏสายดีเอ็นเอนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% (ภาคผนวก ข) 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง เทส่วนใสทิ้ง ระเหยเอทานอลจนแห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 100 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.5.2.2. **การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ**

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.3.5.2.1 ปริมาณ 1 ไมโครลิตร มาแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8% ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) เทลงในแม่พิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ เมื่ออะกาโรสแข็งตัว วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ให้ท่วมอะกาโรสเจล ผสมดีเอ็นเอกับสีติดตาม หยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งที่ 1 จะหยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda *Hin*dIII ที่ผสมกับสีติดตามแล้วปริมาตร 4 ไมโครลิตร จากนั้นทำอิเล็กโตรโฟเรซิส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนที่ได้ในระยะทางที่เหมาะสม จากนั้นย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5-10 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ที่เกินออกในน้ำกลั่นปลอดประจุ เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอทำได้โดย นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} X 50 X dilution factor

3.3.5.2.3. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนบริเวณ 16SrDNA ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain reaction, PCR) โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ซึ่งเป็น universal primers จำเพาะต่อบริเวณ 16SrDNA ของแบคทีเรีย

ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1× *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ความเข้มข้น 100 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธี 3.3.5.2.1 ปริมาณ 1 พิโคกรัม ถึง 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) (Perkin Elmer, USA) โดยให้มีภาวะการทำปฏิกิริยาดังนี้

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16SrDNA ตั้งโปรแกรมดังนี้

1	Initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เวลา 5 นาที
2	Denaturation step	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เวลา 1 นาที
3	Annealing step	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เวลา 1 นาที
4	Extension step	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เวลา 2 นาที
5	ทำขั้นตอนที่ 3-5	จำนวน 30 รอบ	
6	Final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เวลา 10 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.2% เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.5.2.2

3.3.5.2.4. **การหาลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16SrDNA**

ปฏิบัติโดยนำสารละลายดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย ผ่านทางห้างหุ้นส่วนจำกัด วอร์ด เมดิก โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับส่วนต้นของยีน 16SrDNA คือ 27F 518R 800R 1100R และ 1492R (ภาคผนวก ง) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

3.3.5.2.5. **สร้าง** phylogenetic tree

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16SrDNA ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16SrDNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal W จากนั้นนำข้อมูลที่ผ่านการปรับแนว มาคำนวณ distance matrix สร้าง phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining และ Bootstrap ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package version 3.572c ซึ่งประกอบไปด้วย DNADIST.EXE NEIGHBOR.EXE SEQBOOT.EXE และ CONSENSE.EXE ตามลำดับ phylogenetic tree ที่ถูกสร้างขึ้น นำเสนอโดยใช้โปรแกรม TREEVIEW (Felsenstein, 1985)

3.3.6 การศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อปริมาณ 5% โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามข้อ 3.3.3 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทุกๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาวัดการเจริญของเซลล์ด้วยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ จากนั้นสร้างกราฟแสดงรูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยจะคัดเลือกกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการ

เจริญเติบโตแบบทวีคูณ (mid-log phase) และเวลาในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง เพื่อนำไปใช้ในการวิจัยต่อไป

3.3.7 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.7.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ปริมาณ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) โดยแปรแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส (Prasertsan และคณะ, 2008) และแลคโทส (Bajaj และคณะ, 2006) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเท่ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด มาวัดการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.7.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ปริมาณ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ที่คัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้จากข้อ 3.3.7.1 โดยแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนเป็น 0, 1, 2, 3, 4, และ 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Prasertsan และคณะ, 2008) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนในปริมาณต่างๆ มาวัดการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ และชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.7.3 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

1 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ปริมาณ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ที่คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้จากข้อ 3.3.7.1 และ 3.3.7.2 ตามลำดับ ในการทดลองนี้ใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ โดยแปรผันปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ เป็น 0, 0.057, 0.067, 0.08, 0.1, 0.13 และ 0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Prasertsan และคณะ, 2008) ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อ $(NH_4)_2SO_4$ ระหว่าง 20-70 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ มาวัดการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

2 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ยีสต์สกัดที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ปริมาณ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ที่คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้จากข้อ 3.3.7.1 และ 3.3.7.2 ตามลำดับ ในการทดลองนี้ใช้ยีสต์สกัดเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ โดยแปรผันปริมาณของยีสต์สกัดเป็น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, และ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Prasertsan และคณะ, 2008) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ มาวัดการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.8 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.8.1 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ปริมาณ5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ที่คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมได้จากข้อ 3.3.7 โดยปรับอุณหภูมิบ่มเชื้อเป็น 20, 25, 30, 37, 40, และ 45 องศาเซลเซียส (Tallon และคณะ, 2003) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรและหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.8.2 ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ปริมาณ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) โดยบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.8.1 แปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างเป็น 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 (Prasertsan และคณะ, 2008) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.8.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ปริมาณ5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) บ่มอุณหภูมิที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.8.1 และมีค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.8.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเร็วรอบบนเครื่องเขย่าเป็น 0, 100 และ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.8.4 การเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ปริมาณ5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ดัดแปลงจากอาหารสูตร Bromfield รวมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) เลี้ยงในอาหารปรับปรุงและเหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.7 รวมถึงภาวะที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.8.2 และ 3.3.8.3ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงเริ่มต้นของการเจริญแบบทวีคูณ (early log phase) ช่วงกลางของการเจริญแบบทวีคูณ (mid log phase) และช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (late log phase) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นเกณฑ์ในการเปลี่ยนจากอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-18 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.9 การผลิตและการสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารที่ปรับปรุงสูตร และมีภาวะที่ปรับให้เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ตามที่ได้ผลในข้อ 3.3.7 และ 3.3.8 นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% โดยปริมาตร ปริมาณ 2 เท่าของปริมาตรของส่วนน้ำใส ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน (18-24 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Kumar และคณะ, 2004) จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำส่วนของตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เพื่อช่วยในการละลายและทำลายเซลล์แบคทีเรียที่ปะปนมากับพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นเวลา 3 นาที (นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ, 2545) ตกตะกอนซ้ำด้วยวิธีเดิม และนำตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) แล้วจึงชั่งหาน้ำหนักแห้ง และรายงานในหน่วยของ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

3.3.10 การเตรียมพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

(ดัดแปลงจากวิธีของ Shih และคณะ, 2001; Celik และคณะ, 2008; Zheng และคณะ, 2008) นำตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่น จากนั้นตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นปริมาตรเป็น 4 เท่า นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 3 รอบ หลังจากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3.3.11 การศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.11.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid

(Dubois และคณะ, 1956) นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ 10 มิลลิกรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วงที่เหมาะสม ขณะเดียวกันทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล (Phenol reagent) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วเขย่าแรงๆผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อีก 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานที่ใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.11.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธี Protein Dye Binding

(Bradford, 1976) นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Coomassie blue (ภาคผนวก ข) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่ใช้โบวีนซีรัมแอลบูมิน (BSA) ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.11.3 การวิเคราะห์หาชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

(Ueda และคณะ, 1981) นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล (ภาคผนวก ข) เติมสารละลาย Cetylpyridinium Chloride (CPC) ที่มีความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ข) (2 มิลลิกรัม ของพอลิแซ็กคาไรด์ ต่อ 2-3 มิลลิลิตร ของ CPC) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สังเกตตะกอนในสารละลาย ถ้าพบตะกอนแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ถ้าไม่พบตะกอนให้นำมาทดสอบว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) โดยการตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอีกครั้ง

3.3.12 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบจากการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ดัดแปลงจากวิธีของ (Leon-Barrios และคณะ, 1992)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากข้อ 3.3.10 ปริมาณ 2 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองส่วนน้ำใสผ่านแผ่นกรองที่มีขนาด 0.2 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

เครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง เลือกใช้คอลัมน์ Aminex HPX-42C (Zalyalieva และคณะ, 1998; Choa และคณะ, 2006) สำหรับวิเคราะห์น้ำตาล กรดออร์แกนิค และแอลกอฮอล์ ขนาด 300x7.8 มิลลิเมตร ตั้งอุณหภูมิสารละลายตัวพา 60 องศาเซลเซียส ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) โดยใช้น้ำกลั่นปลอดประจุ (DII) เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิดของน้ำตาลปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารมาตรฐาน ได้จากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์

3.3.13 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องเครื่องสเปกโทรมิเตอร์

ทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยการวิเคราะห์หาความยาวคลื่น ดัดแปลงจากวิธีของ (Lendlein และคณะ, 2005; Salgado และคณะ, 2007)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก และผ่านการทำบริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 3.3.12 และเตรียมน้ำตาลมาตรฐานปริมาณ 100 มิลลิกรัม มาละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ โดยใช้โปรแกรม UV WINLAB ทีละตัวอย่าง อ่านค่าจากกราฟ