บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องมือที่ใช้

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) ของ Griffin

เครื่องวัดการดูดแสง (Spectronic 20) ของ Bausch and Lomb

เครื่องวัดความขุ่นของ Klett Summerson

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของ Beckman Model 76

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (Shaking water bath) ของ Forma Scientific

เครื่องดูดสูญญากาศ (Vacuum pump) ของ General Electric U.S.A.

เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge) ของ Drehrichtung Model Ecco-A;pha 1

ตู้อบ (Incubater) ของ Sunvic Type T.S.

1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดเป็นเกรดวิเคราะห์ (Analar grade)

1.3 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

นอกจากกากน้ำตาลแล้วสารต่าง ๆ ที่นำมาใช้ประกอบเป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย เป็นของบริษัท Difco

1.4 กากน้ำตาล

กากน้ำตาลตัวอย่างนำมาจากโรงงานน้ำตาลโดยตรง เป็นกากน้ำตาลเพิ่งสะกัดเอาน้ำตาลออก โรงงานที่เก็บตัวอย่างคือโรงงานน้ำตาลกาญจนบุรี (ให้ชื่อย่อ M1) จากชลบุรี (M2) และจากลำปาง (M3) กากน้ำตาลทั้งสามถูกเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสตลอดระยะเวลาการทดลอง

2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้เอสเคอริเคีย โคไล เค 12 (3110) WT ใช้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพการเป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรียของกากน้ำตาล

เอสเคอเลีย โคไล เค 12 (3110) met, thr, thr MSO^r เป็นออกโซโทรพที่แยกขึ้นในการทดลอง

3. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรลูเรีย (LB-Broth, LB agar)

เป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตรอุดม (rich medium) ประกอบด้วย

ทริปโตน	10 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10 กรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ถ้าเป็นแอลบี-กลูโคส (LB-glucose medium) เติมกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 เปอร์เซนต์ ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดวิด (David minimal medium)

เป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตรปรับต่ำใช้ในการทดลองทั่วไปประกอบด้วย

โปตัสเซี่ยมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.0	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	7.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท	2.0	กรัม
แมกเนเซียมซัลเฟต	0.1	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต	10	มิลลิกรัม
วิตามินบี หนึ่ง	5	มิลลิกรัม

ละลายน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ก่อนใช้เติมกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 เปอร์เซนต์ ถ้าใช้เป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร

อาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่เป็นออกโซโทรพ อาจเป็นแอลบี-บรอท หรือเป็นอาหารสูตรปรับต่ำที่มีสูตรเช่นเดียวกับ 3.2 แต่เสริมด้วยเมไธโอนีน 100 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับเมไธโอนีนออกโซโทรพ (met), และเสริมด้วยธรีโอนีน 100 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับธรีโอนีนออกโซโทรพ (thr)

3.3 อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสำหรับแยกสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีน

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำเช่นเดียวกับ 3.2 เติมด้วย เมไธโอนีน-ดีแอล-ซัลฟอกซิมีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ขอบหนึ่งของจานเพาะเชื้อเติมด้วย เมไธโอนีน-ดีแอล-ซัลฟอกซิมีน 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลาย

4.1 สารละลายซิงค์ซัลเฟต และแบเรียมไฮดรอกไซด์ (Nelson, N.,1944) สำหรับตกตะกอนโปรตีน

สารละลายซิงค์ซัลเฟต ละลายซิงค์ซัลเฟต 10 กรัมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองวัทแมน (Whatman) มาตรฐาน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 950 มิลลิลิตร

สารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ ละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ 9.54 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองวัทแมนมาตรฐาน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 950 มิลลิลิตร

ไตเตรทสารละลายซิงค์ซัลเฟตกับสารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ฟีนอลทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ เจือจางสารละลายจนกระทั่งได้สารละลายซิงค์ซัลเฟต 10 มิลลิลิตรสมมูลย์พอดีกับสารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ 10 $\pm$ 0.05 มิลลิลิตร

4.2 <u>สารละลายโซโมจิแอลคาไลคอปเปอร์และสารละลายอาร์ซีโนโมลิบเดท</u> (Nelson, N., 1944) สำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

สารละลายโซโมจิแอลคาไลคอปเปอร์ ประกอบด้วย โซเดียมคาร์บอเนต 24 กรัม โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เตรท 12 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนต 16 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 4 กรัม และโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สารละลายอาร์ซีโนโมลิบเดท ประกอบด้วย แอมโมเนียมโมลิบเดท 12.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 225 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 10.5 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายโซเดียมอาร์ซีเนทความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ 12.5 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ในขวดแก้วสีน้ำตาลที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมงก่อนใช้

4.3 สารละลายเหล็กและสารละลายโมลิบเดท (Fiske, C.H., and Subbarow, Y., 1925) สำหรับหาปริมาณฟอสเฟตอนินทรีย์

สารละลายเหล็ก ประกอบด้วย เฟอรัสซัลเฟต 4 กรัม ละลายในกรดซัลฟูริค 12.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 500 มิลลิลิตร

สารละลายโมลิเดท ประกอบด้วย แอมโมเนียมโมลิบเดท 6.6 กรัม ละลายในกรดซัลฟูริค 7.5 นอร์มอล 100 มิลลิลิตร

4.4 สารละลายกรดบอริคอินดิเคเตอร์ (Bremmer and Edward 1965)

สำหรับเก็บแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากการต้มกลั่นโดยวิธีเคลดาล์ ประกอบด้วย กรดบอริค 40 กรัม ละลายในน้ำร้อน 1,400 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 2 ลิตร แล้วเติม 400 มิลลิลิตรของ 95 เปอร์เซนต์ เอทธานอล และ 40 มิลลิลิตรของอินดิเคเตอร์ผสม (ประกอบด้วยโบรโมครีซอลกรีน 0.66 กรัม และเมธิลเร็ด 0.33 กรัมใน 95 เปอร์เซนต์ เอทธานอล 1 ลิตร) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นค่อยเติม 0.05 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปจนกระทั่งได้สารละลายซึ่งเมื่อนำไปทดสอบกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร สารละลายจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียวอ่อน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 2 ลิตร

5. วิธีศึกษาสมบัติทั่วไปของกากน้ำตาล

5.1 การฟอกสี

ชั่งกากน้ำตาลน้ำหนักแน่นอนทำให้เป็นสารละลายที่มีความข้น 10 เปอร์เซนต์ แล้วเติมผงถ่าน ต้ม 15 นาที กรองน้ำใสผ่านกระดาษกรองวัทแมนมาตรฐาน

5.2 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

นำกากน้ำตาลมาย่อยตามวิธีเคลดาล์ดัดแปลงใหม่โดยเนลสันและโซมเมอร์ (Nelson and Sommers, 1973) และหาปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากการต้มกลั่นโดยไตเตรทกับกรดตามวิธีของเบรมเมอร์และเอทเวิด (Bremmer and Edward 1965)

การย่อยและกลั่นสารตัวอย่าง

ผสมกากน้ำตาลข้น 10 เปอร์เซนต์ 1 มิลลิลิตร กับ 1.1 กรัม ของเกลือผสมคาตาลิสต์ (ประกอบด้วย โปตัสเซียมซัลเฟต : คอปเปอร์ซัลเฟตและซีลีเนียม ในอัตรา 100 : 10 : 1) ใส่ในหลอดฟูลินวู (Folin Wu) ขนาด 80 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 4 มิลลิลิตร นำไปต้มบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิประมาณ 300°ซ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีดำไปเป็นสารละลายใส ใช้เวลาประมาณ 1.5 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร จึงนำไปหาปริมาณแอมโมเนีย โดยใช้สารละลายที่ปรับปริมาตรแล้วนี้ 10 มิลลิลิตรผสมกับ 10 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 มิลลิลิตร นำไปต้มกลั่นโดยหลอดกลั่นเคลดาล์ รองรับสารละลายที่กลั่นได้ด้วยฟลาสขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ 5 มิลลิลิตรของสารละลายกรดบอริค–อินดิเคเตอร์ไว้ จนกระทั่งได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 30 มิลลิลิตรจึงหยุดกลั่น

การไตเตรทหาปริมาณแอมโมเนียที่กลั่นออกมา

นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นมาหาปริมาณแอมโมเนีย–ไนโตรเจน โดยไตเตรทกับกรดไฮโดรคลอริคที่มีความเข้มข้นมาตรฐาน 0.005 นอร์มอลจนกระทั่งถึงจุดสมมูลย์ โดยใช้สารละลายกรดบอริค–อินดิเคเตอร์ 5 มิลลิลิตรผสมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทกับกรดไฮโดรคลอริค 0.005 นอร์มอล เป็นตัวชี้นำ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีชมพูอ่อน จดปริมาตร

011724
01132

กรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ นำไปคำนวณเป็นปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนที่มีอยู่ในสารละลาย

1 มิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริคมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.005 นอร์มอล จะเท่ากับ 70 ไมโครกรัม แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (Bremmer and Edward 1965)

5.3 <u>การหาปริมาณฟอสเฟตอนินทรีย์</u> (Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1925)

ผสมกากน้ำตาลฟอกสีข้น 1 เปอร์เซนต์ 1 มิลลิลิตร (ประมาณว่ามีฟอสเฟตอนินทรีย์ 10–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับสารละลายเหล็ก 3.5 มิลลิลิตรและสารละลายโมลิบเดท 0.3 มิลลิกรัม วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวแสง 660 มิลลิไมครอน

5.4 <u>การขจัดโปรตีนในกากน้ำตาล</u>

ผสมกากน้ำตาลฟอกสีข้น 10 เปอร์เซนต์ 10 มิลลิลิตร กับสารละลายซิงค์-ซัลเฟต 5 มิลลิลิตรและสารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ 5 มิลลิลิตร

5.5 <u>การไฮโดรไลซ์กากน้ำตาล</u>

ผสมกากน้ำตาลที่ขจัดโปรตีนออกแล้ว 10 มิลลิลิตรกับกรดไฮโดรคลอริค 6 นอร์มอล 5 มิลลิลิตร ต้มที่ 70°ซ 30 นาที ภายหลังการไฮโดรไลซ์ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเจือจางให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

5.6 <u>การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์</u> (Nelson, N., 1944)

ผสมกากน้ำตาลที่ขจัดโปรตีนแล้วก่อนและหลังไฮโดรไลซ์ 1 มิลลิลิตร (ประมาณว่ามีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ 10–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับสารละลาย

โซโมจิแอลคาไลคอปเปอร์ 1 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น 5 นาทีในน้ำเย็น เติมสารละลายอาร์ซีโนโมลิบเดท 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 10 มิลลิลิตร วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวแสง 560 มิลลิไมครอน

6. การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองถูกเก็บรักษาไว้บนวุ้นเอียงที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบี-บรอทในขวดที่ปิดจุกแล้วเคลือบด้วยพาราฟิน เฉพาะพวกต้านเมไธโอนีน-ดีแอล-ซัลฟอกซีมีนจะเติมเมไธโอนีน-ดีแอล-ซัลฟอกซีมีนลงไป 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อต้องการใช้แบคทีเรียในการทดลองจะเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อใหม่โดยเขี่ยมาจากขวดที่เก็บไว้

7. การศึกษาศักยภาพในการเป็นอาหารของแบคทีเรียของกากน้ำตาล

เลี้ยงเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) WT ในแอลบี-บรอท ที่ 37°ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กระจายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำซึ่งอยู่ในขวดต่อแขนด้านข้างในอัตรา 3 : 100 เติมกลูโคส กากน้ำตาลก่อนและหลังไฮโดรไลซ์ให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ตามต้องการ นำไปเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Klett colorimeter ทุกชั่วโมง โดยใช้ตัวกรองแสงสีเขียวจนอ่านได้ค่าความขุ่นคงที่อย่างน้อยหนึ่งชั่วโมง

8. การเตรียมกรดอะมิโนออกโซโทรพ (Adelberg, E.A, 1965)

8.1 การเตรียมเมไธโอนีนออกโซโทรพ (met)

นำเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) WT ซึ่งเลี้ยงในแอลบี-กลูโคสที่ 37°ซ นาน 12 ชั่วโมง เติมลงในแอลบี-กลูโคสใหม่ในอัตรา 1 : 5

เพาะเลี้ยงที่ 37°ซ ความเร็ว 130 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง เก็บเซล โดยการปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างเซล 2–3 ครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ กระจายแบคทีเรียทั้งหมดลงใน 0.1 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์พีเอช 5.5 แล้วเติม NTG ลงไปให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 35 นาที นำแบคทีเรียที่ถูกกลายพันธุ์นี้ไปล้างเซล 2–3 ครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ แยกเซลล์ออกโดยการปั่น นำไปเลี้ยงในแอลบี–กลูโคส โดยเขย่าที่ 37°ซ 130 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง ล้างเซล 2–3 ครั้ง โดยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ นำเซลแอคติเวทในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ โดยเขย่าที่ 37°ซ 130 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง เติมเพนนิซิลินจีให้เป็น 20,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และดี–ไซโคลเซอรีนให้เป็น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าต่ออีก 5 ชั่วโมง ล้างเซล 2–3 ครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ เลี้ยงเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่มีเมไธโอนีน 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ 37°ซ ความเร็ว 130 รอบต่อนาที นาน 14 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วเก็บเซลโดยการปั่น และนำแบคทีเรียมาเจือจางให้มีปริมาณเซลต่าง ๆ กันในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ แล้วดูด 0.1 มิลลิลิตร ของแต่ละความเข้มข้นมาหยดใส่จานเพาะเชื้อที่มีอาหารสูตรปรับต่ำซึ่งเติมเมไธโอนีน 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เกลี่ยแบคทีเรียให้กระจายทั่วบนผิวอาหารนี้ เพาะเลี้ยงที่ 37°ซ นาน 24–48 ชั่วโมง หรือจนโคโลนีโตเห็นได้ชัด นำไปพิมพ์ลงในอาหารสูตรปรับต่ำที่ปราศจากเมไธโอนีนและเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ นาน 12–24 ชั่วโมง เลือกเมไธโอนีนออกโซโทรพ (met) โดยดูจากโคโลนีที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเมไธโอนีน แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากเมไธโอนีน นำเมไธโอนีนออกโซโทรพที่ได้ไปแยกให้บริสุทธิ์ แล้วกริด (grid) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารสูตรปรับต่ำเสริม

ด้วยเมไธโอนีน 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ 37°ซ 24–48 ชั่วโมง หรือจนโคโลนีโตเห็นได้ชัด นำมาจำแนกฟีโนไทพ์โดยพิมพ์ (replica) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่เสริมและไม่ได้เสริมด้วยดีแอล–โฮโมซีสเตอีน 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิตามินบี 12 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดีแอล–โฮโมซีสเตอีนกับวิตามินบี 12 ซีรีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับกรดเตตราโฮโดรโฟลิค

เมไธโอนีนออกโซโทรพ (met) ที่จำแนกฟีโนไทพ์แล้วนำไปทดสอบความถี่ของการผันกลับ (reversion frequency) ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

8.2 การเตรียมธรีโอนีนออกโซโทรพ (thr)

การเตรียมธรีโอนีนออกโซโทรพเช่นเดียวกับเมไธโอนีนออกโซโทรพ แต่ที่ใดเสริมด้วยเมไธโอนีน 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เสริมด้วยธรีโอนีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแทน นำเมไธโอนีนออกโซโทรพที่ได้ไปแยกให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปทดสอบความถี่ในการผันกลับ (reversion frequency) ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

8.3 การทดสอบความถี่ในการผันกลับ

เชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกรดอะมิโนเมไธโอนีน 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับ met และธรีโอนีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับ thr เพาะเลี้ยงที่ 37°ซ 24–48 ชั่วโมง วัดความขุ่นที่ความยาวแสง 500 มิลลิไมครอน เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ให้มีความขุ่นต่างกัน ดูด 0.1 มิลลิลิตรของแต่ละความเข้มข้นมาหยดใส่จานเพาะเชื้อที่มีอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมและไม่ได้เสริมด้วยกรดอะมิโน เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วบนผิวอาหารนี้ เพาะเลี้ยงที่ 37°ซ 7 วัน นับและเทียบจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในสารอาหารทั้งสอง

8.4 การศึกษาการเจริญของกรดอะมิโนออกโซโทรพ

เลี้ยงแบคทีเรียในแอลบี-บรอทที่ 37°ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กระจายเซลลงในสารอาหารซึ่งปรับปริมาณและชนิดตามความเหมาะสมในอัตรา 3 : 100 นำไปเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวแสง 500 มิลลิไมครอน ทุกสองชั่วโมง ติดตามค่าที่ได้จนกระทั่งความขุ่นคงที่เป็นเวลาอย่างน้อยสองชั่วโมง

9. การเลือกสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีนของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110)

9.1 การเตรียมสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีน

นำเซลที่ทดสอบ (thr และ WT) กระจายลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารสูตรปรับต่ำ ซึ่งเติมและไม่ได้เติมธรีโอนีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ขอบหนึ่งของจานเพาะเชื้อเสริมด้วยเมไธโอนีน-ดีแอล-ซัลฟอกซิมีน 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 0.1มิลลิลิตรเพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้น และเลือกโคโลนีมาทดสอบการขับเมไธโอนีนออกโดยทำ cross feeding กับ met

9.2 การเลือกสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีนออกโดยวิธี cross feeding

กระจายmet สายพันธุ์ที่เชื่อว่ามีความผิดปกติที่เอ็นไซม์เอ็น 5 เอ็น 10 -เมธิลีนเตตราไฮโดรโฟเลท รีดัคเตส 10^4 เซลต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารสูตรปรับต่ำ กริด (grid) แบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงไปโดยใช้ไม้จิ้มฟัน เพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน ดูขนาดของmet ที่ขึ้นล้อมรอบแบคทีเรียที่ทดสอบ

10 <u>การตรวจสอบปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออก</u>

เลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ (<u>thr</u> กับ <u>thr</u> <u>MSO</u>^{r} และ <u>WT</u> กับ<u>WT</u> <u>MSO</u>^{r} ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่เสริมและไม่ได้เสริมด้วยธรีโอนีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ 37 °ซ ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่เวลาต่าง ๆ กัน ช่วงเวลาละ 4 ชั่วโมง ดูดไปครั้งละ 7 มิลลิลิตร นำไปวัดความขุ่นที่ความยาวแสง 500 มิลลิไมครอน แล้วขจัดเซลโดยการปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที กรองน้ำใสผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ ขนาด 0.45 มิลลิไมครอน นำน้ำใสที่กรองแล้วนี้ 5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารสูตรปรับต่ำ 5 มิลลิลิตรในขวดเอเลนเมเยอร์ขนาด 125 มิลลิลิตร แล้วเติม <u>met</u> (สายพันธุ์ที่เชื่อว่ามีความผิดปกติที่เอ็นไซม์ เอ็น 5 เอ็น 10–เมธิลีนเตตราไฮโดรโฟเลสรีดัคเตส ลงไปในอัตราส่วน 3 : 100 เขย่าที่ 37 °ซ ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 10–16 ชั่วโมง วัดความขุ่นสูงสุดของ <u>met</u> ที่ความยาวแสง 500 มิลลิไมครอนใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้ปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกมาในอาหาร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย