บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. จุลินทรีย์

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์ 5 สายพันธุ์ คือ SS3 และ SS4 แยกได้จากชายฝั่งทะเลสงขลา สายพันธุ์ FS 3 แยกได้จากน้ำสียบ่อที่ 3ของโรงงานปิติซีฟูด สายพันธุ์ SH5 แยกได้จากนากุ้ง อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา ส่วนสายพันธุ์ ES 16 แยกได้จากชายฝั่งตะวันออก อำเภอ พัทยา จังหวัดชลบุรี จุลินทรีย์เหล่านี้แยกได้โดย อมรรัตน์ ตั้งประสิทธิภาพ (2544) เก็บรักษาในอาหารกลูตาเมต-มาเลต (GM) ที่มีเกลือ 3% โดยวิธี stab เก็บในตู้เย็น ถ่ายเชื้อทุก 2 เดือน

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

Glutamate-malate medium (GM) ประกอบด้วย sodium-L-glutamate 3.8, DL-malic acid 2.7, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $(NH_4)_2SO_4$ 0.8, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2, $CaCl_2.2H_2O$ 0.053, $MnSO_4.5H_2O$ 0.0012, nicotinic acid 1.0×10^{-3}, thiamine-HCl 1.0×10^{-3}, biotin 1.0×10^{-5} กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.0 นอร์มอล ถ้าเป็นอาหารแข็ง เติมวุ้นร้อยละ 1.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที (Lascelles, 1956)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆในการจำแนกเชื้อที่คัดเลือกได้ แสดงในภาคผนวก ก

3. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ กรดลีวูลินิก, ไกลซีน ซัคซิเนต กลูตาเมต มาเลต กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก แมกนีเซียมคลอไรด์ ไพริดอกซัลฟอสเฟต

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

1.0 ขวดแบน

1.0 หลอดไฟฟ้าทังสเตน 60 วัตต์

1.0 เครื่องวัดแสง (Lux meter) Model LX-50 ของบริษท Digcon จำกัด

1.0 อ่างแก้วขนาด 33X48X15 เซนติเมตร พร้อมอุปกรณ์การให้แสง 3,000 ลักซ์

1.0 เครื่องวัดพีเอช รุ่น 410 A ยี่ห้อ Orion

1.0 ถังหมักขนาด 2 ลิตร พร้อมอุปกรณ์ ยี่ห้อ B. Braun รุ่น Biostat B

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.0 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000

1.0 เครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SCR 20 B ของบริษัท Hitachi koki จำกัด

1.0 เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer)

1.0 เครื่อง HPLC ของ Hewlett Packard

1.0 อ่างแก้วขนาด 33X48X15 เซนติเมตร พร้อมอุปกรณ์การให้แสง 3,000 ลักซ์

1.0 เครื่องวัดพีเอช รุ่น Orion

1.0 ถังหมักขนาด 2 ลิตร พร้อมอุปกรณ์ ยี่ห้อ B. Braun รุ่น Biostat B

วิธีการวิเคราะห์

1. **น้ำหนักเซลล์แห้ง** เหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ใส่ในจานเพาะเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอนนำไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส อบจนแห้งและน้ำหนักคงที่ (Noparatnaraporn *et al.*, 1986)

2. **ปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายนอกเซลล์** โดยการนำน้ำหมักไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 x g นาน 5 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณ ALA โดยวิธี

colorimetric (Lin *et al*., 1989) โดยนำส่วนใสที่เจือจางอย่างเหมาะสม 1 มิลลิลิตร เติม 1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.7 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เติมอะซิติลอะซีโตน 0.05 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในน้ำแข็ง เติม modified Ehrlish's reagent 3.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

3. **ปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในเซลล์** นำน้ำหมักไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 x g เป็นเวลา 15 นาที (Lin *et al*., 1989) นำตะกอนเซลล์ไปล้างด้วย 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 2 ครั้ง เติม 0.04 M Tris-HCl 1 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งที่ –20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง (ultra-sonic) โดยใช้ความถี่ 25 เมกะเฮริตซ์ เว้นจังหวะในการปล่อยคลื่นเสียง 2.5 วินาที ใช้เวลาทั้งหมด 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 g เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณ ALA โดยใช้เครื่อง HPLC ปริมาณตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร เติมส่วนผสมของอะซิติลอะซีโตน เอทธานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 15 : 10 : 75 ปริมาตร/ปริมาตร โซเดียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร เติมฟอร์มาลิน 450 ไมโครลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือด 30 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในน้ำแข็ง กรองสารละลายโดยใช้เมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน นำสารละลายที่ได้ 50 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ปริมาณ ALA โดยใช้เครื่อง HPLC (Hewlett Packard series 1100) ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด octadecyl silica column (Hypersil ODS C18 ; HP) ขนาดของอนุภาค 5 ไมครอน ความยาว 250 ไมครอน และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร สำหรับดีเทคเตอร์ที่ใช้เป็นชนิด FLD รุ่น G 1321

สภาวะในการวิเคราะห์มีดังนี้ mobile phase คือ เมทธานอล : 2.5% กรดอะซิติก = 60 : 40 อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตร/นาที ใช้ความยาวคลื่น 473 นาโนเมตร และ excitation wavelengh 363 นาโนเมตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

การคำนวณ โดยการคำนวณพื้นที่ของพีค และเข้าสมการของกราฟมาตรฐานซึ่งได้เตรียมโดยวิธีเดียวกันนี้แต่แปรผันความเข้มข้นของสารละลาย ALA มาตรฐาน (Skoog *et al*., 1996).

4. **กิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthetase** เติม cofactor mixture (ประกอบด้วย 0.2 M ATP, 0.01 M Coenzyme A, 0.01 M pyridoxal phosphate และน้ำ) ปริมาณ 0.15 มิลลิลิตร และ substrate mixture (ประกอบด้วย 1 M ไกลซีน, 1 M ซัคซิเนต, 0.1 M $MgCl_2$ และ 1 M Tris-HCl buffer pH 7.5) ปริมาณ 0.35 มิลลิลิตร เติม crude enzyme ที่ได้จากการทำให้เซลล์แตก 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว นำไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกริยาด้วย 10 % trichloracetic acid 0.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ นาน 20 นาที นำสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร เติม 1 โมลาร์ acetate buffer (pH 4.7) 2 มิลลิลิตร และเติม acetylacetone 0.05 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว เติม Ehrlish's reagent 3.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 556 นาโนเมตร (Burnham, 1970) นำค่าการดูดกลืนแสงไปแทนในสมการที่ 1

5. **กิจกรรมของเอนไซม์ ALA dehydratase** โดยการเติม reaction mixture (ประกอบด้วย ALA 5 μmol, KCl 20 μmol, $MgCl_2$ 5 μmol และ Tris-HCl buffer (pH 8.1) 100 μmol) และ crude enzyme โดยมีปริมาตรรวม 0.6 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 5% trichloroacetic acid 2.4 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g 20 นาที นำส่วนใส 1 มิลลิลิตรเติม modified Ehrlish's reagent 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 555 นาโนเมตร นำไปแทนในสมการที่ 1 ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าของความเข้มข้น PBG (นาโนโมล) โดยมีค่า molar extinction coefficient เท่ากับ 62×10^3 และแบ่งส่วนใสมา 1 มิลลิลิตรเติม HCl 3 นอร์มัล ปริมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปส่องไฟที่ 3,000 ลักซ์ 1 คืน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 406 นำไปลบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร นำค่าที่ได้แทนในสมการที่1 ค่าที่ได้จะเป็นปริมาณของพอร์ไพรินโดยมีค่า molar extinction coefficient ($\Delta\varepsilon^{406\text{-}430\ nm}$) เท่ากับ 53×10^3 และนำค่าที่ได้หลังจากแทนในสมการที่ 1 มาคำนวณปริมาณทั้งหมดของ PBG (นาโนโมล) = (พอร์ไพริน x4) +PBG (นาโนโมล) (Sato *et al*., 1981)

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

การคำนวณความเข้มข้นของผลผลิตที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ของ Beer's Law

$$C = \frac{A}{Eb} \qquad \text{สมการที่ 1}$$

โดยที่

C = ความเข้มข้น

A = ค่าการดูดกลืนแสง

E = extinction coefficient

b = ความยาวที่แสงผ่าน 1 เซนติเมตร

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มที่ผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก

1.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม จากหลอดอาหารวุ้นเอียงลงสู่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (microaerobic-light) ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่มีการกวน วัดความขุ่นของเชื้อด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางด้วยอาหารเหลวสูตร GM+3% NaCl เพื่อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

1.2 การเลี้ยงเชื้อ

เติมเชื้อเริ่มต้น 35 มิลลิลิตร ลงในขวดแบนปริมาตร 375 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร GM+3% NaCl ปริมาตร 315 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ โดยไม่มีการกวน เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เวลาเริ่มต้นและทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อวัดค่า

พีเอช และ ค่าการดูดกลืนแสง และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) และ ปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกในน้ำหมักคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรด 5- อะมิโนลีวูลินิกนอกเซลล์สูงสุด แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ และนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

1. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มที่คัดเลือกได้

2.1 การจำแนกในระดับวงศ์ (Family)

เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ อายุ 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวสูตร sufide medium (Watanabe *et al*., 1981) (ภาคผนวก ก) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง (ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของเซลล์และพีเอชของเชื้อ บันทึกการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ นาน 72 ชั่วโมง ถ้าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไม่สามารถเจริญได้ในอาหารนี้ จัดเป็นกลุ่ม purple non-sulfur bacteria วงศ์ Rhodospirillaceae (Staley *et al*., 1989)

2.2 การจำแนกเชื้อในระดับสกุล (Genus) และชนิด (Species)

การจำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในระดับสกุล และชนิด จำแนกตามวิธีการที่ระบุใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Staley *et al*., 1989) โดยเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ-มีแสง ลักษณะที่ศึกษาคือ

1. รูปร่างเซลล์ การติดสีแกรม การสร้างเมือก การเจริญของเชื้อในอาหารเหลวสูตร GM ภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสงและมีอากาศ-ไร้แสง
1. การเคลื่อนที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการแทงเข็มเขี่ยเชื้อที่มีเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงลงในอาหารทดสอบ (ภาคผนวก ก) ที่อยู่ในหลอดแก้วปลายเปิด นำมาส่องไฟ สังเกตการเจริญของเชื้อในอาหารทดสอบว่ามีการแพร่ออกนอกหลอดแก้วปลายเปิดหรือไม่ ถ้ามีแสดงว่ามีการเคลื่อนที่ของเชื้อ
1. แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ วิเคราะห์โดยวิธี scanning ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยการนำเซลล์มีชีวิตที่อยู่ในระยะเจริญเต็มที่ใส่ในสารละลายน้ำตาลซูโครส 60% นำ

ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วงกว้างที่ความยาว 370 ถึง 900 นาโนเมตร ใช้สารละลายน้ำตาลซูโครสเป็น blank ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะเป็นตัวบ่งบอกชนิดของแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (Pfenning, 1969) (ภาคผนวก ข)

1. ความสามารถในการย่อยสลายเจลาติน โดยเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในสูตรอาหารทดสอบ (Watanabe *et al*., 1981) (ภาคผนวก ก) นำไปส่องไฟเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำหลอดทดสอบดังกล่าวมาใส่ในตู้เย็น 1 วัน ถ้าอาหารในหลอดทดสอบเหลวแสดงว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงดังกล่าวสามารถย่อยสลายเจลาตินได้
1. ความต้องการวิตามิน โดยทดสอบในอาหารทดสอบ (Watanabe *et al*., 1981) ที่มีส่วนผสมของวิตามินบี 12 กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก กรดนิโคตินิก ไทอามิน และ ไบโอติน (ภาคผนวก ก) เลี้ยงเชื้อที่สภาวะไร้อากาศ-มีแสง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
1. ความต้องการสารอาหาร โดยทดสอบในอาหารทดสอบ (Watanabe *et al*., 1981) ที่เติมสารอาหารร้อยละ 0.5 ดังนี้ อะซิเตท โพรพิโอเนต บิวทิเรต ไพรูเวท แลคแตท มาเลต ซัคซิเนต ฟูมาเรต ทาทาเรต ซิเทรต กลูตาเมต เบนโซเอต กลูโคส ฟรุคโทส แมนโนส แมนนิทอล ซอร์บิทอล กลีเซอรอล เมทธานอล และไธโอซัลเฟต (ภาคผนวก ก) เลี้ยงเชื้อที่สภาวะไร้อากาศ-มีแสง และเก็บตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หลังการเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

1. **ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก**

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในขวดแบนขนาด 375 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม 350 มิลลิลิตร แต่ละปัจจัยที่ศึกษาสุ่มตัวอย่างที่เวลาต่างๆกัน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อวัดค่า พีเอช และ ค่าการดูดกลืนแสง และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ALA ภายในและภายนอกเซลล์ รวมทั้งเอนไซม์ ALA synthetase และ ALA dehydratse

ปัจจัยในการศึกษา มีดังนี้

3.1 ผลของความเข้มข้นกรดลีวูลินิก

ทดสอบหากรดลีวูลินิกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเจริญและเพิ่มการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก โดยเติมในปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 มิลลิโมลาร์ ที่ 24 ชั่วโมง

1.0 ผลของจำนวนครั้งในการเติมกรดลีวูลินิก

ทดสอบหาจำนวนครั้งในการเติมกรดลีวูลินิกที่มีผลต่อการเจริญและเพิ่มการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก โดยผันแปรวิธีการเติมกรดลีวูลินิก ดังนี้

1) เติมครั้งเดียวที่ 24 ชั่วโมง ในปริมาณที่ได้จากข้อ 3.1
1) เติมซ้ำ 3 ครั้ง ในปริมาณที่ได้จากข้อ 3.1 โดยเติมที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง
1) เติมซ้ำ 3 ครั้ง ในปริมาณ 5 มิลลิโมลาร์ ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

1.0 ผลของสารตั้งต้นในวิถี C_5

เลี้ยงเชื้อตามสภาวะจากข้อ 3.2 โดยเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่เติมสารตั้งต้นของวิถี C_5 คือ กลูตาเมต และ กรดมาลิกต่อการเจริญและเพิ่มการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกใช้ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเติมกรดลีวูลินิกในปริมาณและจำนวนครั้งที่เหมาะสมจากข้อ 3.2

3.3.1 ผลของการเติมกลูตาเมต

ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตาเมต โดยเติมในปริมาณ 0, 10, 20, 30 และ 40 มิลลิโมลาร์

3.3.2 ผลของการเติมกรดมาลิก

เติมกลูตาเมตในปริมาณที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.3.1) เติมกรดมาลิกในปริมาณ 7.5, 15 , 22.4 และ 30 มิลลิโมลาร์

3.4 ผลของสารตั้งต้นในวิถี C_4

1.0.0 ผลของการเติมไกลซีน

เติมไกลซีนเป็นสารตั้งต้นในปริมาณ 10, 20, 30 และ 40 มิลลิโมลาร์

1.0.0 ผลของการเติมซัคซิเนต

เติมไกลซีนที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.4.1) และเติมซัคซิเนตในปริมาณ 10, 20, 30 และ 40 มิลลิโมลาร์

3.5 ผลของชนิดและความเข้มข้นของกรดไขมันระเหย

เลี้ยงเชื้อตามสภาวะที่ได้จากข้อ 3.4 ศึกษาผลของการเติมกรดไขมันระเหยแต่ละชนิดคือ กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก ต่อการเพิ่มการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก โดยเติมในปริมาณ 0, 0.5, 1, 2 และ 3 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0

3.6 ผลของการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์

เลี้ยงเชื้อที่ได้ตามสภาวะข้อที่ 3.5 และเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิโมลาร์ ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0

3.7 ผลของการเติมไพริดอกซัลฟอสเฟต

เลี้ยงเชื้อที่ได้ตามสภาวะข้อที่ 3.6 และทดสอบการเติมไพริดอกซัลฟอสเฟตโดยผันแปรการเติมเป็น 0, 10, 20, 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0

3.8 ผลของพีเอชเริ่มต้น

เลี้ยงเชื้อที่ได้ตามสภาวะข้อที่ 3.7 และปรับพีเอชเริ่มต้นในอาหารมีค่าเท่ากับ 6.5 , 7.0 , 7.5 และ 8.0

3.9 ผลของการควบคุมพีเอช

เลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยมีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 ลิตร ควบคุมพีเอชให้เท่ากับค่าที่เหมาะสมจากข้อ 3.8 เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่มีการควบคุมพีเอช ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อเดียวกัน

แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำและวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan Multiple Range Test)