

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
dextrose	20	กรัม
วุ้น	17	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มมันฝรั่งที่หั่นเป็นชิ้นขนาดลูกเต๋าน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก ทดสอบโดยใช้แท่งคนกดขึ้นมันฝรั่งดู จะมีลักษณะนิ่ม กรองขึ้นมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง เอาแต่เฉพาะน้ำต้มมันฝรั่ง จากนั้นนำน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตรที่เหลือ ละลายวุ้นและน้ำตาล แล้วนำไปต้มให้วุ้นสุก ซึ่งจะมีลักษณะข้นใส เมื่อได้ที่แล้วให้เทน้ำต้มมันฝรั่งผสมลงไป คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ใช้สำหรับแยกเชื้อรา เพื่อเป็น Stock culture และใช้เลี้ยงเชื้อราเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา

2. อาหารเหลวสำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อรา (enrichment medium)

KH_2PO_4	2.00	กรัม
NaNO_3	2.00	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
Trace metal solution	1.00	มิลลิลิตร
Locust bean gum	5.00	กรัม
Corn steep solids	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมต่าง ๆ ลงในน้ำกลั่น โดยละลายสารแต่ละชนิดให้หมดก่อนที่จะเติมสารอื่นลงไป แล้วจึงปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้น ปรับ pH ให้ได้ 5.5 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N และ HCl ความเข้มข้น 1 N เทส่วนผสมปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไปในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติม glass bead 3-4 เม็ดลงในอาหาร เพื่อช่วยให้เชื้อราไม่เจริญเกาะติดกันเป็นก้อนใหญ่ ทำให้มีการถ่ายเทของอากาศดีขึ้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ : ในกรณีเตรียมอาหารเหลวสำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อรา เพื่อใช้ในการแยกและคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิต mannanase ได้จากตัวอย่างดิน ให้เติม Penicillin G. 40.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเติมลงไปปริมาณ 0.25 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 25 มิลลิลิตร (เตรียมซัง Penicillin G. ปริมาณ 0.08 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 20 มิลลิลิตร ไว้เป็น stock) ใส่ลงในอาหารเหลวก่อนการถ่ายเชื้อ

3. อาหารเหลวเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิต mannanase (cultivation medium)

KH ₂ PO ₄	2.00	กรัม
NaNO ₃	2.00	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.30	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.30	กรัม
Trace metal solution	1.00	มิลลิลิตร
Locust bean gum	10.00	กรัม
Corn steep solids	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับ pH 5.5 ปรับปริมาตรอาหาร ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 50 มิลลิลิตร เติม glass bead 3-4 เม็ด ลงในอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารแข็ง locust bean gum (LBG agar)

KH_2PO_4	2.00	กรัม
NaNO_3	2.00	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
Trace metal solution	1.00	มิลลิลิตร
Locust bean gum	5.00	กรัม
Corn steep solids	1.00	กรัม
วุ้น	17.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรอาหารให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 5.5 เทลงไปในขวดสำหรับเตรียมอาหารขนาด 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นก็ให้อุ่นพอสมควรแล้วจึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

5. อาหารเหลวสำหรับศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต mannanase

ส่วนที่ 1

KH_2PO_4	2.00	กรัม
NaNO_3	2.00	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
Trace metal solution	1.00	มิลลิลิตร
Corn steep solid	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ส่วนที่ 2 แหล่งคาร์บอนที่นำมาศึกษา

สูตรที่ 1 อาหารเหลวที่มี แป้งละลายน้ำได้ 1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่ง แป้งละลายน้ำได้ 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่

ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 2 อาหารเหลวที่มีแป้งข้าวเหนียว 1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่งแป้งข้าวเหนียว 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่

ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 3 อาหารเหลวที่มี แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่ง แป้งมันสำปะหลัง 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่

ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 4 อาหารเหลวที่มี แป้งบุกเมืองกาญจน์ 1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่ง แป้งบุกเมืองกาญจน์ 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่

ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 5 อาหารเหลวที่มี บุกจากเพชรบูรณ์ 1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่ง หัวบุก 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่

ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 6 อาหารเหลวที่มี แป้งบุกญี่ปุ่น 1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่ง 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่

ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 7 อาหารเหลวที่มี Locust bean gum 1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่ง Locust bean gum 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่

ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 8 อาหารเหลวที่มี กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่ง กลูโคส 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่

ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 9 อาหารเหลวที่มี แมนโนส 1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่ง แมนโนส 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่

ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมที่ 1 ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 5.5 แล้วแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่เตรียมส่วนที่ 2 ไว้เรียบร้อยแล้ว ขวดละ 50 มิลลิลิตร เติม glass bead 3-4 เม็ด ลงในอาหาร นำไปนั่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน

15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารเหลวสำหรับการใช้ในการศึกษาความเข้มข้นของ locust bean gum เพื่อการผลิต

mannanase

ส่วนที่ 1

KH_2PO_4	2.00	กรัม
NaNO_3	2.00	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
Trace metal solution	1.00	มิลลิลิตร
Corn steep solids	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ส่วนที่ 2 ชั่ง locust bean gum ปริมาณต่าง ๆ กัน ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติม locust bean gum

สูตรที่ 2 locust bean gum 0.50 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง locust bean gum 0.25 กรัม/50 มิลลิลิตร

สูตรที่ 3 locust bean gum 1.00 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง locust bean gum 0.50 กรัม/50 มิลลิลิตร

สูตรที่ 4 locust bean gum 1.50 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง locust bean gum 0.75 กรัม/50 มิลลิลิตร

สูตรที่ 5 locust bean gum 2.00 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง locust bean gum 1.00 กรัม/50 มิลลิลิตร

สูตรที่ 6 locust bean gum 2.50 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง locust bean gum 1.25 กรัม/50 มิลลิลิตร

สูตรที่ 7 locust bean gum 3.00 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง locust bean gum

1.50 กรัม/50 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมที่ 1 ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 5.5 แล้วแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ locust bean gum ไว้แล้วในส่วนที่ 2 เติม glass bead 3-4 เม็ด ลงในอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ที่ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหารเหลวสำหรับศึกษาผลของความเป็นกรด ต่างของอาหารต่อการผลิต mannanase

ส่วนที่ 1

KH_2PO_4	2.00	กรัม
NaNO_3	2.00	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
Trace metal solution	1.00	มิลลิลิตร
Corn steep solids	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ส่วนที่ 2 ซึ่ง locust bean gum 1.50 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0.75 กรัม ในขวด รูป ชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมที่ 1 ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่ ขวดรูปชมพู่ที่เตรียมส่วนที่ 2 ไว้เรียบร้อยแล้ว ขวดละ 50 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 ตามลำดับ โดยใช้ 1 M HCl, 0.1 M HCl, 1 M NaOH และ 0.1 NaOH ปรับ pH เติม glass bead 3-4 เม็ด ลงในอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. อาหารเหลวสำหรับใช้ในการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต mannanase

ส่วนที่ 1

KH_2PO_4	2.00	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม

Trace metal solution	1.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ส่วนที่ 2

สูตรที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน)

เตรียมโดยชั่ง locust bean gum 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 2 อาหารเหลวที่มี yeast extract 0.2 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่ง yeast extract 0.10 กรัม และ locust bean gum 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 3 อาหารเหลวที่มี soy bean meal 0.2 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่ง soil bean 0.10 กรัม และ locust bean gum 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 4 อาหารเหลวที่มี urea 0.2 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่ง urea 0.03 กรัม และ locust bean gum 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 5 อาหารเหลวที่มี peptone 0.2 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่ง peptone 0.10 กรัม และ locust bean gum 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 6 อาหารเหลวที่มี corn steep solids กับ NaNO_3 เท่ากับ 0.1 และ

0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เตรียมโดยชั่ง corn steep solid 0.05 กรัม และ NaNO_3 0.10 กรัม และ locust bean gum 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมที่ 1 ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 5.5 แล้วแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ที่เตรียมส่วนที่ 2 ไว้เรียบร้อยแล้ว ขวดละ 50 มิลลิลิตร เติม glass bead 3-4 เม็ด ลงในอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. อาหารเหลวสำหรับใช้ในการศึกษาผลของ corn steep solids กับ NaNO_3 ต่อการ ผลิต

mannanase

ส่วนที่ 1

KH_2PO_4	2.00	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
Trace metal solution	1.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ส่วนที่ 2

สูตรที่ 1 หุตควมคุม เตรียมโดยซัง locust bean gum 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 2 อาหารเหลวที่มี corn steep solid 0.1 เปอร์เซนต์ เตรียมโดยซัง corn steep solids 0.05 กรัม และ locust bean gum 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 3 อาหารเหลวที่มี NaNO_3 0.2 เปอร์เซนต์ เตรียมโดยซัง NaNO_3 0.10 กรัม และ locust bean gum 0.50 กรัม ใส่ในขวดรูป ชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

สูตรที่ 4 อาหารเหลวที่มีทั้ง corn steep solids 0.1 เปอร์เซนต์ และ NaNO_3 0.2 เปอร์เซนต์ เตรียมซังโดย corn steep solid 0.05 กรัม และ NaNO_3 0.10 กรัม และ locust bean gum 0.05 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมที่ 1 ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 5.5 แล้วแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ที่เตรียมส่วนที่ 2 ไว้เรียบร้อยแล้ว ขวดละ 50 มิลลิลิตร เติม glass bead 3-4 เม็ด ลงในอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. Czapek Solution Agar

NaNO_3	3.00	กรัม
K_2HPO_4	1.00	กรัม
KCl	0.50	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
Sucrose	30.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปรับปริมาตรอาหารให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เทลงในขวดสำหรับเตรียมอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ ที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้อุ่นพอสมควร แล้วจึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

ภาคผนวก ข.

วิธีเตรียมน้ำยาทดสอบและบัฟเฟอร์

1. DNS reagent

ประกอบด้วย 3, 5-dinitrosalicylic acid	1	กรัม
phenol	0.20	กรัม
Sodium sulfite	0.05	กรัม
Sodium hydroxide	1	กรัม

วิธีการ ละลาย 3, 5-dinitrosalicylic acid ปริมาณ 1 กรัม ในสารละลายของ sodium hydroxide ซึ่งมี sodium hydroxide 1 กรัม ละลายอยู่ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรจนให้ละลายหมด

จากนั้นเติม phenol ปริมาณ 0.20 กรัม และ sodium sulfite 0.05 กรัม แล้วคนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรใน volumetric flask ให้ได้สารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. 40 % Na-K-Tartrate

นำ Na-K-Tartrate 40 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายจนหมด

3. Coomassie brilliant blue G-250 (CBB)

ซึ่ง coomassie brilliant blue G-250 (St.Louis,MO,U.S.A) 0.01 กรัม ละลายใน 95 % ethanal 12.5 มิลลิลิตร ละลายให้หมดก่อน

เติม 85 % phosphoric acid 25 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วจึงเติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรใน volumetric flask ให้ได้สารละลายปริมาตร 250 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา นำมาใช้ได้วันต่อวัน

4. Acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M

สารละลาย A คือ สารละลาย acetic acid ความเข้มข้น 0.1 M เตรียมโดยให้ปิเปตจุด acetic acid ปริมาณ 5.78 มิลลิลิตร ลงไปในน้ำกลั่นปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย B คือ สารละลาย sodium acetate trihydrate ความเข้มข้น 0.1 M. เตรียมโดยชั่ง sodium acetate trihydrate ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 13.6 กรัม หรือ sodium acetate anhydrous 8.203 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร

4.1 Acetate buffer pH 4.0 ความเข้มข้น 0.1 M

นำสารละลาย A 41.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 9.0 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

4.2 Acetate buffer pH 4.5 ความเข้มข้น 0.1 M

นำสารละลาย A 28.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 22.0 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

4.3 Acetate buffer pH 5.0 ความเข้มข้น 0.1 M

นำสารละลาย A 14.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 35.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

4.4 Acetate buffer pH 5.5 ความเข้มข้น 0.1 M

นำสารละลาย A 6.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 43.2 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

5. Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M

สารละลาย A คือ สารละลาย NaH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.1 M เตรียมโดยชั่ง NaH_2PO_4 13.9 กรัม หรือ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15.6 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย B คือ สารละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.1 M เตรียมโดยชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 26.825 กรัม หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 17.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

5.1 Phosphate buffer pH 6.0 ความเข้มข้น 0.1 M

นำสารละลาย A 87.7 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 12.3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร

5.2 Phosphate buffer pH 6.5 ความเข้มข้น 0.1 M

นำสารละลาย A 68.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 31.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร

5.3 Phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M

นำสารละลาย A 39.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 61.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร

5.4 Phosphate buffer pH 7.5 ความเข้มข้น 0.1 M

นำสารละลาย A 16.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 84.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร

5.5 Phosphate buffer pH 7.5 ความเข้มข้น 0.1 M

นำสารละลาย A 5.3 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 94.7 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร

6. Trace metal solution

ประกอบด้วย $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.6	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.4	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.0	กรัม
CaCl_2 anhydrous	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการ ละลายสารแต่ละชนิดให้หมดก่อนที่จะเติมสารอื่นลงไป แล้วจึงปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

ภาคผนวก ก.

การคำนวณที่ใช้ในการทดลอง

1. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของ enzyme activity

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์} = \text{OD (ES-EC-SC)}$$

$$\text{ES} = \text{Enzyme substrate}$$

$$\text{EC} = \text{Enzyme control}$$

$$\text{SC} = \text{Substrate control}$$

เปลี่ยนค่า OD ที่ได้เป็นค่าความเข้มข้น มก./มล. โดยใช้กราฟมาตรฐานสารละลาย mannose

$$\therefore \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์} = X \text{ มก./มล.}$$

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.05 มิลลิลิตร ระยะเวลาการบ่มเอนไซม์ 20 นาที

ถ้าน้ำหนักโมเลกุลของ mannose เท่ากับ 180 กรัม คิดเป็น 1 โมล

$$\text{mannose } 180 \text{ มิลลิกรัม} = 1 \times 10^3 \text{ ไมโครโมล}$$

$$\text{mannose } x \text{ มิลลิกรัม} = X \times 10^3 \text{ ไมโครโมล/20 นาที/0.05}$$

$$180 \text{ มล. เอนไซม์}$$

$$= X \times 10^3 \text{ ไมโครโมล/นาที/มล.}$$

$$180 \times 20 \times 0.05$$

$$= 5.55X \text{ ไมโครโมล/นาที/มล.}$$

$$= 5.55X \text{ หน่วย/มล.}$$

1 หน่วยเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลาย mannan ให้เป็น mannose 1 ไมโครโมล ใน 1 นาที

$$\therefore \text{enzyme activity} = 5.55X \text{ หน่วย/มล.}$$

ตัวอย่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลอง เท่ากับ 0.59 มก./มล.

$$\text{ดังนั้น ค่า enzyme activity} = 0.59 \times 10^3 = 3.311 \text{ หน่วย/มล.เอนไซม์}$$

$$180 \times 20 \times 0.05$$

2. การคำนวณค่า Specific activity

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{enzyme activity (หน่วย/มล.)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)}}$$

ตัวอย่าง เชื้อไอโซเลต KM-1 มีค่าปริมาณโปรตีนที่ได้จากกราฟมาตรฐาน BSA 16.00 ไมโครกรัม การทดลองใช้ crude enzyme 0.50 มล. ค่า enzyme activity เท่ากับ 3.311 หน่วย/มล.

วิธีคำนวณ หาปริมาณโปรตีนใน crude enzyme ปริมาณ 1 มล. $= 16.00 \times \frac{0.50}{0.05} = 32$ ไมโครกรัม

คิดเป็น มก./มล. ได้เท่ากับ 0.032 มก./มล.

$$\begin{aligned} \text{Specific activity} &= \frac{3.311 \text{ (หน่วย/มล.)}}{0.032 \text{ (มก./มล.)}} \\ &= 103.469 \text{ หน่วย/มก.} \end{aligned}$$

หน่วยแอกทิวิตีของเอนไซม์ (อ้างโดย สูดาร์ตัน, 2530)

หน่วยที่แสดงบ่งบอกปริมาณเอนไซม์มีมากมายหลายชนิด แต่ข้อพิเศษของหน่วยเอนไซม์คือ หน่วยเหล่านี้ไม่ใช่หน่วยที่แท้จริงของการซึ่ง ตัว วัด ปริมาณเอนไซม์ แต่จะเป็นรูปแบบบ่งชี้ความแรงฤทธิ์ของเอนไซม์ซึ่งได้จากการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรต หรือการสร้างในเวลาจำกัด โดยทั่วไปปริมาณของสับสเตรตสามารถซึ่งตัวมาในรูปของน้ำหนัก เช่น มิลลิกรัม ไมโครโมล หรือในรูปการเปลี่ยนแปลงของค่า absorbance การเปลี่ยนแปลงความหนืด (viscosity) การเปลี่ยนแปลงปริมาตรของแก๊ส สำหรับสับสเตรตบางชนิด อาจทำไม่ได้ เช่น สับสเตรตตามธรรมชาติของเอนไซม์ในทางเดินอาหาร จึงจำเป็นต้องดูผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นแทน เวลาที่ใช้อาจเป็นวินาที นาทีหรือชั่วโมง เดิมนิยมใช้ชื่อนักวิทยาศาสตร์เจ้าของวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ มาตั้งเป็นหน่วยเอนไซม์ เช่น Somogyi unit, Bodansky unit, King-Armstrong unit, Sigma-Frankel unit, Bessey-Lowry unit เป็นต้น หน่วยเหล่านี้มีปัญหายุ่งยากมากไม่สะดวกต่อการใช้กับเอนไซม์ที่คิดค้นใหม่ๆ

นอกจากนี้แต่ละหน่วยมีความเป็นตัวของตัวเองกล่าวคือ มีคุณสมบัติและสถานะของการวิเคราะห์ประจำตัว จำเป็นต้องมีค่าปกติหรือค่าอ้างอิงสำหรับวิธีการเฉพาะนั้นๆ อีกทั้งก่อนปัญหายุ่งยากในการเปรียบเทียบข้อมูลของแต่ละห้องปฏิบัติการด้วย ปัจจุบันสมาคมชีวเคมีระหว่างประเทศได้ตกลงกันกำหนดหน่วยสากลขึ้นเรียกว่า international unit (IU หรือ U) ซึ่ง

หน่วยสากลนี้หมายถึง “แอกทีวิตีของเอนไซม์ ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของ สับสเตรทหรือการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมล (micromole) ต่อ 1 นาที ภายใต้สภาวะ มาตรฐาน” สำหรับแอกทีวิตีของเอนไซม์ในของเหลวของร่างกาย (biological fluid) เช่น ซีรัม จะอยู่ในรูปของ หน่วยสากลต่อปริมาตรด้วย นั่นคือ 1 ลิตร ดังนั้นหน่วยสากลของเอนไซม์จึง เป็น U/l หรือ mU/ml ซึ่งแท้ที่จริงแล้วทั้ง 2 หน่วยมีค่าเท่ากัน หน่วย U/l เป็นที่นิยมใช้กันมาก กว่า ต่อมาได้มีการเสนอให้ใช้ Katal (Kat) เป็นหน่วยแอกทีวิตีของเอนไซม์โดยกำหนดว่า Katal คือ “แอกทีวิตีของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสับสเตรทหรือการ สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ 1 โมล (mole) ต่อ 1 วินาที ภายใต้สภาวะมาตรฐาน” การเปลี่ยนหน่วย สากลเป็นหน่วย Kat ทำได้ดังนี้คือ

$$\begin{aligned} 1 \text{ U} &= 1 \mu\text{mole/min} \\ &= 10^{-6} \text{ mole/min} \\ &= 10^{-6} \times 10^9 \times 1 \text{ n mole/sec} \\ &\quad 60 \\ &= 16.67 \text{ n mole/sec} \\ &= 16.67 \text{ nKat} \end{aligned}$$

$$\text{เพราะฉะนั้น } 1 \text{ U/l} = 16.67 \text{ nKat/l หรือ } 1 \text{ Kat} = 6 \times 10^7 \text{ U}$$

สำหรับเอนไซม์ที่เตรียมบริสุทธิ์เราสามารถหาปริมาณของเอนไซม์ในรูปของ จำนวนหมุนเวียน (turn over number) ซึ่งเท่ากับจำนวนโมเลกุลของสับสเตรทที่ถูกเปลี่ยนไป เป็นผลิตภัณฑ์ต่อโมเลกุลของเอนไซม์ต่อหน่วยเวลา จำนวนหมุนเวียนของเอนไซม์เป็นค่าแสดง ถึงประสิทธิภาพของเอนไซม์ด้วย นอกจากนี้ในเอนไซม์ที่ยังแยกไม่บริสุทธิ์อาจหาปริมาณใน รูปของ specific activity ซึ่งเป็นหน่วยสากล (U) ต่อมิลลิกรัมของโปรตีนนั้นๆ

อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์เอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งซึ่งกำหนดหน่วยเอนไซม์ นั้นๆ ไว้ ห้ามเปลี่ยนหน่วยของเอนไซม์จากหน่วยหนึ่งไปอีกหน่วยหนึ่งโดยตรง ด้วยการ กำหนดแฟกเตอร์ตัวเลข ทั้งนี้เนื่องจากว่าสภาวะมาตรฐานของแต่ละวิธีไม่เหมือนกัน การ เปลี่ยนหน่วยด้วยการคูณแฟกเตอร์ใดแฟกเตอร์หนึ่ง จะทำให้เกิดข้อผิดพลาดได้มาก จำเป็น ต้องระมัดระวังมาก

3. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลาย

โมล/ลิตรของสารละลาย เป็นการบอกจำนวนโมลของตัวถูกละลายในสารละลาย

1 ลิตร ตัวอย่าง ต้องการเตรียมสารละลาย mannose เข้มข้น 0.05 M จำนวน 5 มิลลิลิตร จะต้องใช้ mannose กี่กรัม (mannose มี MW = 180 กรัม)

วิธีคำนวณ

$$\begin{aligned} \text{โมล/ลิตร} &= \frac{\text{น้ำหนักเนื้อสาร (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโมเลกุล (กรัม)}} \end{aligned}$$

$$\text{น้ำหนักเนื้อสาร} = 0.05 \times 180 = 9 \text{ กรัม}$$

$$\text{ต้องการเตรียม 5 มล.} = (9 \times 5) / 1000 = 0.045 \text{ กรัม}$$

∴ ต้องชั่ง mannose 0.045 กรัม ละลายในน้ำ 5 มล. จะได้ความเข้มข้น 0.05

โมล หรือ 50 มิลลิโมล (1 โมล = 1000 มิลลิโมล)

ต้องการเปลี่ยนความเข้มข้นจากมิลลิโมล (mM) เป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml)

$$= \text{น.น โมเลกุล} \times \text{มิลลิโมล}$$

$$1000$$

$$50 \text{ mM} \quad \text{คิดเป็นก็} \quad \text{มก./มล.}$$

$$= 180 \times 50$$

$$1000$$

$$= 9 \text{ มก./มล.}$$

4. การคำนวณปริมาณไนโตรเจน

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณไนโตรเจน (กรัม)} &= \% \text{ ของสาร} \times \text{ปริมาณ N ในสาร} \\ &\quad \text{น้ำหนักโมเลกุล (MW)} \end{aligned}$$

ตัวอย่าง NaNO_3 0.2% มี ปริมาณไนโตรเจนกี่กรัม

NaNO_3 มีน้ำหนักโมเลกุล 85 กรัม

(Na = 23, N = 14, O = 16)

NaNO_3 มี N อยู่ 1 ∴ น้ำหนักโมเลกุล 14 กรัม

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (กรัม)} = 0.2 \times 14 = 0.033 \text{ กรัม}$$

$$85$$

∴ NaNO_3 0.2% จะมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.03 กรัม

ภาคผนวก ง.

การทำเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน bovine serum albumin และ
สารละลายแมนโนส

1. การทำเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน bovine serum albumin

1.1 เตรียมสารละลาย bovine serum albumin stock โดยชั่ง BSA 0.01 กรัม ใน
น้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตร

1.2 เตรียมสารละลายโปรตีนจาก stock solution ให้มีความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 ถึง
50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ดังตาราง 15

ตาราง 15 การเตรียมสารละลายโปรตีน ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

ความเข้มข้นที่ต้องการ (มิลลิโมล)	ปริมาตรที่นำมาจาก stock solution (ไมโครลิตร)	ปริมาตรของน้ำกลั่นที่ เติม (ไมโครลิตร)
0	0	500
10	100	400
20	200	300
30	300	200
40	400	100
50	500	0

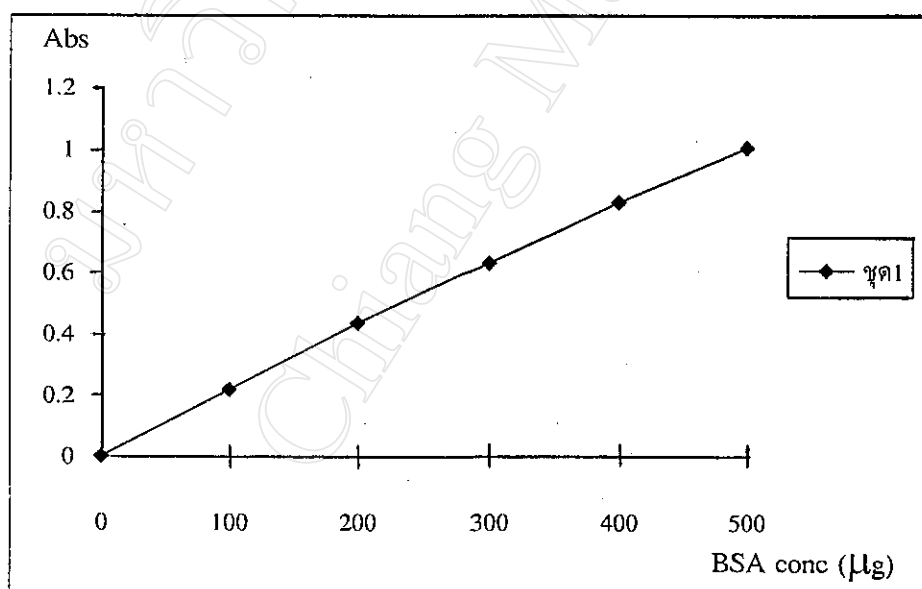
1.3 เติม coomassie brilliant blue G-250 (ภาคผนวก ข.) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร
ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

1.4 นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น

595 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลาย bovine serum albumin นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับแต่ละความเข้มข้น ดังตาราง 16 และภาพ 21

ตาราง 16 ปริมาณโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

Standard No.	BSA conc (μg)	Abs
1	0	0
2	100	0.218
3	200	0.435
4	300	0.631
5	400	0.829
6	500	1.005



ภาพ 21 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน bovine serum albumin

2. การทำเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายแมนโนส

2.1 เตรียม 50 mM mannose stock solution โดยชั่งแมนโนส 0.09 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตร

2.2 เตรียมสารละลายแมนโนสจาก stock solution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5 mM ถึง 50 mM ลงในหลอดทดลอง ดังตาราง 17

ตาราง 17 การเตรียมแมนโนส ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5 mM. ถึง 50 mM. จาก stock solution

ความเข้มข้นที่ต้องการ (mmol)	ปริมาณที่นำมาจาก stock solution (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่นที่เติม (มิลลิลิตร)
0	0	1
2.5	0.05	0.95
5	0.10	0.90
10	0.20	0.80
20	0.40	0.60
40	0.80	2.20
50	1.00	0

2.3 เติม DNS reagent ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด

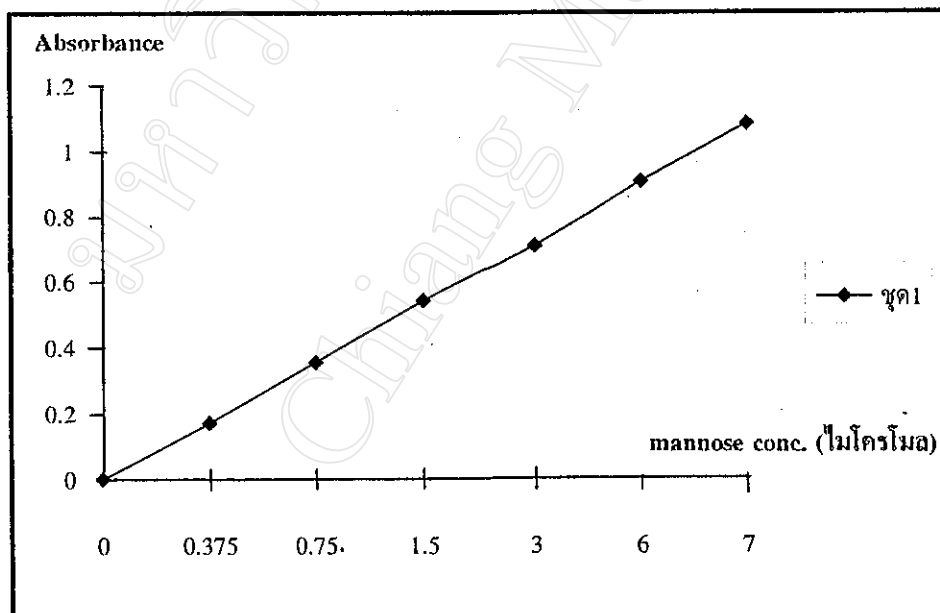
2.4 นำไปต้มน้ำเดือด อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำเย็น

2.5 เติม 40% Na-K-Tartate ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด เขย่าให้เข้ากัน

2.6 นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุมที่ใช้ในน้ำกลั่นแทนสารละลายแมนโนส นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล แมนโนส ดังตาราง 18 และภาพ 22

ตาราง 18 ปริมาณแมนโนสและการดูดกลืนแสงด้วยความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร ที่วัดได้จากวิธี DNS ของ Miller (1959)

Standard No.	mannose conc. (ไมโครโมล)	Abs (นาโนเมตร)
1	0	0
2	0.375	0.170
3	0.750	0.354
4	1.50	0.541
5	3.00	0.708
6	6.00	0.906
7	7.00	1.082



ภาพ 22 กราฟมาตรฐานของสารละลายแมนโนส

วิธีทดสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid ของ Miller

(1959)

1 % LBG + Buffer + crude enzyme
(50 μ l) (50 μ l) (50 μ l)

incubate 50 องศาเซลเซียส, 20 นาที

เติม DNS reagent 2 มล.

ต้ม 100 องศาเซลเซียส, 15 นาที

แช่น้ำเย็นทันที

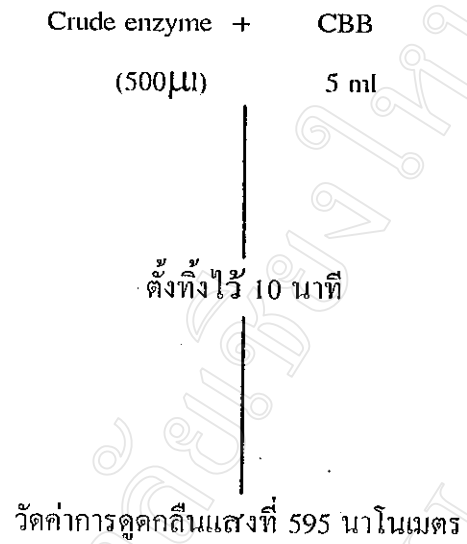
เติม 40 % Na-K-Tartrate 1 มล.

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร

หมายเหตุ : หลอด enzyme control ประกอบด้วย น้ำกลั่น+buffer+crude enzyme

หลอด substrate control ประกอบด้วย น้ำกลั่น+buffer+ 1 % LBG

วิธีทดสอบหาปริมาณโปรตีนโดยใช้ coomassie brilliant blue G-250 (CBB) (อ้าง
โดย Civas, *et al.* 1984)



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางวรางคณา วรรณวงศ์
วันเดือนปีเกิด	16 ตุลาคม 2508
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2527 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนยุพราช ว พ.ศ. 2531 สำเร็จการศึกษา พยาบาลศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2) ว สภากาชาดไทย
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2531 ตำแหน่งพยาบาลประจำการแผนกอายุรกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย พ.ศ. 2532 ตำแหน่งพยาบาลประจำการ แผนกสูติศาสตร์และ นรีเวชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย พ.ศ. 2534 ตำแหน่งประจำการ แผนกหอผู้ป่วยนอก สูติศาสตร์และ นรีเวชกรรม โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ พ.ศ. 2537 ตำแหน่งพยาบาลประจำการ หัวหน้าหอผู้ป่วยรวม โรงพยาบาลเซ็นทรัลเชียงใหม่เมมโมเรียล พ.ศ. 2539 - ปัจจุบัน ตำแหน่งพยาบาลประจำการ แผนกผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลเชียงใหม่-ราม