

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Malt extract Yeast extract Glucose agar : MYG (Ulhoa and Peberdy, 1992)

Yeast extract	2.5 g
Malt extract	5.0 g
Glucose	10.0 g
Agar	17.0 g
Distilled water	1.0 l
pH	7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เป็น 7.0 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/inch² เป็นเวลา 15 นาที

2. Enzyme Production Medium ; EPM (Ulhoa and Peberdy, 1991)

Glucose	3.0 g
Bactopeptone	1.0 g
Urea	0.3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 g
CaCl ₂ · 6H ₂ O	0.3 g
Colloidal chitin	5.0 g
Trace element	0.1% (v/v)
Distilled water	1.0 l
pH	7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เป็น 7.0 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/inch² เป็นเวลา 15 นาที

Trace element (Vyas and Deshpande, 1989)

FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0 g
MnSO ₄ ·2H ₂ O	1.6 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4 g
CoCl ₂ anhydrous	2.0 g
Distilled water	1.0 l

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เป็น 7.0 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/inch² เป็นเวลา 15 นาที

3. Basal medium (Solis-Pereyra *et al.*, 1996)

KH ₂ PO ₄	23.0 g
FeSO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.0 g
Shellfish waste	555.5 g
Distilled water	1.0 l
pH	5.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.0 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/inch² เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นใส่ข้าวโพดหมัก 111.1 g ลงในอาหารหมักแล้วผสมให้เข้ากัน

4. Czapek's solution agar (Raper and Fennell, 1965)

NaNO ₃	3.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
Sucrose	30.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1.0 l

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/ inch² เป็นเวลา 15 นาที

5. Malt extract agar (Raper and Fennell, 1965)

Malt extract	20.0 g
Peptone	1.0 g
Dextrose	20.0 g
Agar	20.0 g
Distilled water	1.0 l

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/inch² เป็นเวลา 15 นาที

6. Chitin agar

K ₂ HPO ₄	0.7 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Peptone	0.3 g
Yeast extract	0.3 g
Colloidal chitin	20.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1.0 l
pH	7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/inch² เป็นเวลา 15 นาที

7. Enrichment medium

Soil sample	40.0 g
K ₂ HPO ₄	0.9 g
NH ₄ NO ₃	2.0 g
Distilled water	1.0 l

10% colloidal chitin หรือ 1% เปลือกกุ้งบด หรือ 10% เปลือกกุ้งบด

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ยกเว้น soil sample ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/inch² เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นใส่ตัวอย่างดิน 40.0 g ลงผสมให้เข้ากันแล้วนำบ่มที่อุณหภูมิห้อง

8. เลือกกุ้งบดและข้าวโพดหมัก

8.1 เลือกกุ้งได้จากร้านอาหารสวนตาล จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งเป็นเลือกกุ้งอบแห้งและบางส่วนได้จากร้านอาหาร ในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นกุ้งสด ต้องนำมาล้างและตากแห้ง บดเลือกกุ้งทั้งหมดด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 10 วินาที 2 ครั้ง เลือกกุ้งบดที่ได้มีลักษณะเป็นเกล็ดละเอียด

8.2 ข้าวโพดหมัก ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ จ.เชียงใหม่ เป็นส่วนของเปลือกและซังข้าวโพด นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 10 วินาที 3-5 ครั้ง ข้าวโพดหมักที่ปั่นแล้วมีลักษณะเป็นฝอย ยาวประมาณ 5-10 cm

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี บัฟเฟอร์ และ reagent

1. Acetate buffer

Stock solution

A: 0.2 M ของสารละลาย acetic acid (11.55 ml ของ glacial acetic acid ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

B: 0.2 M ของสารละลาย sodium acetate (16.4 g ของ $C_2H_3O_2Na$ ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

Working Solution

x ml of A + y ml of B เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม 100 ml

PH	x	y
3.6	46.3	3.7
3.8	44.0	6.0
4.0	41.0	9.0
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.0
5.0	14.8	35.2
5.2	10.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.6	4.8	45.2

2. Phosphate buffer

Stock Solution

A: 0.2 M ของสารละลาย NaH_2PO_4 (27.8 g ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

B: 0.2 M ของสารละลาย Na_2HPO_4 (53.65 g ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

Working Stock

x ml of A + y ml of B เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม 100 ml

pH	X	Y	pH	x	y
5.7	93.5	6.5	6.9	45.0	55.0
5.8	92.0	8.0	7.0	39.0	61.1
5.9	90.0	10.0	7.1	33.0	67.0
6.0	87.7	12.3	7.2	28.0	72.0
6.1	85.0	15.0	7.3	23.0	77.0
6.2	81.5	18.5	7.4	19.0	81.0
6.3	77.5	22.5	7.5	16.0	84.0
6.4	73.5	26.5	7.6	13.0	87.0
6.5	68.5	31.5	7.7	10.5	90.5
6.6	62.5	37.5	7.8	8.5	91.5
6.7	56.5	43.5	7.9	7.0	93.0
6.8	51.0	49.0	8.0	5.3	94.7

3. DNS reagent

ละลาย NaOH 5 g ในน้ำกลั่น 450 ml เติม 3,5-dinitrosalicylic acid 5 g Na_2SO_3 0.25 g และ phenol 1.0 g แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 ml

4. Reagent C

สารละลาย A : NaCO_3 1 g ในสารละลาย 0.4% NaOH 50 ml (NaOH 0.2 g ในน้ำกลั่น 50 ml)

สารละลาย B_1 : 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g ในน้ำกลั่น 2 ml)

สารละลาย B_2 : 2% $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g ในน้ำกลั่น 2 ml)

Reagent C = สารละลาย A : สารละลาย B_1 : สารละลาย B_2 เท่ากับ

50 : 0.5 : 0.5

เก็บสารละลาย A, B_1 , B_2 ในตู้เย็น ก่อนใช้จึงมาผสมเป็น reagent C

5. Folin phenol reagent

สารละลายสีเหลือง ความเข้มข้น 2 N ก่อนใช้นำมาเจือจางในน้ำกลั่น 1 เท่าเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1 N

ภาคผนวก ค**การเตรียม colloidal chitin**

การเตรียม colloidal chitin เพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการวัด activity เตรียมโดยวิธีของ Berger and Reynolds (1958) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ผสม chitin powder 10 g, acetone 20 ml และ HCl (conc.) 200 ml เข้าด้วยกัน โดยทำในอ่างน้ำแข็งในตู้ดูดควัน คนแรง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ 1 คืน ที่ 4 °C
2. กรองด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น โดยเติม 50% ethylalcohol 50 ml เพื่อตกตะกอนไคตินโดยคนแรง ๆ
3. ล้างด้วยน้ำกลั่น และ 1N NaOH จน pH ประมาณ 7.5 เก็บตะกอนส่วนบนไว้นำตะกอนส่วนล่างไปปั่นและปรับ pH ประมาณ 7.5 เก็บใส่ตู้เย็น

ภาคผนวก ง
การทำกราฟมาตรฐาน

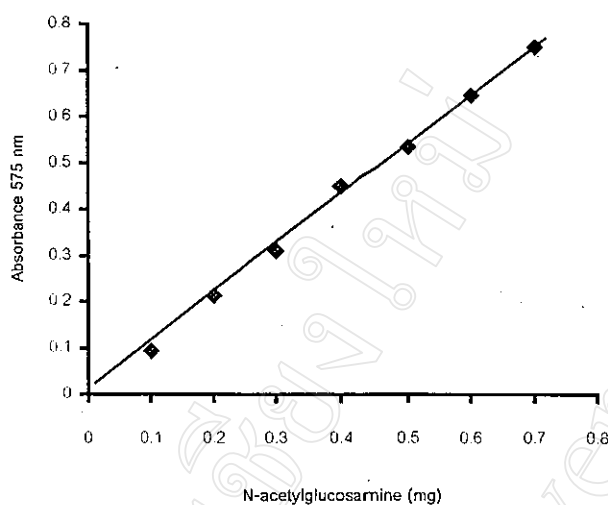
การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetylglucosamine

1. เตรียม working solution ของ N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 1.0 mg/ml โดยชั่ง N-acetylglucosamine 0.1 g ในน้ำ 100 ml
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน N-acetylglucosamine ในหลอดทดลองโดยดูด working solution 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 ml เติมน้ำให้มีปริมาตรรวมแต่ละหลอดเท่ากับ 1.5 ml
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ใน shaking waterbath
4. เติม DNS หลอดละ 2 ml ปิดหลอดด้วยลูกแก้วแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที
5. เติม 40% sodium potassium tartrate หลอดละ 1 ml แล้วทำให้เย็นทันที
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm โดยใช้ น้ำกลั่น เป็น blank ได้ผลดังตารางผนวก 1

ตารางผนวก 1 ค่าการดูดกลืนแสงของ N-acetylglucosamine ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 575 nm

ลำดับที่	N-acetylglucosamine (mg)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0.0	0.00
2	0.1	0.094
3	0.2	0.213
4	0.3	0.311
5	0.4	0.450
6	0.5	0.534
7	0.6	0.646
8	0.7	0.750

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง ปริมาณ N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสง



ภาพผนวก 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetylglucosamine

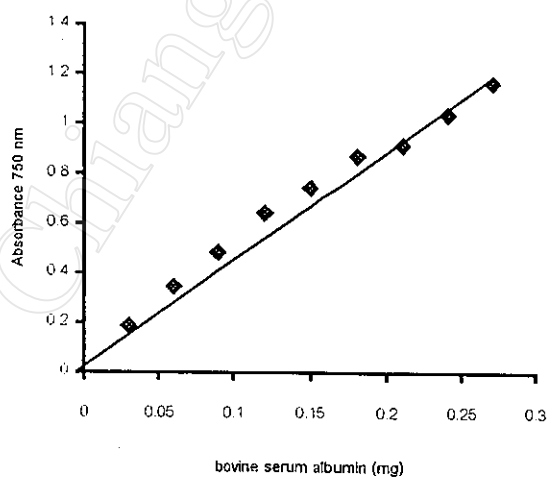
การทำการมาตรฐานของสารละลายโปรตีน bovine serum albumin

1. เตรียม working solution ของ bovine serum albumin ความเข้มข้น 1.0 mg/ml โดยชั่ง bovine serum albumin 0.01 g ในน้ำ 10 ml
 2. เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin ในหลอดทดลอง โดยดูด working solution 0.03, 0.06, 0.09, 0.12, 0.15, 0.18, 0.21, 0.24 และ 0.27 ml เติมน้ำให้มีปริมาตรรวมแต่ละหลอดเท่ากับ 0.3 ml
 3. เติม reagent C 3 ml ลงในแต่ละหลอด ทิ้งไว้ 20 นาที
 4. เติม Folin phenol reagent 0.3 ml ลงในแต่ละหลอดทิ้งไว้ 30 นาที
 5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank
- ได้ผลดังตารางผนวก 2

ตารางผนวก 2 ค่าการดูดกลืนแสงของ bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆที่
ความยาวคลื่น 750 nm

ลำดับที่	ความเข้มข้นโปรตีน (mg)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0.0	0.00
2	0.03	0.186
3	0.06	0.346
4	0.09	0.483
5	0.12	0.643
6	0.15	0.743
7	0.18	0.869
8	0.21	0.913
9	0.24	1.035
10	0.27	1.163

6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง
กับความเข้มข้นโปรตีน



ภาพผนวก 2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin

ภาคผนวก จ

การคำนวณ

1. การคำนวณ unit ของเอนไซม์

หน่วยการทำงานของเอนไซม์ (unit of enzyme)

กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ คือปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการปลดปล่อย N-acetylglucosamine 1 μmol ในเวลา 1 นาที

ปริมาณ N-acetylglucosamine ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงสุทธิ (A) ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย N-acetylglucosamine ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงสุทธิ (A) หาได้ดังนี้

$$A = ES - EC - SC$$

ES, EC, SC คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ enzyme substrate, enzyme control และ substrate control ตามลำดับ

การคำนวณ enzyme activity

สมมติให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเทียบกราฟมาตรฐาน = N mg/ml

ปริมาณ crude extract ที่ใช้ในปฏิกิริยา = 0.5 ml

ระยะเวลาที่ใช้ปัมเอนไซม์ = 30 นาที

มวลโมเลกุลของ N-acetylglucosamine = 221.21

N-acetylglucosamine 221.21 mg = 1 mmol หรือ $10^3 \mu\text{mole}$

N-acetylglucosamine N mg = $10^3 N/221.21 \mu\text{mole}/30 \text{ นาที}/0.5 \text{ ml of extract}$

ในเวลา 1 นาที ปริมาณ crude extract 1 ml จะมี N-acetylglucosamine

$$= 10^3 N/221.21/30/0.5 \mu\text{mole}/\text{นาที}/0.5\text{ml of extract}$$

ดังนั้น enzyme activity = $10^3 N/221.21/30/0.5 \text{ unit/ml extract}$

$$= 0.301 N \text{ unit}$$

การคำนวณ specific activity

specific activity ของเอนไซม์ หมายถึง ค่าอัตราส่วนของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ศึกษาต่อโปรตีนทั้งหมด ถ้าตัวอย่างมีค่า specific activity สูง แสดงว่ามีเอนไซม์ที่สนใจอยู่มากเมื่อเทียบกับโปรตีนทั้งหมด นั่นคือ ตัวอย่างที่มีค่า specific activity สูงจะมีความบริสุทธิ์มากกว่าตัวอย่างที่มีค่า specific activity ต่ำ ซึ่งค่า specific activity คำนวณได้จาก

$$\text{specific activity} = \frac{\text{enzyme activity (unit)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (mg/ml)}}$$

2. การคำนวณปริมาณความชื้นในระบบการหมักในสภาพอาหารแข็งเปลือกกุ้งและข้าวโพดหมัก

คำนวณจากปริมาณของเหลวในอาหารหมักเทียบกับปริมาณของผสมทั้งหมดในระบบ เช่น ปริมาณความชื้น 53.8% คัดจากส่วนที่เป็นของเหลว (spore suspension 4 ml + อาหารพื้นฐาน 3 ml) 7 ml ในของผสมทั้งหมด (เปลือกกุ้งบด 3 g + ข้าวโพดหมัก 3 g + spore suspension 4 ml + อาหารพื้นฐาน 3 ml) 13 ส่วน

ปริมาณของผสม 13 ส่วน มีส่วนที่เป็นของเหลว 7 ml

ปริมาณของผสม 100 ส่วน มีส่วนที่เป็นของเหลว $100 \times \frac{7}{13} = 53.8\%$

13

3. การคำนวณ % spore suspension

คำนวณจากปริมาณ spore suspension ที่ใช้เทียบกับปริมาณของผสมทั้งหมดในระบบ เช่น ปริมาณ spore suspension 30.8% คือปริมาณ spore suspension 4 ml ในอาหารพื้นฐาน 3 ml เปลือกกุ้งบด 3 g และข้าวโพดหมัก 3 g

นั่นคือ ปริมาณของผสม $4+3+3+3 = 13$ ส่วน มี spore suspension 4 ml

ปริมาณของผสม 100 ส่วน มี spore suspension $100 \times \frac{4}{13} \%$

ดังนั้น ปริมาณ spore suspension = 30.8%

หมายเหตุ ที่ปริมาณ spore suspension 4 ml อาจคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ได้แตกต่างกันเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของผสมอื่นในระบบ

ภาคผนวก จ
การเพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์

1. วางแท่งแก้วรูปตัววี สไลด์ และแผ่นแก้วปิดสไลด์ ในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเปล่า อบฆ่าเชื้อที่ 150 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. ใช้มีดตัดชิ้นวุ้นในจานอาหาร Czapek's solution agar หรือ malt extract agar ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส กว้างประมาณ 3 mm วางบนสไลด์ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว
3. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อจาก stock culture และด้านข้างของชิ้นวุ้นทั้ง 4 ด้าน วางแผ่นแก้วปิดสไลด์บนชิ้นวุ้น แล้วใส่สำลีชุบน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารเพื่อให้ความชื้น
4. บ่มเชื้อจนเห็นเส้นใยฟูขึ้นมา
5. เปิดแผ่นแก้วปิดสไลด์ออก เขี่ยชิ้นวุ้นทิ้ง แล้วนำแผ่นแก้วปิดสไลด์และสไลด์มาย้อมด้วย Lactophenol cotton blue ในกรณีที่ไม่มองเห็นเส้นใยและสปอร์ไม่ชัดเจน ถ้าต้องการดูสปอร์ที่แท้จริงของสปอร์ให้ใช้น้ำกลั่นแทน

ภาคผนวก ข
ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางผนวก 3 การผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อรา 5 ไอโซเลทในอาหารหมัก

ไอโซเลท	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
S1-11	26.1	6.1
S1-13	33.2	5.9
S1-15	20.6	4.1
S1-51	16.8	3.0
SC-91	7.1	1.6

ตารางผนวก 4 ชนิดของเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13

ชนิดของเชื้อตั้งต้น	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
spore suspension	33.2	5.9
ชิ้นวุ้น	5.7	0.4

ตารางผนวก 5 ปริมาณ spore suspension ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อรา ไอโซเลท S1-13

ปริมาณ spore suspension (ml)	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
0	0	0
2	36.8	3.9
4	61.0	10.8
6	59.9	10.2
8	47.2	5.5
10	33.9	4.0

ตารางผนวก 6 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนส

ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (วัน)	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
0	0.6	0
1	13.3	11.2
3	30.8	42.9
5	20.3	16.3
7	57.9	31.1
9	60.5	25.0
11	63.9	22.8
13	52.9	19.9

ตารางผนวก 7 อัตราส่วนสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยกำหนดให้ข้าวโพดหมักคงที่ที่ 1 g

อัตราส่วนสับสเตรท เปลือกกุ่มบด: ข้าวโพดหมัก	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
0:1	0	0
1:1	22.6	10.4
2:1	78.6	33.3
3:1	85.4	33.0
4:1	80.0	27.7
5:1	75.7	24.8
6:1	74.6	22.1
7:1	71.5	20.8
8:1	68.4	20.8
9:1	34.2	9.8
10:1	7.3	2.0

ตารางผนวก 8 อัตราส่วนสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยกำหนดให้เปลือกกุ้งบดคงที่ที่ 3 g

อัตราส่วนสับสเตรท เปลือกกุ้งบด: ข้าวโพดหมัก	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
3:0	2.4	0.2
3:1	51.8	4.5
3:2	54.1	4.6
3:3	59.3	4.9
3:4	52.0	4.0
3:5	43.3	4.1
3:6	46.0	3.2

ตารางผนวก 9 ปริมาณอาหารหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13

ปริมาณอาหารหมัก (ml)	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
0	6.2	0.5
1	44.7	4.9
3	78.4	7.4
5	65.8	7.5
7	60.0	5.1
9	59.3	4.9

ตารางผนวก 10 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อรา
ไอโซเลท S1-13

แหล่งไนโตรเจน (0.5%w/v)	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
Control	80.8	2.9
Fermentation medium	96.4	2.5
Peptone	71.2	1.7
Soy bean	85.4	1.7
Urea	59.6	1.0
Yeast extract	71.5	1.3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	139.1	3.7

ตารางผนวก 11 ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท
S1-13

ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%w/v)	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
0	111.6	5.5
0.1	119.2	5.5
0.3	115.6	5.6
0.5	94.4	6.9
0.7	93.3	6.0

ตารางผนวก 12 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13

อุณหภูมิ (°C)	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
อุณหภูมิห้อง (26-28)	119.2	5.5
37	178.9	10.3
45	96.1	7.7

ตารางผนวก 13 pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13

PH	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
4	154.9	9.3
5	184.0	9.8
6	182.8	7.9
7	165.1	5.1
8	151.5	6.7
9	148.9	4.2

ตารางผนวก 14 อิทธิพลของสับสเตรทที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13

สับสเตรท	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
3 g เปลือกกุ้งบด	73.2	7.3
6 g เปลือกกุ้งบด	29.8	2.5
เปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดหมัก 1:1	128.2	13.6
เปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดสด 1:1	122.0	12.0
เปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดหมัก ฆ่าเชื้อ 1:1	127.6	14.6

ตารางผนวก 15 ผลของเวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์โคติเนส

เวลา (นาที)	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
0	0.0	0
10	51.4	3.7
20	89.3	7.4
30	108.2	9.6
40	107.1	9.0
50	97.0	8.9
60	100.6	8.9

ตารางผนวก 16 ผลของอุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์โคติเนส

อุณหภูมิ (°C)	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
30	108.2	9.4
37	122.5	10.5
45	114.8	9.8
55	72.0	5.4

ตารางผนวก 17 ผลของ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โคติเนส

pH	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
4	72.4	4.8
5	110.9	7.2
6	109.5	7.1
7	100.0	7.0
8	67.5	4.1
9	43.2	2.7

ตารางผนวก 18 การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โคติเนสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกับการเพาะเลี้ยงในสภาพของแข็ง

สับสเตรทที่ใช้เพาะเลี้ยง	enzyme activity (mU/ml crude extract)	specific activity (mU/mg protein)
0.5% colloidal chitin ใน อาหาร EPM	32.2	538.2
0.5% เปลือกกุ้งบดใน อาหาร EPM	58.3	314.4
เปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดหมัก (1:1) ในอาหารหมัก	128.2	13.6

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวนพกาญจน์ รัตนกิจ

วัน เดือน ปี เกิด 18 เมษายน 2518

ประวัติการศึกษา ปีการศึกษา 2535 สำเร็จการศึกษาชั้นชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย
โรงเรียนอุดมตรุณี จังหวัดสุโขทัย
ปีการศึกษา 2539 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ที่อยู่ติดต่อได้ 33/1 ถนน ศรีอินทราทิตย์ ตำบลธานี
อ. เมือง จ. สุโขทัย 64000
หมายเลขโทรศัพท์ (055) 613039

e-mail address nopakarn@hotmail.com