

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Basal medium (ชนิกานต์, 2539)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.00	กรัม
KH_2PO_4	0.28	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.07	กรัม
Yeast extract	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เป็น 7.0

2. Chitin agar (Hsu and Lookwood, 1975)

Colloidal chitin	2%	
CaCl_2	0.5	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
NaH_2PO_4	0.5	กรัม
NaNO_3	3.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Agar	17	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เป็น 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3. Chitin overlay plate (COP) (Osawa and Koya, 1995)

ประกอบด้วยอาหาร 2 ส่วนคือ A และ B ปริมาตร 20:10 มิลลิลิตร

A : bromthymol blue 0.005% (ละลายใน NaOH หรือ ethanol ปริมาณเล็กน้อย) และวุ้น 1.5%

B : bromthymol blue 0.005%, colloidal chitin 0.2% และวุ้น 1.5%

เตรียมอาหาร A และ B นำไป autoclave เทอาหาร A ลงในจานอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 20 มล. ทิ้งให้เย็นแข็งตัว แล้วเทอาหาร B ทับ รอจนเย็นแข็งตัว เก็บไว้เป็นอาหารสำหรับตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

4. Enrichment medium

Chitin	1-2	กรัม
K_2HPO_4	0.9	กรัม
NH_4NO_3	1-2	กรัม
Soil	20-30	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน

5. Enzyme production medium (EPM) (Ulhoa and Peberdy, 1991)

Glucose	3.0	กรัม
Bacto peptone	1.0	กรัม
Urea	0.3	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1.4	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3	กรัม
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0.3	กรัม
Colloidal chitin	2%	
Trace element	0.1%	v/v

6. Trace element (Yyas and Deshpande, 1989)

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.0	กรัม
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	1.6	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.4	กรัม
$CoCl_2$ anhydrous	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ละลายส่วนผสมที่ละชนิด เก็บใส่ขวดสีชาเป็น stock solution ในตู้เย็น

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

Yeast extract	2.5	กรัม
Malt extract	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Agar	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ปรับ pH เป็น 7.0 นำไป autoclave เกล่งในงานอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว
ทิ้งให้เย็นแข็งตัว

8. Potato Dextrose agar (PDA)

Potato	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นจนเดือด กรองเอาแต่น้ำ เติมน้ำตาล dextrose และวุ้น แล้วนำไปต้มต่อ
จนเดือด นำไป autoclave

9. อาหารสำหรับศึกษาปริมาณความชื้นของการเพาะเลี้ยง

ส่วนที่ 1

สูตรที่ 1 อาหารที่มีความชื้น 44%

เตรียมโดยชั่งเปลือกกุ้งบด 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล. ไม่
เติมน้ำกลั่น

สูตรที่ 2 อาหารที่มีความชื้น 50%

เตรียมโดยชั่งเปลือกกุ้งบด 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล.
เติมน้ำกลั่น 1 มล.

สูตรที่ 3 อาหารที่มีความชื้น 55%

เตรียมโดยชั่งเปลือกกุ้งบด 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล.
เติมน้ำกลั่น 2 มล.

สูตรที่ 4 อาหารที่มีความชื้น 58%

เตรียมโดยชั่งเปลือกกุ้งบด 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล.

เติมน้ำกลั่น 3 มล.

สูตรที่ 5 อาหารที่มีความชื้น 62%

เตรียมโดยชั่งเปลือกกุ้งบด 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล.

เติมน้ำกลั่น 4 มล.

สูตรที่ 6 อาหารที่มีความชื้น 64%

เตรียมโดยชั่งเปลือกกุ้งบด 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล.

เติมน้ำกลั่น 5 มล.

สูตรที่ 7 อาหารที่มีความชื้น 67%

เตรียมโดยชั่งเปลือกกุ้งบด 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล.

เติมน้ำกลั่น 6 มล.

สูตรที่ 8 อาหารที่มีความชื้น 69%

เตรียมโดยชั่งเปลือกกุ้งบด 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล.

เติมน้ำกลั่น 7 มล.

สูตรที่ 9 อาหารที่มีความชื้น 71%

เตรียมโดยชั่งเปลือกกุ้งบด 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล.

เติมน้ำกลั่น 8 มล.

ส่วนที่ 2

Basal medium

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.00 กรัม

KH_2PO_4 0.28 กรัม

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 กรัม

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.07 กรัม

Yeast extract 1.00 กรัม

น้ำกลั่น 100 มล.

เติมส่วนที่ 2 ลงในขวดรูปชมพู่ที่เตรียม ส่วนที่ 1 ไว้เรียบร้อยแล้วขวดละ 4 มล. ใช้

แท่งแก้วคนผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ตัวอย่างการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นของอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

อาหารแข็งเปลือกกุ้งมีเปลือกกุ้ง 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 6 มล. เติมหาอาหารพื้นฐาน 4 มล.

ดังนั้นจึงมีน้ำหนักเท่ากับ 15 กรัม

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 กรัม มีน้ำอยู่ 10 กรัม

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 กรัม มีน้ำอยู่ $10/15 \times 100 = 66.66$ กรัม

ดังนั้นอาหารแข็งเปลือกกุ้งจึงมีความชื้นเท่ากับ 67 %

10. อาหารสำหรับศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน

อาหารทั้งหมดมี 8 สูตร ดังนี้

- (1) ไม่มีแหล่งไนโตรเจน
- (2) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2% + yeast extract 1%
- (3) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2% โดยน้ำหนักใน basal medium
- (4) NaNO_3 2% โดยน้ำหนักใน basal medium
- (5) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2% โดยน้ำหนักใน basal medium
- (6) Urea 2% โดยน้ำหนักใน basal medium
- (7) Peptone 2% โดยน้ำหนักใน basal medium
- (8) Yeast extract 2% โดยน้ำหนักใน basal medium

ชั่งแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ชนิดละ 0.2 กรัม ยกเว้นสูตรที่ 2 ใช้ yeast extract 0.1 กรัม และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 กรัม ละลายแหล่งไนโตรเจนต่างๆ เหล่านี้ด้วย Basal medium 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย KH_2PO_4 0.28%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25% และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.07% เติมลงในขวดรูปชมพู่ซึ่งมีเปลือกกุ้ง 5 กรัม ใช้แท่งแก้วคนผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

11. อาหารสำหรับศึกษาปริมาณ NaNO_3

อาหารทั้งหมดมี 9 สูตร ดังนี้

- (1) NaNO_3 0% โดยน้ำหนัก (ชุดควบคุม)
- (2) NaNO_3 0.5 % โดยน้ำหนัก
- (3) NaNO_3 1% โดยน้ำหนัก
- (4) NaNO_3 1.5% โดยน้ำหนัก
- (5) NaNO_3 2% โดยน้ำหนัก

- (6) NaNO_3 2.5% โดยน้ำหนัก
 (7) NaNO_3 3% โดยน้ำหนัก
 (8) NaNO_3 3.5% โดยน้ำหนัก
 (9) NaNO_3 4% โดยน้ำหนัก

ซึ่ง NaNO_3 ปริมาณ 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35 และ 0.4 กรัม ละลายใน Basal medium ซึ่งประกอบด้วย KH_2PO_4 0.28%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25% และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.07% ปริมาณ 10 มล. เติมลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งมีเปลือกกุ้ง 5 กรัม ใช้แท่งแก้วคนผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

12. อาหารสำหรับศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน

อาหารทั้งหมดมี 11 สูตร ดังนี้

- (1) ไม่มีแหล่งคาร์บอน
 (2) glucose 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium)
 (3) sucrose 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium)
 (4) mannitol 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium)
 (5) N-acetyl-D-glucosamine 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium)
 (6) chitosan 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium)
 (7) colloidal chitin 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium)
 (8) swollen chitin 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium)
 (9) ball-milled chitin 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium)
 (10) แป้งข้าวเจ้า 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium)
 (11) แป้งมัน 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium)

ละลายแหล่งคาร์บอนต่างๆ ปริมาณ 0.1 กรัม ใน Basal medium (KH_2PO_4 0.28%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.07% และ NaNO_3 2%) 10 มล. เติมลงในขวดรูปชมพู่ ซึ่งมีเปลือกกุ้ง 5 กรัม ใช้แท่งแก้วคนผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

13. อาหารสำหรับศึกษาปริมาณ colloidal chitin

อาหารทั้งหมดมี 9 สูตร ดังนี้

- (1) colloidal chitin 0% โดยน้ำหนัก

(2) colloidal chitin	0.5% โดยน้ำหนัก
(3) colloidal chitin	1.0% โดยน้ำหนัก
(4) colloidal chitin	1.5% โดยน้ำหนัก
(5) colloidal chitin	2.0% โดยน้ำหนัก
(6) colloidal chitin	2.5% โดยน้ำหนัก
(7) colloidal chitin	3.0% โดยน้ำหนัก
(8) colloidal chitin	3.5% โดยน้ำหนัก
(9) colloidal chitin	4.0% โดยน้ำหนัก

ซึ่ง colloidal chitin ปริมาณ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 และ 0.40 กรัม ละลายใน Basal medium (KH_2PO_4 0.28%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.07% และ NaNO_3 2%) 10 มล. เติมลงในขวดรูปชมพู่ที่มีเปลือกกุ้ง 5 กรัม ใช้แท่งแก้วคนผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

14. อาหารสำหรับศึกษา pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน

ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (NH_4PO_4 0.28%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.07%, NaNO_3 2% และ colloidal chitin 1%) ให้เท่ากับ 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 ตามลำดับ ใช้อาหารพื้นฐานที่มี pH ต่างๆ 10 มล. เติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. ซึ่งมีเปลือกกุ้ง 5 กรัม ใช้แท่งแก้วคนผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสับสเตรท

1. Colloidal chitin (Beyer and Reynolds, 1958)

1.1 ละลายผงไคตินในกรดเกลือเข้มข้นผสม acetone ในอัตราส่วน chitin : acetone : conc. HCl เท่ากับ 1:2:20 ที่อุณหภูมิ 10-20°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งค้างคืนที่ 4°C

1.2 กรองด้วยผ้าขาวบาง (4 ชั้น) แยกเอาส่วนตะกอนออก นำส่วนใสเทลงใน 50% ethanol 500 มิลลิลิตร คนอย่างแรง จะเกิดลักษณะแขวนลอย (colloid)

1.3 ล้างส่วนที่เป็น colloid ด้วย 1 N NaOH และน้ำกลั่นจน pH เป็นกลางแบ่งส่วน colloid มาหาคำนวณน้ำหนักแห้ง เก็บในตู้เย็นไว้เป็นสับสเตรท

ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะใช้ Colloidal chitin 1 กรัม ผสมกับ 0.2 M phosphate buffer pH 7 เป็นสับสเตรท

2. swollen chitin (มยุรา, 2539)

2.1 ละลาย ball-milled chitin 20 กรัม ในกรดเกลือเข้มข้น 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.2 เทสารละลายลงในน้ำเย็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จะเกิดตะกอนคล้ายวุ้นลักษณะ colloid ขึ้น

2.3 กรองด้วยเครื่องกรองใยแก้ว เก็บส่วนตะกอน

2.4 ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง ทำให้เย็นลงและแห้งอย่างรวดเร็ว (lyophilized) เก็บในตู้เย็นเพื่อใช้เป็นสับสเตรทต่อไป

ภาคผนวก ก
วิธีเตรียมน้ำยาทดสอบและบัฟเฟอร์

1. DNS reagent (Miller *et. al.* 1959)

NaOH	1%
3,5 dinitrosalicylic acid	1%
Na ₂ SO ₃	0.05%
Phenol	0.2%

ละลาย NaOH 5 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มล. เติม 3,5 dinitrosalicylic acid 5 กรัม คนให้เข้ากัน แล้วเติม Na₂SO₃ 0.25 กรัม คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จึงเติม phenol 1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มล. คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บเป็น stock DNS reagent ในขวดสีชา

2. Sodium potassium tartrate 40% (Miller *et. al.* 1951)

Na-K tartrate	40	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ชั่ง Na-K tartrate 40 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 มล. คนให้ละลาย

3. สารละลายหาปริมาณโปรตีน (Lowry *et. al.* 1951)

3.1 Reagent C

A : NaCO₃ 1 กรัม ในสารละลาย 0.4% NaOH 50 มล. (NaOH 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มล. แล้วเติม NaCO₃ 1 กรัม)

B1 : 1% CuSO₄·5H₂O (CuSO₄·5H₂O 0.02 กรัม ในน้ำกลั่น 2 มล.)

B2 : 2% Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 0.04 กรัม ในน้ำกลั่น 2 มล.)

ใช้ A:B1:B3 อัตราส่วน 50:0.5:0.5 ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.2 Folin reagent 1 M (Phenol reagent)

นำ Folin-Ciocalteus' phenol reagent ของ Merck ที่เก็บในขวดสีชาและควรใช้กระดาษตะกั่วหุ้มเพื่อป้องกันการเสื่อมจากแสงแดด ซึ่งมีความเข้มข้น 2 M เวลาจะใช้ให้นำมาเจือจาง 1 เท่า ด้วยน้ำกลั่นต้องมีการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

4. Sodium chloride 0.85% (ชนิกานต์, 2539)

ชั่ง sodium chloride 8.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มล.

5. Acetate buffer (พลับพลึง, 2541)

Stock solution

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

B : 0.2 M ของสารละลาย sodium acetate (16.4 กรัมของ $C_2H_3O_2Na$ ในน้ำกลั่น 1,000 มล.)

Working solution

A x ml + B y ml เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 100 มล.

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

6. Acetate buffer (พลาบฟิง, 2541)

Stock solution

A : 0.2 M ของสารละลาย Na_2HPO_4 (27.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มล.)

B : 0.2 M ของสารละลาย Na_2HPO_4 (28.39 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มล.)

Working solution

A x ml + B y ml เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 200 มล.

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

ภาคผนวก ง

การทำเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetylglucosamine และโปรตีน

1. การทำเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetylglucosamine (NAG) โดยวิธีของ Miller *et. al.* 1959

1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน N-acetylglucosamine เข้มข้น 0-0.20 มก./มล. ดังตาราง 15

ตาราง 15 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน N-acetylglucosamine เข้มข้น 0-0.02 มก./มล.

ความเข้มข้นที่ต้องการ (มก./มล.)	ปริมาณที่ทำมาจาก stock solution (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่นที่เติม (ไมโครลิตร)
0	0	1,000
0.02	100	900
0.04	200	800
0.06	300	700
0.10	500	500
0.12	600	400
0.14	700	300
0.16	800	200
0.20	1,000	0

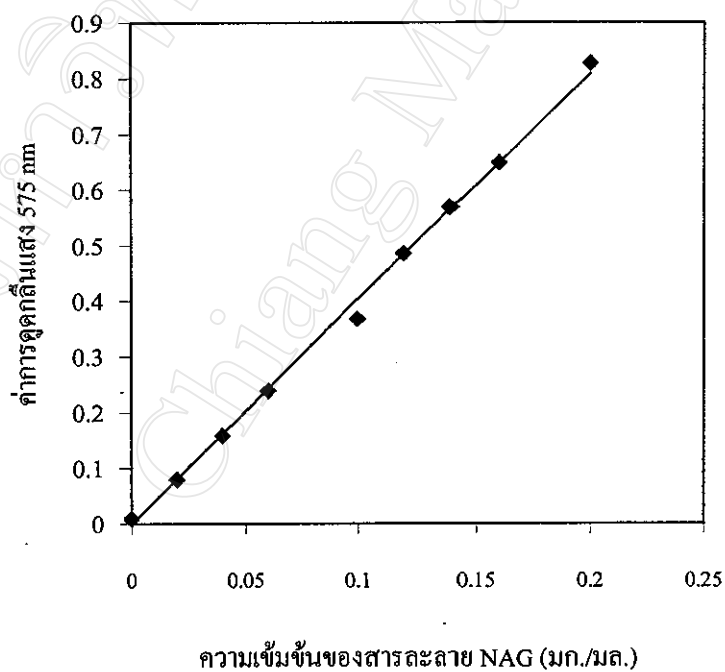
1.2 เติมสารละลาย DNS 2 มล.

1.3 ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นลงทันที

1.4 เติมสารละลาย 40% Na-K-tartrate 1 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank ได้ผลดังตาราง 16

ตาราง 16 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย NAG ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารละลายมาตรฐาน NAG เข้มข้น (มก./มล.)	ค่าการดูดกลืนแสง 575 nm
0	0.009
0.020	0.079
0.040	0.158
0.060	0.239
0.100	0.368
0.120	0.485
0.140	0.568
0.160	0.647
0.200	0.827



ภาพ 21 กราฟมาตรฐาน N-acetylglucosamine

2. การทำเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลาย Bovine serum albumin โดยวิธี Lowry Method (1951)

2.1 เตรียมสารละลาย stock solution เข้มข้น 1000 มก./มล. โดยชั่ง bovine serum albumin 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. แล้วนำมาเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐาน BSA เข้มข้น 0 ถึง 350 มก./มล. ดังตาราง 17

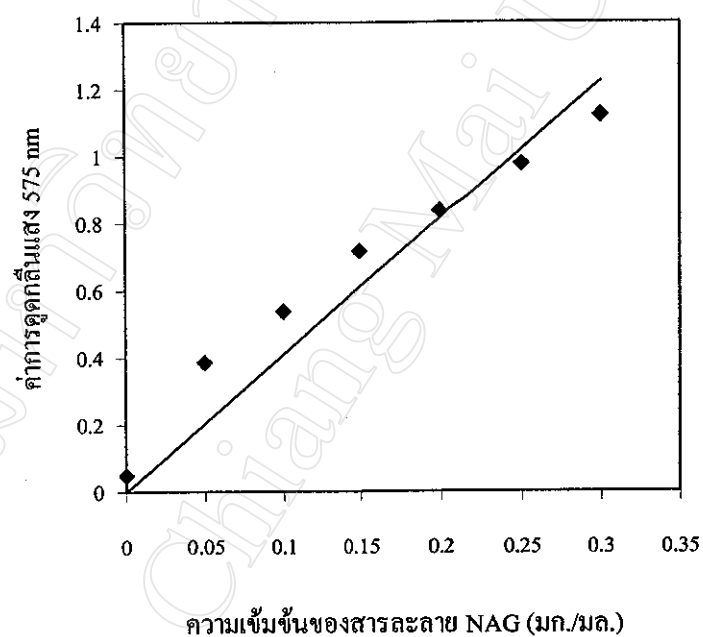
ตาราง 17 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0-350 มก./มล.

ความเข้มข้นที่ต้องการ (มก./มล.)	ปริมาตรที่นำมาจาก stock solution (ไมโครลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่นที่เติม (ไมโครลิตร)
0	0	900
0.050	50	850
0.100	100	800
0.150	150	750
0.200	200	700
0.250	250	650
0.300	300	600

2.2 นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นมา 0.3 มล. เติมสารละลาย reagent C 3 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม phenol 0.3 มล. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ได้ผลดังตาราง 18

ตาราง 18 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารละลาย BSA มาตรฐาน (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง 750 นาโนเมตร
0	0.049
0.050	0.386
0.100	0.537
0.150	0.716
0.200	0.837
0.250	0.976
0.300	1.123



ภาพ 22 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

ภาคผนวก จ
การคำนวณที่ใช้ในการทดลอง

1. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ enzyme activity

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

ES = Enzyme substrate

EC = Enzyme control

SC = Substrate control

เปลี่ยนค่า OD ที่ได้เป็นค่าความเข้มข้น มก./มล. โดยใช้กราฟมาตรฐาน NAG

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

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.3 มล. ระยะเวลาการปฏิกิริยา 30 นาที

$$\text{ถ้าน้ำหนักโมเลกุลของ NAG} = 221.21 \text{ กรัม} = 1 \text{ โมล}$$

$$\text{NAG } 221.21 \text{ มิลลิกรัม} = 1 \times 10^3 \text{ ไมโครโมล}$$

$$\text{NAG } x \text{ มิลลิกรัม} = X \times 10^3 \text{ ไมโครโมล/30 นาที/0.3 มล.เอนไซม์}$$

$$= \frac{X \times 10^3}{221.21 \times 30 \times 0.3} \text{ ไมโครโมล/นาที/มล.}$$

$$= 0.5 X \text{ ไมโครโมล/นาที/มล.}$$

$$= 0.5 \text{ หน่วย/มล.}$$

1 หน่วยเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายไคตินให้เป็น NAG 1 ไมโครโมลใน 1 นาที

$$\text{enzyme activity } 0.5 X \text{ หน่วย/มล}$$

2. การคำนวณปริมาณโปรตีน

เปลี่ยนค่า OD ที่ได้เป็นปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) โดยใช้กราฟมาตรฐาน BSA

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = Y \text{ ไมโครกรัม/มิลลิกรัม}$$

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.3 มิลลิกรัม

$$\text{ดังนั้น ปริมาณโปรตีน} = \frac{Y}{0.3} \text{ ไมโครกรัม/มิลลิกรัม} = \frac{Y}{300} \text{ ไมโครกรัม/มิลลิกรัม}$$

การคำนวณค่า specific activity

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

ภาคผนวก ก การเพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์

1. วางแท่งแก้วรูปตัววี สไลด์ และแผ่นแก้วปิดสไลด์ ในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเปล่า อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 150 °C เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง
2. ใช้มีดตัดชิ้นวุ้นในจานอาหาร Czapek agar ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจตุรัส กว้างประมาณ 3 มม. วางลงบนสไลด์ในข้อ 1
3. ใช้เข็มเย็บเชื้อ เย็บเชื้อราจาก stock culture และด้านข้างของชิ้นวุ้น ทั้ง 4 ด้าน วางแผ่นแก้วปิดสไลด์บนชิ้นวุ้น แล้วใส่สำลีชุบน้ำกลั่น ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารเพื่อให้ความชื้น
4. บ่มเชื้อราไว้จนเห็นเส้นใยฟูขึ้นมา
5. เปิดแผ่นแก้วปิดสไลด์ออก เชื้อชิ้นวุ้นทั้ง 4 ด้าน แล้วนำแผ่นแก้วปิดสไลด์ และสไลด์ที่มีเชื้อราเจริญอยู่มาข้อมด้วย 0.1% acid fuchsin ใน lactophenol (w/v) กรณีที่เส้นใยและสปอร์มองเห็นไม่ชัด หรือใช้ lactophenol ในกรณีที่เส้นใยและสปอร์มีสีเข้ม

ตาราง 19 % saturation ของแอมโมเนียมซัลเฟต

The amount of solid ammonium sulphate to be added in a solution to give the desired final saturation at 0°C.

[illegible]

ภาคผนวก ข

ตารางผลการทดลอง

ตาราง 20 ผลของปริมาณความชื้นของการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตโคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

ปริมาณความชื้น (%)	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity (x10 ⁻³ mU/mg)
44	6.8	3.39
50	6.8	3.42
55	8.7	4.92
58	5.7	3.06
62	5.8	3.23
64	5.8	3.31
67	12.4	7.57
69	5.1	2.85
71	11.9	6.51

ตาราง 21 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตโคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

แหล่งไนโตรเจน	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity (x10 ⁻⁴ mU/mg)
None	26.25	15.34
YE+(NH ₄) ₂ SO ₄	5.37	2.42
(NH ₄) ₂ SO ₄	8.17	3.54
NaNO ₃	23.92	1.28
Peptone	21.25	9.77
Urea	4.12	1.75
Yeast extract	15.90	7.32
(NH ₄) ₂ HPO ₄	7.40	3.68

ตาราง 22 ผลของปริมาณ NaNO_3 ที่มีต่อการผลิตไคตินเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

ปริมาณ NaNO_3 (% ใน BSM)	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-4}$ mU/mg)
0.0	9.5	4.34
0.5	8.5	3.57
1.0	9.3	4.20
1.5	10.1	4.59
2.0	12.9	5.96
2.5	8.3	3.75
3.0	6.6	2.18
3.5	0.0	0.0
4.0	0.0	0.0

ตาราง 23 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไคตินเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

แหล่งคาร์บอน	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-4}$ mU/mg)
None	11.8	5.01
Glucose	1.3	0.45
Sucrose	0.0	0.00
Manitol	0.5	0.23
NAG	1.4	0.61
Chitosan	20.6	9.54
Swollen chitin	27.1	5.75
Colloidal chitin	3.0	1.90
Ball-milled chitin	3.9	3.15
แป้งข้าวเจ้า	6.2	2.97
แป้งมัน	0.0	0.00

ตาราง 24 ผลของปริมาณ colloidal chitin ที่มีต่อการผลิตไคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

ปริมาณ colloidal chitin (% ใน BSM)	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-4}$ mU/mg)
0.0	12.05	6.39
0.5	16.00	7.94
1.0	16.95	10.58
1.5	11.30	6.38
2.0	9.75	5.42
2.5	5.30	3.84
3.0	5.30	2.94
3.5	5.20	2.85
4.0	4.20	2.11

ตาราง 25 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄₄ ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งเพื่อผลิตไคติเนส

อุณหภูมิ (°C)	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-4}$ mU/mg)
20	9.20	10.19
RT 28 $\pm$ 2	16.3	6.64
30	7.65	6.53
37	5.45	3.57
45	2.6	1.46

ตาราง 26 ผลของ pH เริ่มต้นของ BSM ที่มีต่อการผลิตโคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

PH เริ่มต้นของ BSM	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-4}$ mU/mg)
4.0	16.0	10.13
4.5	13.3	7.20
5.0	18.0	10.15
5.5	9.8	6.01
6.0	3.9	2.29
6.5	11.8	7.63
7.0	16.0	13.72
7.5	13.1	8.82
8.0	2.95	1.89

ตาราง 27 ผลของชนิดของสารสกัดที่มีต่อการผลิตโคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

สารสกัด	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-4}$ mU/mg)
Phosphate buffer pH 7	25.0	14.11
Phosphate buffer pH 8	22.5	2.50
Acetate buffer pH 5	1.0	0.10
NaCl 0.85%	1.0	0.10
น้ำกลั่น	0.0	0.00

ตาราง 28 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อการผลิตโคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

เวลา (hr.)	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-4}$ mU/mg)
1	25.5	3.44
6	24.5	2.40
24	23.5	7.83

ตาราง 29 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่มีต่อการผลิตโคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

เวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-4}$ mU/mg)
4	0.0	0.00
6	5.8	3.23
8	5.1	2.85
10	8.7	4.92
12	22.6	13.58
14	18.7	16.70
16	34.5	14.50
18	10.4	6.38
20	11.6	6.63

ตาราง 30 ชนิดของเชื้อตั้งต้นที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง *Basipetospora* sp CK₄₄ เพื่อผลิตโคติเนส

ชนิด inoculum	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity (x10 ⁻⁴ mU/mg)
1. Spore suspension จากอาหารวุ้นเลี้ยง PDA อายุ 3 วัน 1 มล.	8.7	4.92
2. Spore suspension จากอาหารวุ้นเลี้ยง PDA อายุ 5 วัน 1 มล.	11.3	12.71
3. Spore suspension จากอาหารวุ้นเลี้ยง PDA อายุ 7 วัน 1 มล.	26.3	22.61
4. Spore suspension จากอาหารวุ้นเลี้ยง PDA อายุ 9 วัน 1 มล.	16.3	10.19
5. เชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเหลว EMP 1 มล.	13.9	7.26
6. เชื้อที่เลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง 15 วัน 1 กรัม	5.5	3.57
7. อาหารแข็ง→dried→บด→เติมน้ำ→นำมา 1 มล.	7.7	6.57
8. อาหารแข็ง→dried→บด→นำมา 1 กรัม	2.6	1.46

ตาราง 31 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสัณฐานที่มีต่อการทำงานของโคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

อุณหภูมิ (°C)	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity (x10 ⁻⁴ mU/mg)
30	12.5	1.20
37	24.5	2.57
40	27.5	2.08
45	23.5	1.70
50	24.5	4.28
55	20.5	1.05

ตาราง 32 ผลของระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 40 °C ที่มีต่อการทำงานของไคติเนสจาก *Basipetospora* sp CK₄₄

เวลา (นาทีก)	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity (x10 ⁻⁴ mU/mg)
0	2.6	0.13
10	4.5	0.24
20	16.3	0.87
30	28.5	1.52
40	27.5	1.46
50	28.0	1.49
60	26.3	1.40

ตาราง 33 ผลของ pH ที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่มีต่อการทำงานของไคติเนสจาก *Basipetospora* sp CK₄₄

pH เริ่มต้นของ BSM	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity (x10 ⁻⁴ mU/mg)
4.0	16.0	8.54
4.5	28.0	14.94
5.0	36.5	19.48
5.5	28.6	15.26
6.0	22.5	12.01
6.5	18.65	9.63
7.0	20.05	9.95
7.5	19.05	10.70
8.0	13.9	7.42

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวนารีลักษณ์ นากแก้ว
วัน เดือน ปีเกิด	1 ธันวาคม 2516
ประวัติการศึกษา	ปีการศึกษา 2534 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเฉลิมขวัญสตรี จังหวัดพิษณุโลก ปีการศึกษา 2538 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 100/75 หมู่ 5 ตำบลพลายชุมพล อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000 โทรศัพท์ (055) 249103