

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Enrichment medium

KH_2PO_4	3.0	g
K_2HPO_4	1.0	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.7	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4	g
NaCl	0.5	g
CaCl_2	0.5	g
Yeast extract	0.5	g
Bacto peptone	0.5	g
Collidal chitin	5	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ละลายส่วนผสมต่าง ๆ ให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 lb/inch²
อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15 นาที

2. Chitin agar

KH_2PO_4	3.0	g
K_2HPO_4	1.0	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.7	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4	g
NaCl	0.5	g
CaCl_2	0.5	g
Yeast extract	0.5	g
Peptone	0.5	g
Collidal chitin	5.0	g
Agar	15.0	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้เป็น 5.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ ความดัน 15 lb/inch² อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Agar	15	g

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยความร้อน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ ความดัน 15 lb/inch² อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

4. Potato dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	g
Glucose	20	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

หั่นมันฝรั่งเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าชิ้นเล็ก ๆ นำไปต้มเป็นเวลา 15 นาที กรองเอาแต่น้ำผสมกับ วุ้น ต้มให้วุ้นละลายแล้วเติมกลูโคส คนให้ละลายแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/inch² เป็นเวลา 15 นาที

5. Enzyme production medium (EPM)

Glucose	3.0	g
Bacto peptone	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 ·2H ₂ O	0.13	g
Colloidal chitin	20.0	g
Trace element	0.1%	v/v

Trace element solution

FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0	g
MnSO ₄ ·2H ₂ O	1.6	g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4	g

ภาคผนวก ข

การเตรียม colloidal chitin จากเปลือกกุ้ง (อ้างโดย ศิริลักษณ์, 2542)

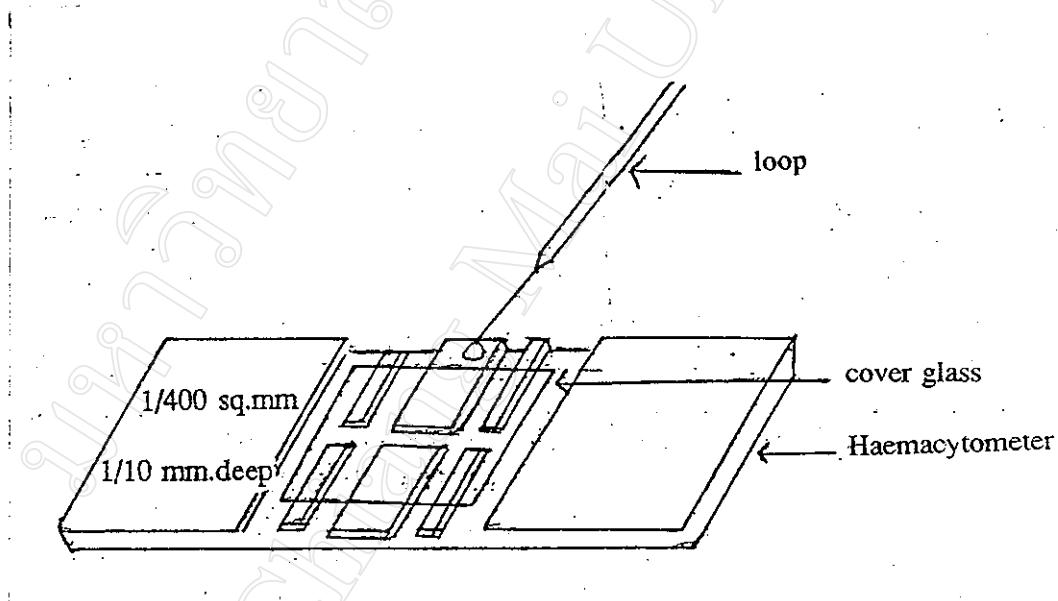
1. ละลายเปลือกกุ้งบดในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นกับอะซีโตน (ทำภายในตู้ดูดควัน) อัตราส่วนเปลือกกุ้งบด : กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น : อะซีโตน 1 : 2 : 20 ในอ่างน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 10-20°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยต้องกวนตลอดเวลา จากนั้นตั้งทิ้งไว้ค้างคืนที่ 4°C
2. นำส่วนผสมในข้อ 1 มากรองด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น เทส่วนใสที่ได้ในสารละลายเอธานอล ความเข้มข้น 50% ปริมาตร 500 ml
3. ล้างส่วนตะกอนด้วยน้ำกลั่นและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1N จนเป็นกลาง นำไปปั่นเพื่อเก็บส่วนที่เป็นตะกอนเพื่อใช้เป็นสับสเตรทต่อไป

ภาคผนวก ก

การเตรียม cell suspension ของเชื้อราและ spore suspension ของแบคทีเรีย

การคำนวณสปอร์ของเชื้อราโดยการตรวจนับด้วย Haemocytometer (กัญญา, 2539 และ ศิริลักษณ์, 2542)

การใช้ Haemocytometer ในการนับจำนวนสปอร์จาก spore suspension เพื่อจะได้ปรับให้ได้ความเข้มข้นตามกำหนด Haemocytometer มีลักษณะคล้ายสไลด์แต่หนากว่า ตรงกลางมีร่องเป็นรูปตัว H ทำให้บริเวณที่ขีดเป็น scale ไว้ใช้ในการนับ 2 บริเวณใกล้ๆ บริเวณ scale จะมีแนวยาวใช้พอง cover glass ให้สูงจาก scale



รูป 14 การใช้งาน Haemocytometer

วิธีใช้ปิด cover glass ให้คลุม scale ทั้งสอง จากนั้นใช้ loop จุ่มลงใน spore suspension ที่เขย่าจนเข้ากันดีแล้ว และ loop ตรงบริเวณขอบสไลด์ทั้งสองด้าน spore suspension จะซึมเข้าไปจนเต็มบริเวณ scale ทั้งสอง อย่าใช้ dropper ในการย้าย spore suspension มาใส่เพราะจะได้ spore suspension มากเกินไป และไหลลงช่องข้าง scale ซึ่งจะพาเอาสปอร์ไปด้วย ทำให้สปอร์ที่นับได้

ไม่ตรงตามความเป็นจริง เมื่อใส่ spore suspension แล้วทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้สปอร์นอน
กันก่อนจึงนับจำนวน

$$\begin{aligned}
 \text{ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก)} &= 0.1 \text{ mm}^3 \\
 \text{สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องใหญ่} &= X \text{ เซลล์} \\
 \text{สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก} &= Y \text{ เซลล์ } (X = 16Y) \\
 \text{ใน } 0.1 \text{ mm}^3 \text{ มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด} &= X \times 25 \text{ หรือ } Y \times 16 \times 25 \text{ เซลล์} \\
 \text{ใน } 1 \text{ mm}^3 \text{ มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด} &= X \times 25 \times 10 \text{ หรือ } Y \times 16 \times 25 \times 10 \text{ เซลล์} \\
 \text{ใน } 1 \text{ ml มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด} &= X \times 25 \times 10 \times 10^3 \text{ เซลล์} \\
 &\text{หรือ } Y \times 16 \times 25 \times 10 \times 10^3 \text{ เซลล์} \\
 &= 25X \times 10^4 \text{ หรือ } 4Y \times 10^6 \text{ เซลล์}
 \end{aligned}$$

เพราะฉะนั้น 1 ml มีจำนวนเซลล์เท่ากับ $25X \times 10^4$ เซลล์

การเตรียม BaSO_4 standard หรือ McFarland เบอร์ต่าง ๆ สำหรับแบคทีเรีย

ส่วนผสมของ 0.048M BaCl_2 (1.175% w/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

และ 0.36M H_2SO_4 (1% v/v)

ตาราง 10 เปรียบเทียบความขุ่นของ McFarland เบอร์ต่าง ๆ กับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย

Tube	No.										
	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Barium Chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Approx. cell density (x10 ⁸ /ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

ผสม 0.048M BaCl_2 และ 0.36M H_2SO_4 ตามอัตราส่วนที่กำหนด เก็บไว้ในหลอดฝาเกลียว
ขนาด 16x150 mm เมื่อต้องการใช้ให้เขย่าหลอดจะเกิดความขุ่นเทียบได้กับ McFarland เบอร์ต่าง ๆ

ภาคผนวก ง
การเตรียมสารเคมี บัฟเฟอร์ และ reagent

1. Phosphate buffer (Colowic and Kaplan, 1955)

Stock Solutions

A: 0.2 M ของสารละลาย monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4 27.8 g ในน้ำกลั่น 1000 ml)

B: 0.2 M ของสารละลาย dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 g หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่น 1000 ml)

x มล. ของ A + y มล. ของ B เจือจางจนได้ปริมาตรรวม 200 ml

ตาราง 11 Phosphate buffer

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	61.0	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

2. DNS reagent

NaOH	1%
3,5 dinitrosalicylic acid	1%
Na ₂ CO ₃	0.05%
Phenol	0.2%
Sodium potassium tartrate	40%

ละลาย NaOH 5 g ในน้ำกลั่น 450 ml เติม 3,5 dinitrosalicylic acid 5 g คนให้ละลายแล้ว เติม Na₂CO₃ 0.25 g คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม Phenol 1 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml เก็บเป็น stock DNS ในขวดสีชา

ส่วนสารละลาย sodium potassium tartrate 40 เปอร์เซ็นต์ ให้เตรียมไว้ต่างหาก โดยชั่ง sodium potassium tartrate 40 g เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 ml

3. Reagent C

สารละลาย A : ชั่ง Na₂CO₃ 1 g ใส่ลงไปในสารละลาย NaOH 0.4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ml (NaOH 0.2 g ในน้ำกลั่น 50 ml)

สารละลาย B₁ : 1% CuSO₄ · 5H₂O (CuSO₄ · 5H₂O 0.02 g ในน้ำกลั่น 2 ml)

สารละลาย B₂ : 2% Na₂HC₆H₅O₇ · 1/5H₂O (Na₂HC₆H₅O₇ · 1.5H₂O 0.04 g ในน้ำกลั่น 2 ml)

reagent C = สารละลาย A : สารละลาย B₁ : สารละลาย B₂ ในอัตราส่วน 50 : 0.5 : 0.5

เก็บสารละลาย A, B₁, B₂ ในตู้เย็น ก่อนใช้จึงมาผสมเป็น reagent C

4. Folin phenol reagent

1N Phenol : เจือจาง Folin ciocateu's phenol reagent ด้วยน้ำกลั่น อัตราส่วน 1 : 1

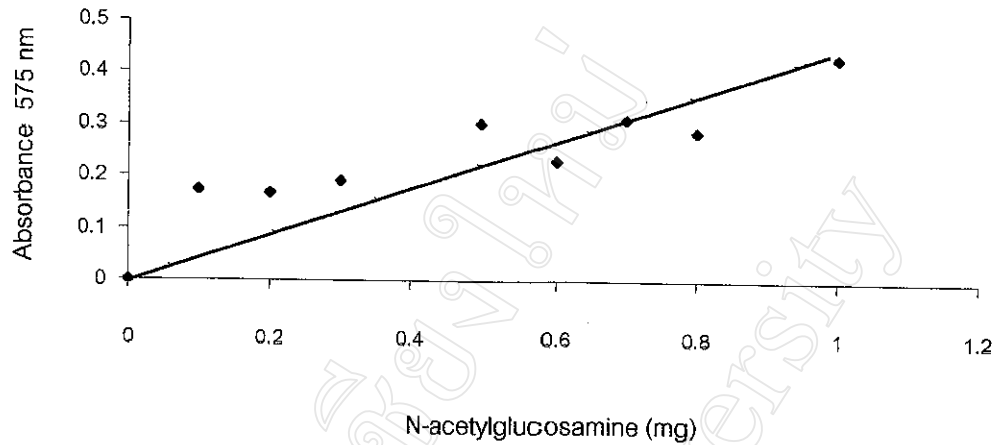
ภาคผนวก จ
การทำการฟมาตรฐาน

การทำการฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetylglucosamine (NAG)

1. เตรียม working solution ของ N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 1.0 mg/ml โดยชั่ง N-acetylglucosamine 0.1 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน N-acetylglucosamine ในหลอดทดลองโดยดูด working solution 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1.0 ml เติมน้ำให้มีปริมาตรรวมแต่ละหลอดเท่ากับ 1.3 ml
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาทีในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
4. เติม DNS หลอดละ 2 ml ปิดหลอดด้วยลูกแก้วแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที
5. เติม 40% sodium potassium tartrate หลอดละ 1 ml ทำให้เย็นทันที
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank ได้ผลดังตาราง 12

ตาราง 12 ค่าการดูดกลืนแสงของ N-acetylglucosamine ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 575 nm

N-acetylglucosamine (mg)	ค่าการดูดกลืนแสง
0.0	0.000
0.1	0.173
0.2	0.169
0.3	0.191
0.5	0.303
0.6	0.231
0.7	0.311
0.8	0.288
1.0	0.431



รูป 15 กราฟมาตรฐาน N-acetylglucosamine (NAG)

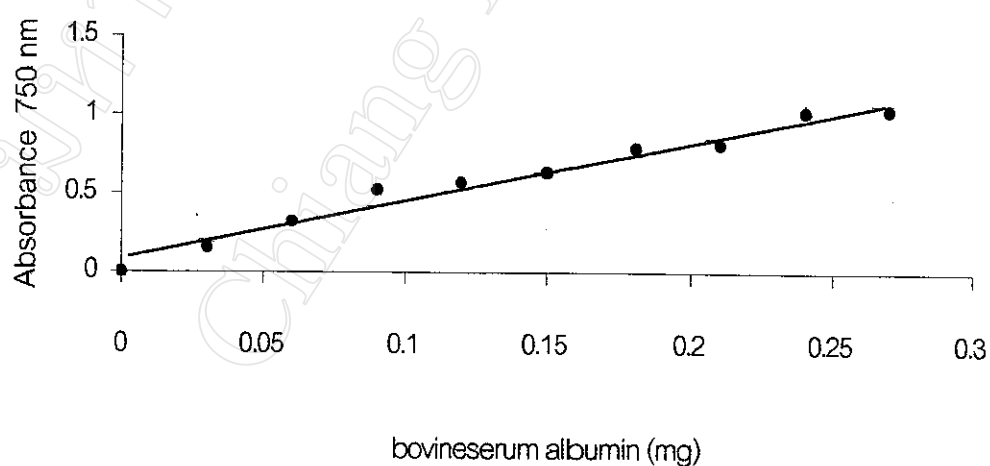
การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน bovine serum albumin

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 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
4. เติม Folin phenol reagent 0.3 ml ลงในแต่ละหลอดทิ้งไว้ 30 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank ได้ผลดัง

ตาราง 13

ตาราง 13 ค่าการดูดกลืนแสงของ bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 750 nm

ความเข้มข้น โปรตีน (mg)	ค่าการดูดกลืนแสง
0.0	0.00
0.03	0.157
0.06	0.318
0.09	0.523
0.12	0.569
0.15	0.634
0.18	0.791
0.21	0.813
0.24	1.022
0.27	1.034



รูป 16 กราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

ภาคผนวก จ

การคำนวณ

1. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ chitinase activity

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ = OD (ES-EC-SC)

เมื่อ

ES = Enzyme substrate

EC = Enzyme control

SC = Substrate control

เปลี่ยนค่า OD ที่ได้เป็นปริมาณเนื้อสาร (mg) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน NAG

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ x mg

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.3 mg ระยะเวลาการบ่มเอนไซม์ 30 นาที

น้ำหนักโมเลกุลของ NAG = 221.21 = 1 mole

NAG 221.21 mg = 1×10^3 μ mole

NAG x mg = $\frac{X \times 10^3}{221.21}$ μ mole / 30 นาที / เอนไซม์ 0.3 ml

221.21

= $\frac{X \times 10^3}{221.21}$ μ mole / นาที / ml

221.21 x 30 x 0.3

กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ คือปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการปลดปล่อย

N-acetylglucosamine 1 μ mol ในเวลา 1 นาที

ดังนั้น chitinase activity = $\frac{X \times 10^3}{221.21 \times 30 \times 0.3}$ unit/ml

221.21 x 30 x 0.3

= 0.502 X unit/ml

2. การคำนวณปริมาณโปรตีน

เปลี่ยนค่า OD ที่ได้เป็นปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน (μ g/ml) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ฐาน BSA

ปริมาณโปรตีน = Y μ g/ml

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.3 ml

$$\begin{aligned}\text{ดังนั้น ปริมาณ โปรตีน} &= \frac{Y}{0.3} \mu\text{g/ml} \\ &= \frac{Y}{300} \text{mg/ml}\end{aligned}$$

3. การคำนวณค่า specific activity

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

specific activity ของเอนไซม์ หมายถึง ค่าอัตราส่วนของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ศึกษาต่อโปรตีนทั้งหมด ถ้าตัวอย่างมีค่า specific activity สูง แสดงว่ามีเอนไซม์ที่สนใจอยู่มากเมื่อเทียบกับโปรตีนทั้งหมด นั่นคือ ตัวอย่างที่มีค่า specific activity สูง จะมีความบริสุทธิ์มากกว่าตัวอย่างที่มีค่า specific activity ต่ำ

ภาคผนวก ข
การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ตาราง 14 เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต

		Final concentration of ammonium sulfate, % saturation																	
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
Initial concentration of ammonium sulfate, % saturation	Grams solid ammonium sulfate of be added to 1 l. of solution																		
	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767	
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694	
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619	
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583	
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546	
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522	
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506	
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469	
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431	
	50										33	66	101	137	176	214	302	392	
	55											33	67	103	141	179	264	353	
	60												34	69	105	143	227	314	
	65													34	70	107	190	275	
	70														35	72	153	237	
	75															36	115	198	
	80																77	157	
90																	79		

ที่มา: Colowick and Kaplan (1955)

ภาคผนวก ข
การเพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์

1. วางแท่งแก้วรูปตัววี สไลด์ และแผ่นแก้วปิดสไลด์ในงานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเปล่า อบฆ่าเชื้อที่ 150°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. ใช้มีดจุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อ รอให้เย็นสักครู่จึงตัดอาหาร Czapek's solution agar ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส กว้างประมาณ 3 มม. วางบนสไลด์ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว
3. ใช้เข็มเย็บเชื้อเย็บเชื้อจาก stock culture และด้านข้างของชิ้นวุ้นทั้ง 4 ด้าน วางแผ่นแก้วปิดสไลด์บนชิ้นวุ้นแล้วใช้ตำลึงชุบน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในงานอาหารเพื่อให้ความชื้น
4. บ่มเชื้อจนเห็นเส้นใยฟูขึ้นมา
5. เปิดแผ่นแก้วปิดสไลด์ออก เย็บชิ้นวุ้นทิ้ง แล้วนำแผ่นแก้วปิดสไลด์และสไลด์มาย้อมด้วย Lactophenol cotton blue ในกรณีที่ไม่มองเห็นเส้นใยและสปอร์ไม่ชัดเจน ถ้าต้องการดูสปอร์ที่แท้จริงของสปอร์ให้ใช้น้ำกลั่นแทน

ภาคผนวก ณ
การเตรียมสีย้อม

1. Lactophenol

Lactic acid	100	ml
Phenol	100	g
Glycerol	200	ml
น้ำกลั่น	100	ml

ละลาย Phenol ในน้ำโดยไม่ต้องให้ความร้อน จากนั้นเติม lactic acid และ glycerol ลงไป คนให้ละลาย

2. Lactophenol cotton blue

Cotton blue	0.02	g
Lactic acid	10	ml
Glycerol	10	ml
Phenol	10	g
น้ำกลั่น	100	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวศิริลาภา สมนามิตร

วัน เดือน ปี เกิด 13 เมษายน 2519

ประวัติการศึกษา ปีการศึกษา 2536 สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียน
คาราวินวิทยลัย จังหวัดเชียงใหม่
ปีการศึกษา 2539 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุล
ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ที่อยู่ติดต่อได้ 328 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-ลำพูน ต.หนองผึ้ง อ.สารภี จ.เชียงใหม่ 50140
หมายเลขโทรศัพท์ 053-322331

e-mail address crazyfava@hotmail.com