ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Basal medium (ชนิกานต์, 2539)

$(NH_4)_2SO_4$	2.00	กรัม
KH_2PO_4	0.28	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.07	กรัม
Yeast extract	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2. Chitin agar (Otakara *et.al.*, 1958)

เปลือกกุ้งป่น	1%	
$CaCl_2$	0.5	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
NaH_2PO_4	0.5	กรัม
$NaNO_3$	3.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Agar	20%	
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

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

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

Colloidal chitin	0.5%	
Glucose	3.0	กรัม
Bacto peptone	1.0	กรัม
Urea	0.3	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

$(NH4)_2SO_4$	1.4	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3	กรัม
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0.5	กรัม
Trace element	0.1%	w/v

4. Trace element (Yyas and Deshpande, 1984)

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	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	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทีละชนิด เก็บใส่ขวดสีชาเป็น stock solution ในตู้เย็น

5. Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
Agar	20%	
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี บัฟเฟอร์ และ Reagent

1. phosphate buffer (Gomori, 1955)

   Stock solution

   A : 0.7 M of NaH_2PO_4 (27.8 g ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

   B : 0.2 M of Na_2HPO_4 (53.65 g ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

   Working stock

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

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	39.30	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

2. DNS reagent (Miller, 1959)

NaOH	1%
3,5-dinitrosalicylic acid	1%
Na_2SO_3	0.05%
Phenol	0.2%

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ละลาย NaOH 5 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติม 3,5-dinitrosalicylic acid 5 กรัม คนให้ละลาย แล้วเติม Na_2SO_3 0.23 กรัม คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติม phenol 1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บเป็น stock DNS ในขวดสีชา ส่วนสารละลาย sodium potassium tartrate 40% ให้เตรียมไว้ต่างหาก (Na-K tartrate 40 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร คนให้ละลาย

3. Reagent C

สารละลาย A : $NaCO_3$ 1 กรัม ในสารละลาย 0.4% NaOH 50 มิลลิลิตร (NaOH 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร)

สารละลาย B_1 : 1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02 กรัม ในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร)

สารละลาย B_2 : 2% $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 0.04 กรัม ในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร)

Reagent C : สารละลาย A : สารละลาย B_1 : สารละลาย B_2 50 : 0.5 : 0.5

4. Folin phenol reagent

สารละลายสีเหลือง ความเข้มข้น 2 N ก่อนนำมาใช้เจือจางในน้ำกลั่น 1 เท่าเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1 N

ภาคผนวก ค

การเตรียมสับสเตรท

Colloidal chitin (มธุรส , 2543)

Shrimp shells (10 กรัม) + 20 มิลลิลิตร Acetone + 200 มิลลิลิตรของ HCl เข้มข้น

↓

กวนตลอดเวลาในอ่างน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

↓

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

กรองผ่านผ้าขาวบาง 2-3 ชั้น ลงใน 600 มิลลิลิตรของ 50% ethanol ที่กวนตลอดเวลา

↓

ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง

↓

ปรับ pH จนได้ 7.0 แล้วตกตะกอนเก็บส่วนตะกอนเป็น colloidal chitin

↓

นำตะกอน colloidal chitin ที่ได้มาทำการดึงเกลือ(NaOH ที่ใช้ในการปรับ pH)
โดยวิธีไดอะไลซีสโดยใช้น้ำกลั่น

↓

เปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 5-6 ชั่วโมงพร้อมกับวัด pH ของ colloidal chitin จนได้
pH เท่ากับ 7.0 จึงเก็บ colloidal chitin มาใช้เป็นสับสเตรท

ภาคผนวก ง

การทำกราฟมาตรฐาน

1. เตรียม working solution ของ N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 1.0 mg/ml โดยชั่ง N-acetylglucosamine 0.1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน N-acetylglucosamine ในหลอดทดลองโดยดูด working solution 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 มิลลิลิตร เติมน้ำให้มีปริมาตรรวมแต่ละหลอดเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร

3. นำสารละลายมาตรฐานไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีใน shaking water bath

4. เติม DNS หลอดละ 2 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยลูกแก้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที

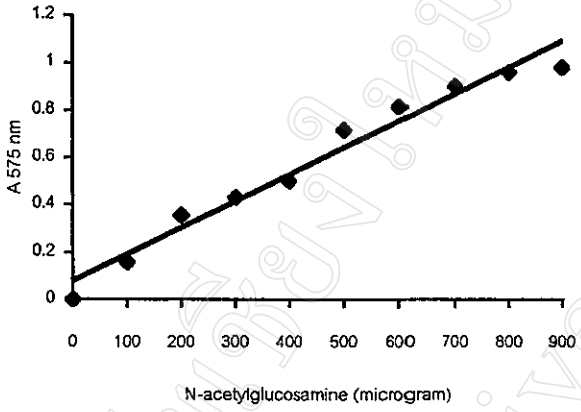
5. เติม 40% sodium potassium tartrate หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วทำให้เย็นทันที

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank (ตาราง 40)

ตาราง 40 ค่าการดูดกลืนแสงของ N-acetylglucosamine ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร

ลำดับที่	N-acetylglucosamine (µg)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0	0.000
2	100	0.158
3	200	0.358
4	300	0.430
5	400	0.501
6	500	0.716
7	600	0.816
8	700	0.900
9	800	0.960
10	900	0.980

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 575 nm



รูป 33 กราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetylglucosamine

2. การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน bovine serum albumin

1.เตรียมสารละลายโปรตีน bovine serum albumin หรือ BSA (stock solution) เข้มข้น 1,000 µg/มิลลิลิตร (BSA 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) แล้วเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐาน BSA เข้มข้น 0 ถึง 1,000 µg/ml (ตาราง 41)

ตาราง 41 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีน

ความเข้มข้น (µg/ml)	Stock solution (µl)	น้ำกลั่น (µl)
0	0	300
100	30	270
200	60	240
300	90	210
400	120	180
500	150	150
600	180	120
700	210	90
800	240	60
900	270	30
1,000	300	0

2.1 เตรียม working solution ของ bovine serum albumin ความเข้มข้น 1.0 mg/ml โดยชั่ง bovine serum albumin 0.01 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร

2.2 เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin ในหลอดทดลองโดยดูด working solution 0.03, 0.06, 0.06, 0.12, 0.15, 0.18, 0.21, 0.24 และ 0.27 มิลลิลิตร เติมน้ำให้มีปริมาตรรวมแต่ละหลอดเท่ากับ 0.3 มิลลิลิตร

2.3 เติม reagent C 3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด ทิ้งไว้ 20 นาที

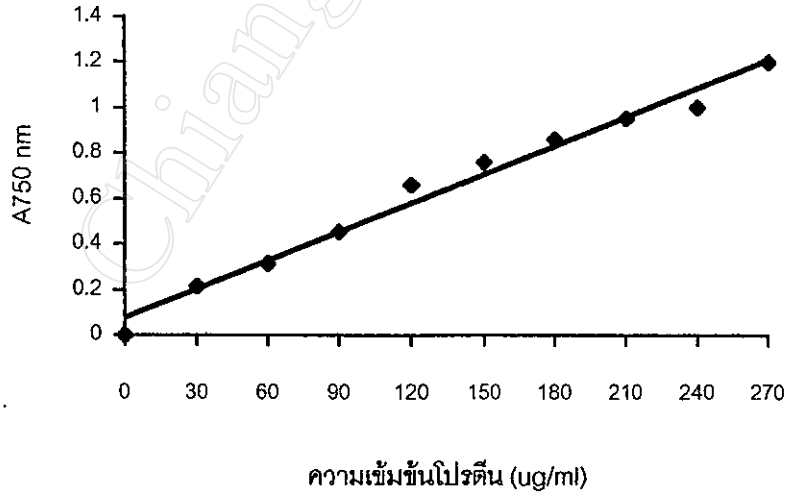
2.4 เติม folin phenol reagent 0.3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอดทิ้งไว้ 30 นาที

2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank (ตาราง 42)

ตาราง 42 ค่าการดูดกลืนแสงของ Bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ลำดับที่	ความเข้มข้นของโปรตีน (ug/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง 750 นาโนเมตร
1	0	0.000
2	30	0.216
3	60	0.316
4	90	0.455
5	120	0.662
6	150	0.760
7	180	0.860
8	210	0.953
9	240	1.000
10	270	1.200

2.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโปรตีน



รูป 34 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin

ภาคผนวก จ

การคำนวณที่ใช้ในการทดลอง

1. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ chitinase activity

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ = OD (ES – EC – SC)

เมื่อ ES = enzyme substrate

EC = enzyme control

SC = substrate control

เปลี่ยนค่า OD ที่ได้ให้เป็นปริมาณเนื้อสาร (มิลลิกรัม) โดยใช้วิธีดังนี้

1.1 การหา slope ของกราฟมาตรฐาน NAG

$$\text{slope} = \frac{y}{x} = \frac{y2-y1}{x2-x1}$$

จากสมการเส้นตรง $y = mX + b$

เมื่อ m = slope ของกราฟมาตรฐาน

y = ค่า OD (ES – EC – SC)

X = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ N-acetylglucosamine (mg)

$y = mX$

$X = \frac{y}{m}$ หน่วย mg/ml

ดังนั้น $\text{chitinase activity} = \frac{X \times \text{dilution of crude enzyme}}{221.21 \times 0.3 \times 60}$ unit/ml

การสกัดเอนไซม์จากอาหารแข็ง substrate ที่ใช้ 5 กรัม สกัดโดยใช้ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

สารละลาย 1 มิลลิลิตร มีปริมาณเอนไซม์ = A unit

ถ้าสารละลาย 50 มิลลิลิตร มีปริมาณเอนไซม์ = 50 x A = B unit

substrate 5 กรัม มีปริมาณเอนไซม์ = B unit

ถ้า substrate 1 กรัม มีปริมาณเอนไซม์ $= \frac{B \times 1}{} = C$ U/gIDS

1 หน่วยเอนไซม์ : ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคตินให้เป็น NAG 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2. การคำนวณปริมาณโปรตีน

เปลี่ยนค่า OD ที่ได้เป็นปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยใช้กราฟมาตรฐาน BSA

∴ ปริมาณโปรตีน = y ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.3 มิลลิลิตร

ดังนั้น ปริมาณโปรตีน $= \frac{y \text{ ไมโครกรัม /มิลลิลิตร}}{0.3}$

3. การคำนวณค่า specific activity

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

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

ภาคผนวก ฉ

การเตรียมเปลือกกุ้ง

เปลือกกุ้งได้รับความอนุเคราะห์จากร้านอาหารสุกี้โคคา สาขาเจ็ดยอด จังหวัดเชียงใหม่
ซึ่งเป็นกุ้งสดต้องนำมาผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ก่อนจะนำมาเป็นสับสเตรท ดังนี้

ของเหลือจากกุ้ง

⇩

คัดเอาเฉพาะส่วนเปลือก ล้างน้ำสะอาดเพื่อแยกสิ่งสกปรกออกแยกโปรตีนออก
โดยต้มน้ำเดือด 100°C นาน 2 ชั่วโมง

⇩

ผึ่งให้แห้ง โดยนำเปลือกกุ้งใส่ตะกร้าแล้วตากแดดนาน 24 ชั่วโมง

⇩

อบตู้อบ (Hot air oven) อุณหภูมิ 60°C นาน 2 ชั่วโมง เพื่อลดความชื้นของเปลือกกุ้ง

⇩

อบตู้อบ (Microwave) mid high นาน 30 นาที เพื่อทำให้เปลือกกุ้งมีลักษณะที่แห้งขึ้น

⇩

บดคัดขนาดโดยการใช้เครื่องปั่น (Blender)

⇩

นำเปลือกกุ้งมาร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดรู ขนาดต่างๆ 3 ขนาด คือ ขนาดป่นละเอียด,
ขนาดกลาง(0.5-1.0 mm) และ ขนาดใหญ่ (1.0-3.0mm)

⇩

เก็บในภาชนะที่แห้ง (อุณหภูมิห้อง)

ภาคผนวก ช

การเตรียม Sodium Dodesyl Sulfate Polyacrylanide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

1. ล้างแผ่นกระจกด้วย ethanol

2. ผสมสารละลายต่างๆเพื่อใช้เป็น separation gel นำสารผสมไปทำการ degas โดยการให้ความร้อนหรือใช้ sonicator เป็นเวลา 15 นาที และทำการ TEMED ในลำดับสุดท้าย

3. เติมสารละลายที่ผสมกันเสร็จสมบูรณ์ลงในแผ่นกระจกโดยให้ความสูงอยู่ระหว่างขอบกระจกและขอบเจลประมาณ 2.0 cm รอจนกระทั่งเจลคงตัว ประมาณ 15-20 นาที จึงทำการดึง comp ออก โดยควรจะให้ระยะระหว่างด้านล่างของหลุมที่จะเติมตัวอย่างกับขอบของ separating gel ห่างกันประมาณ 5-8 mm

4. เติมตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้วแช่ใน chamber ที่มี running buffer อยู่ จากนั้นทำการ run gel โดยควบคุมกระแสไฟฟ้าที่ 8 mV เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งแถบสีเคลื่อนลงมาถึงด้านล่างของขอบกระจก

5. นำเจลมาย้อมสีด้วย Coomassie blue solution เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงล้างสีออกด้วย destain solution (50% methanol, 10% acetic acid) จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนที่ต้องการ

6. เก็บตัวอย่างเจลในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิต่ำ

สารเคมีที่ใช้

1. Separating gel (12%T)

Acrylamine/bisacrylamine(30%T,2.7%C)	4.0	มิลลิลิตร
1.0M Tris-HCl pH8.0	2.5	มิลลิลิตร
20% SDS	0.05	มิลลิลิตร
Deionized water	3.4	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	0.05	มิลลิลิตร
TEMED	0.005	มิลลิลิตร

2. Stacking gel (4%T)

1.0 M Tris-HCL pH8.0	1.25 ml
Acrylamide/bisacrylamide (30%T,2.7%C)	0.67 ml
20%SDS	0.025 ml
Deionized water	0.025 ml
10% Ammonium persalfate	0.025 ml
TEMED	0.005 ml

3. Loading buffer (5% running buffer, pH8.0)

Tris base	15 g
Glycine	72 g
SDS	5 g
Distilled water	1000 ml

4. Sample buffer

Glycerol	0.8 ml
0.5M Tris-HCL pH 8.0	1.0 ml
10% SDS	1.6 ml
Beta-mercaptoethanal	0.4 ml
0.05% (W/V) bromophenol blue	0.2 ml
Distilled water	4.0 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก ซ

เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต

Initial concentration of ammonium sulfate, % saturation	Final concentration of ammonium sulfate, % saturation																
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	309	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	441	509
40								31	63	94	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

ภาคผนวก ฌ

การเตรียม $BaSO_4$ standard หรือ Mc Farland เบอร์ต่าง ๆ

ส่วนผสมของ 0.048M $BaCl_2$ (1.175% w/v $BaCl_2.2H_2O$)

และ 0.36M H_2SO_4 (1% v/v)

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 $BaCl_2$ และ0.36M H_2SO_4 ตามอัตราส่วนที่กำหนด เก็บไว้ในหลอดฝาเกลียว ขนาด 16x150 mm. เมื่อต้องการใช้ให้เขย่าหลอดจะเกิดความขุ่นเทียบได้กับ Mc Farland เบอร์ต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว มธุรส ชัยหาญ
วัน เดือน ปีเกิด	18 มกราคม 2521
ภูมิลำเนา	จังหวัดลำปาง
ประวัติการศึกษา	สำเร็จมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนพะเยาพิทยาคม จังหวัด พะเยา ปีการศึกษา 2538 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2542
ที่อยู่ปัจจุบัน	25 หมู่ 4 ถ.พหลโยธิน ต. หลวงเหนือ อ. งาว จ. ลำปาง 52110

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University