

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. ISP1 agar medium (Tryptone – Yeast extract agar)

Tryptone	5.0	g/L
Yeast extract	3.0	g/L
Agar	18.0	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. ISP2 agar medium (Yeast – Malt extract agar) (Ulhoa and Peberdy, 1991)

Glucose	4.0	g/L
Malt extract	10	g/L
Yeast extract	4.0	g/L
Agar	18.0	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. ISP3 agar medium (Oatmeal agar)

Oat meal	20.0	g/L
Trace salt solution	10	ml/L
Agar	18.0	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ต้มข้าวโอ๊ตในน้ำกลั่น โดยต้มให้เดือดประมาณ 10-15 นาที หรือ ละลาย oat meal ในน้ำกลั่น นำมากรองผ่านผ้าขาวบางลงในบีกเกอร์ เติม trace salt solution และละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. ISP4 agar medium (Inorganic salts starch agar)

Soluble starch	10.0	g/L
K_2HPO_4	1.0	g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	g/L
NaCl	1.0	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0	g/L
CaCO_3	2.0	g/L
Trace salt solution	1.0	g/L
Agar	18	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. ISP5 agar medium (Glycerol - Asparagine agar)

Glycerol	10.0	g/L
L-asparagine	1.0	g/L
K ₂ HPO ₄	1.0	g/L
Trace salt solution	10	ml/L
Agar	18	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอ autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. ISP6 agar medium (Peptone yeast extract iron agar)

Bacto peptone	15.0	g/L
Proteose peptone	5.0	g/L
Ferric ammonium citrate	0.5	g/L
K ₂ HPO ₄	1.0	g/L
Na ₂ SO ₄	0.08	g/L
Yeast extract	1.0	g/L
Agar	18	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอ autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. ISP7 agar medium (Tyrosine agar)

Glycerol	15.0	g/L
L-tyrosine	0.5	g/L
L-asparagine	1.0	g/L
K ₂ HPO ₄	0.5	g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	g/L
NaCl	0.5	g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	g/L
Trace salt solution	10	ml/L
Agar	18	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. ISP8 agar medium (Nitrate agar)

Beef extract	0.3	g/L
Bacto peptone	5.0	g/L
KNO ₃	2.0	g/L
Agar	18	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. ISP9 agar medium (Carbon utilization agar)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.64	g/L
KH_2PO_4	2.38	g/L
K_2HPO_4	1.0	g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	g/L
Trace salt solution	1.0	g/L
Agar	18	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. Trace salt solution

$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.64	g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11	g/L
MnCl_2	0.79	g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายสารที่ละชนิดให้เข้ากัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด $0.45 \mu\text{m}$ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จึงจะเติมลงในอาหาร

11. Colloidal chitin agar (Test chitinolysis) (Bansode and Bajekal, 2006)

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	g/L
KH ₂ PO ₄	0.3	g/L
K ₂ HPO ₄	0.7	g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	g/L
MnCl ₂	0.001	g/L
Colloidal chitin	4.0 % (w/v) (เตรียมจากเปลือกกุ้ง/ปูตามวิธีในภาคผนวก ข)	
Agar	18	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. Minimal medium (Xu-fex *et al.*, 2007)

Colloidal chitin	1.0 % (w/v)	
Yeast extract	0.3	g/L
Peptone	0.3	g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	g/L
KH ₂ PO ₄	0.3	g/L
K ₂ HPO ₄	0.7	g/L
Agar	18	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

13. Basal medium (Hsu and lockwood,1975)

Yeast extract	0.5	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0	g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3	g/L
KH ₂ PO ₄	0.3	g/L
K ₂ HPO ₄	0.7	g/L
Trace element	0.1%	(v/v)
Agar	18	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

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

Colloidal chitin	1.0 %	(w/v)
Glucose	3.0	g/L
Bacto peptone	1.0	g/L
Urea	0.3	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4	g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3	g/L
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.5	g/L
Trace element	0.1 %	(v/v)
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

15. Trace element

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.0	g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.6	g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.4	g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0	g/L
น้ำกลั่น	1000	ml/L

ละลายส่วนผสมทีละชนิด แล้วนำทั้งหมดให้ผสมให้เข้ากัน



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การเตรียมสับสเตรท

1. การเตรียมเปลือกปู/เปลือกกุ้ง

เปลือกปูได้มาจาก ห้องปฏิบัติการวิจัยสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ ด้านพัฒนาแบบยั่งยืนของ
ทรัพยากรชีวภาพ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (2813) ซึ่ง
ต้องนำมาผ่านขั้นตอนต่างๆก่อนจะนำมาเป็นสับสเตรทดังนี้

ของเหลือจากปู/กุ้ง

- คัดเอาเฉพาะส่วนเปลือก ล้างน้ำให้สะอาด เพื่อแยกสิ่งสกปรกออก และ แยกโปรตีน
ออกโดยต้มน้ำเดือด 100 °C นาน 2 ชั่วโมง
- ผึ่งให้แห้ง โดยนำเปลือกปู/กุ้งใส่ตะกร้าแล้วตากแดดนาน 24 ชั่วโมง
- อบตู้อบ (hot air oven) อุณหภูมิ 60 °C นาน 2 ชั่วโมง เพื่อลดความชื้นของเปลือกปู/
กุ้ง
- อบตู้อบ นาน 30 นาที เพื่อให้เปลือกปู/กุ้งมีลักษณะที่แห้งขึ้น
- บดคัลดขนาดโดยใช้เครื่องปั่น (Blender)
- เก็บในภาชนะที่แห้ง (อุณหภูมิห้อง)

1. การเตรียม Colloidal chitin

- เปลือกปู/เปลือกกุ้ง (10 g) + 20 ml Acetone + 200 ml Conc. HCl
- กวนตลอดเวลาในอ่างน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 2 ชั่วโมง
- เก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- กรองผ่านผ้าขาวบาง 2-3 ชั้น ลงใน 600 ml ของ 50 % ethanol ที่กวนตลอดเวลา
- ปรับ pH ของ Colloidal chitin ด้วย NaOH วัด pH จนได้เท่ากับ 7.0
- ทิ้งให้ตกตะกอน แล้วนำตะกอน Colloidal chitin ที่ได้มาปั่นแยกส่วนด้วยเครื่องปั่น

เหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 5000 rpm 4 °C 10 นาที จึงเก็บ Colloidal chitin มาใช้เป็น
สับสเตรท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

การเตรียมน้ำยาทดสอบและบัฟเฟอร์

1. 0.2 M Phosphate buffer

Stock solutions

A : 0.2 M ของสารละลาย KH_2PO_4 (27.8 g ในน้ำกลั่น 1000 ml)

B : 0.2 M ของสารละลาย K_2HPO_4 (71.7 g ในน้ำกลั่น 1000 ml)

Working solution

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตาม pH x ml of A + Y ml of B เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม 200 ml ที่ต้องการดังตาราง 1 วัด pH ด้วย pH meter

ตาราง ค.1 ปริมาตรของ x และ y ในการเตรียม Phosphate buffer ที่ pH ต่างๆ

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	49.5	6.8	5.3	94.7	8.0

2. DNS reagent (Miller, 1959)

NaOH	1.0	% (w/v)
3,5 dinitrosalicylic acid	1.0	% (w/v)
Na ₂ CO ₃	0.05	% (w/v)
Phenol	0.2	% (w/v)

ละลาย NaOH 5 g ในน้ำกลั่น 450 ml เติม 3,5 dinitrosalicylic acid 5 g คนให้ละลายแล้วเติม Na₂CO₃ 0.25 g คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม Phenol 1 g (เนื่องจาก Phenol เป็นสารที่ดูดความชื้นได้เร็วมาก จึงควรนำสารนี้ชั่งใน beaker) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml เก็บเป็น stock DNS ในขวดสีชา

3. 40% Sodium Potassium tartrate

ชั่ง sodium potassium tartrate 40 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

การทำการฟมาตรฐานของสารละลาย *N*-acetylglucosamine

และ กราฟปริมาณของโปรตีน

1. การทำการฟมาตรฐานของสารละลาย *N*-acetylglucosamine (NAG)

เตรียม stock solution NAG ความเข้มข้น 1.0 mg/ml (0.1 g ในน้ำ 100 ml) ใน volumetric flask เจือจางให้ได้เป็นเนื้อสารดังตารางข้างล่างนี้

- 1.1 ปิดด้วยลูกแก้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ใน water bath เป็นเวลา 30 นาที
- 1.2 เติมสารละลาย DNS reagent 2 ml
- 1.3 นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วแล้วเติม 40% Sodium Potassium tartrate 1 ml
- 1.4 ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร (nm)

ตาราง ง.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน *N*-acetylglucosamine

หลอดที่	เนื้อสาร (mg)	stock solution (ml)	น้ำกลั่น (ml)
1	0.0	0.0	1.5
2	0.1	0.1	1.4
3	0.2	0.2	1.3
4	0.3	0.3	1.2
5	0.4	0.4	1.1
6	0.5	0.5	1.0
7	0.6	0.6	0.9
8	0.7	0.7	0.8
9	0.8	0.8	0.7
10	0.9	0.9	0.6
11	1.0	1.0	0.5

ตาราง ง.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน *N*-acetylglucosamine ที่ 575 nm

Conc. (mg/ml)	OD (1)	OD (2)	ค่าเฉลี่ย (average)
0	0.003	0.003	0.003
0.1	0.052	0.055	0.054
0.2	0.121	0.121	0.121
0.3	0.171	0.171	0.171
0.4	0.230	0.230	0.230
0.5	0.277	0.277	0.277
0.6	0.337	0.337	0.337
0.7	0.393	0.393	0.393
0.8	0.457	0.457	0.457
0.9	0.492	0.492	0.492
1.0	0.566	0.570	0.568

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

2. การทำกราฟมาตรฐานของโปรตีน (Protein assay) (Bradford method)

เตรียม Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 ตามลำดับ

2.1 ดูดสาร BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน มาปริมาณ 0.1 ml ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด

2.2 เติมสารละลาย Coomassie blue G250 ของ Biorad ปริมาตร 5 ml (เตรียมสารละลาย Dye reagent โดย dilute dye: DI water (1:4) จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง what man เบอร์ 1 เก็บที่อุณหภูมิห้อง)

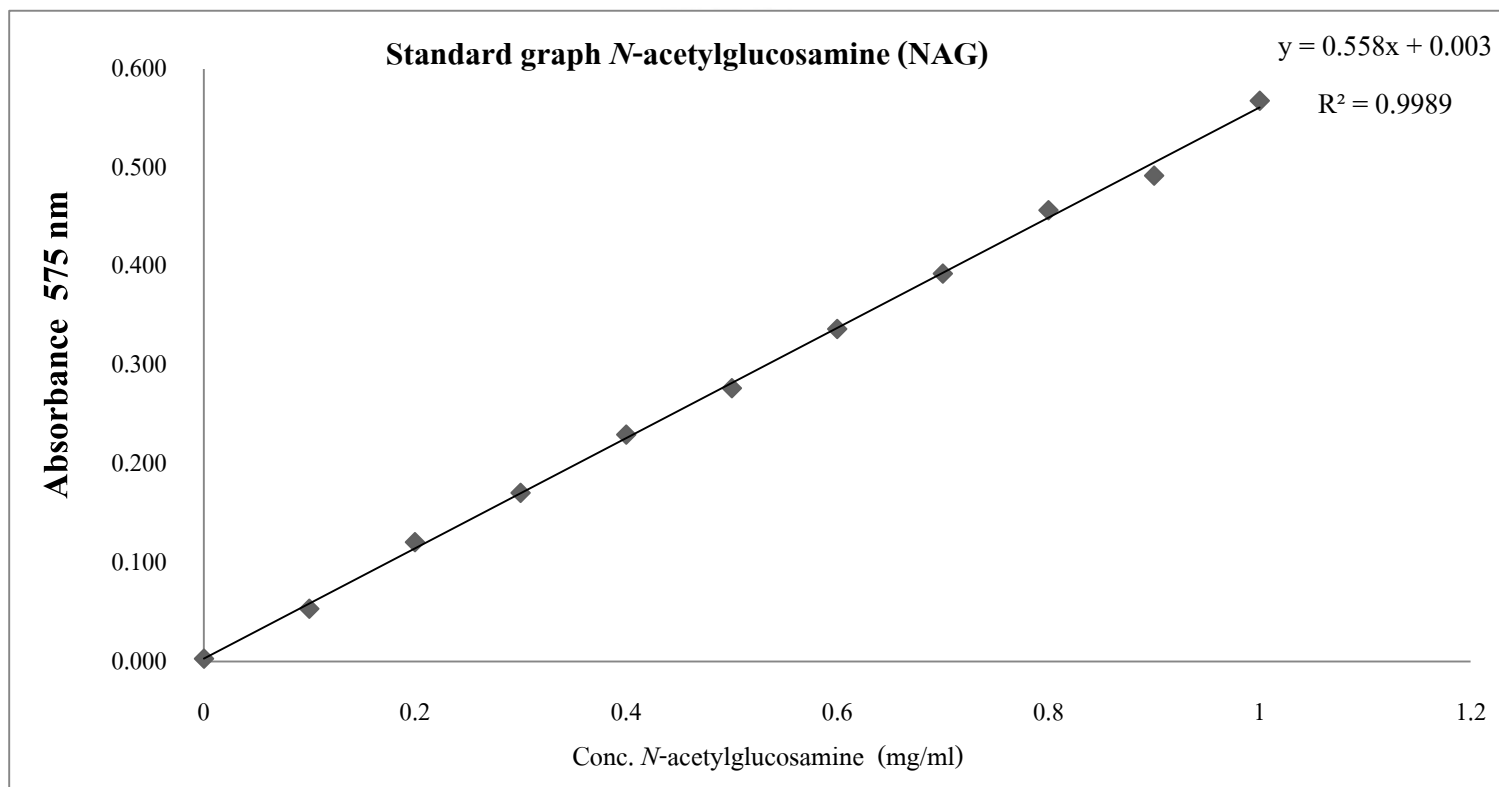
2.3 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

2.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร (nm)

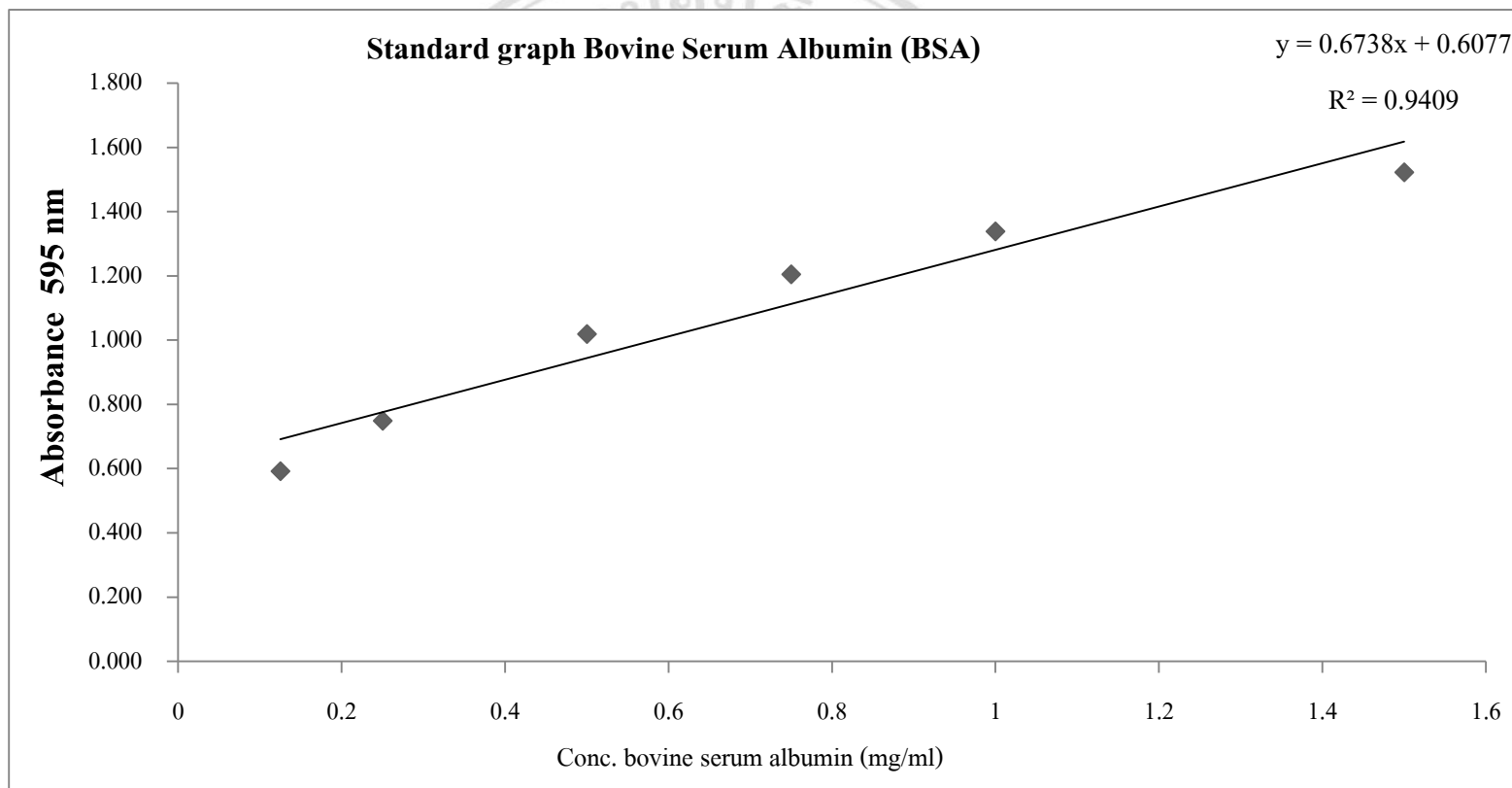
ตาราง ง.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BSA (Bovine serum albumin) ที่ 595 nm

Conc. (mg/ml)	OD (1)	OD (2)	ค่าเฉลี่ย (Average)
0.125	0.588	0.596	0.592
0.25	0.752	0.745	0.749
0.5	1.038	1.000	1.019
0.75	1.222	1.188	1.205
1	1.366	1.311	1.339
1.5	1.521	1.524	1.523

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ ง.1 กราฟมาตรฐานของ *N*-acetylglucosamine (NAG) ที่ความเข้มข้นต่างกัน



ภาพ ง.2 กราฟมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ภาคผนวก จ

การหาค่า chitinase activity, ปริมาณ protein และ specific activity

1. ค่าของ chitinase activity

กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคติน ให้เป็น NAG 1 μmole ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่กำหนด ที่อุณหภูมิ 37 °C

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หาได้จากค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของตัวอย่าง

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ = OD (ES-EC-SC) = ค่า A

โดยที่ ES EC SC คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Enzyme substrate (ES),

ค่าการดูดกลืนแสงของ Enzyme control (EC)

ค่าการดูดกลืนแสงของ Substrate control (SC)

เปลี่ยนค่า OD ที่ได้เป็นค่าความเข้มข้นของ NAG โดยนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย NAG

การคำนวณ กิจกรรมของเอนไซม์ (Chitinase activity)

สมมติให้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเทียบกราฟมาตรฐาน = B mg/ml

ในการทดลอง ใช้ปริมาณเอนไซม์ไป = 0.5 ml

เวลาในการทำปฏิกิริยา (บ่มเอนไซม์) = 30 นาที

ค่า มวลโมเลกุลของ NAG (MW) = 221.21 g = 1 mole

โดย NAG 221.21 mg = $1 \times 10^3 \mu\text{mole}$

ดังนั้นถ้ามี NAG B mg = $B \times 10^3 \mu\text{mole} / \text{MW} \times \text{เวลา (นาที)} \times \text{ปริมาณเอนไซม์ (ml)}$

จะได้ NAG B mg = $0.30 \times \text{U/ml}$

2. การคำนวณค่า Protein

เปลี่ยนค่า การดูดกลืนแสงที่ได้ (OD) เป็นปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน ($\mu\text{g/ml}$)

โดยใช้กราฟมาตรฐาน BSA (สมการ $y = mx + b$)

ดังนั้น ปริมาณโปรตีน = $Y \mu\text{g/ml}$

ตัวอย่าง จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.1 ml

ดังนั้น ปริมาณโปรตีนเท่ากับ $P = Y/0.1 \mu\text{g/ml}$

$$= Y/100 \text{ mg/ml}$$

3. การคำนวณค่า specific activity

Specific activity หมายถึง ค่าอัตราส่วนหรือโปรตีนที่ศึกษาต่อโปรตีนทั้งหมด

ถ้าตัวอย่างมีค่า specific activity สูงแสดงว่ามี เอนไซม์ที่สนใจอยู่มาก

Specific activity = chitinase activity (unit) / ปริมาณโปรตีน (mg/ml) หน่วย U/mg protein

ตัวอย่าง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 0.224 U/ml และค่าโปรตีนเท่ากับ 0.5 mg/ml

Specific activity = $0.224 \text{ U/ml} / 0.5 \text{ mg/ml}$

$$= 0.448 \text{ U/mg protein}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก จ

ลำดับเบสของแอสดีโนมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS 5

ttcgggtgggg attagtggcg aacgggtgag taacacgtgg gcaatctgcc cttcactctg ggacaagccc tggaaacggg
gtctaatacc ggatatcact cctgcaggca tctgcagggg tcgaaagctc cggcgggtgaa ggatgagccc gcggcctatc
agcttgttgg tgaggtaatg gctcaccaag gcgacgacgg gtagccggcc tgagagggcg accggccaca ctgggaattg
agacaccggc ccaagactcc ttacggaagg cagccagtgg gggaatattg caccaatggg cggaaacctt gatgcagcga
cgcccgctg aggggatgac ggcccttcgg gttgtaaacc tctttcagc agggagaag cgaaagtac ggtacctgca
gaagaagcgc cggctaaatt acgtgccage agccgcggta atacgtaggg cgaaagcgt tgtcccgaa ttattggcg
taaagagctc gtagggcgct tgtcacgtc ggtgtgaaag cccggggctt aacccgggt ctgcattcga tacgggctag
ctagagtgtg gtaggggaga tcggaattcc tgggttagcg gtgaaatcg cagatatcag gaggaacacc ggtggcgaag
gcggatctct gggccattac tgacgtgag gagcgaaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg tagtcacgc
cgtaaacggt gggaactagg tgttggcgac attccacgtc gtcggtgccg cagctaacgc attaagtcc ccgctgggg
agtacggccg caaggctaaa actcaaagga attgacgggg gcccgcaaa gcagcggagc atgtggctta attcgacga
acgcgaagaa cttaccaag gcttgacata caccggaac gtctggagac aggcgcccc ttgtggtcgg tgtacagtg g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ชุดทดสอบ API

1. วิธีการของชุดทดสอบ API

- 1.1 เลี้ยงเชื้อแอคติโนไมซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5 ลงในอาหารเหลว ISP2 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน
- 1.2 เตรียมเชื้อในรูป suspension ปริมาตร 2 ml ให้มีความขุ่น 5-6 Mcfarland ($4.8 \times 10^9 - 9.6 \times 10^9$ CFU/ml)
- 1.3 ทำการ label ชื้อเชื้อลงขอบถาด เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในหลุมของถาดประมาณ 5 ml เพื่อเพิ่มความชื้น จากนั้นวางแถบทดสอบเอนไซม์ลงในถาด
- 1.4 ทำการหยด suspension ของเชื้อลงไปในแต่ละหลุมบนแถบทดสอบเอนไซม์ (microtubes) จากนั้นปิดฝาถาดและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C

2. วิธีการอ่านผลชุดทดสอบ API

สังเกตการเปลี่ยนสีของแต่ละหลุม ถ้าผลเป็นบวก แต่ละหลุมจะเปลี่ยนสีตามชนิดของเอนไซม์ ถ้าผลเป็นลบจะเปลี่ยนเป็นไม่มีสีเมื่อเทียบกับหลุมควบคุม เปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสีมาตรฐานของบริษัทผู้ผลิตชุดทดสอบ (Biomerax)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ข.1 การอ่านผลของ API 20E

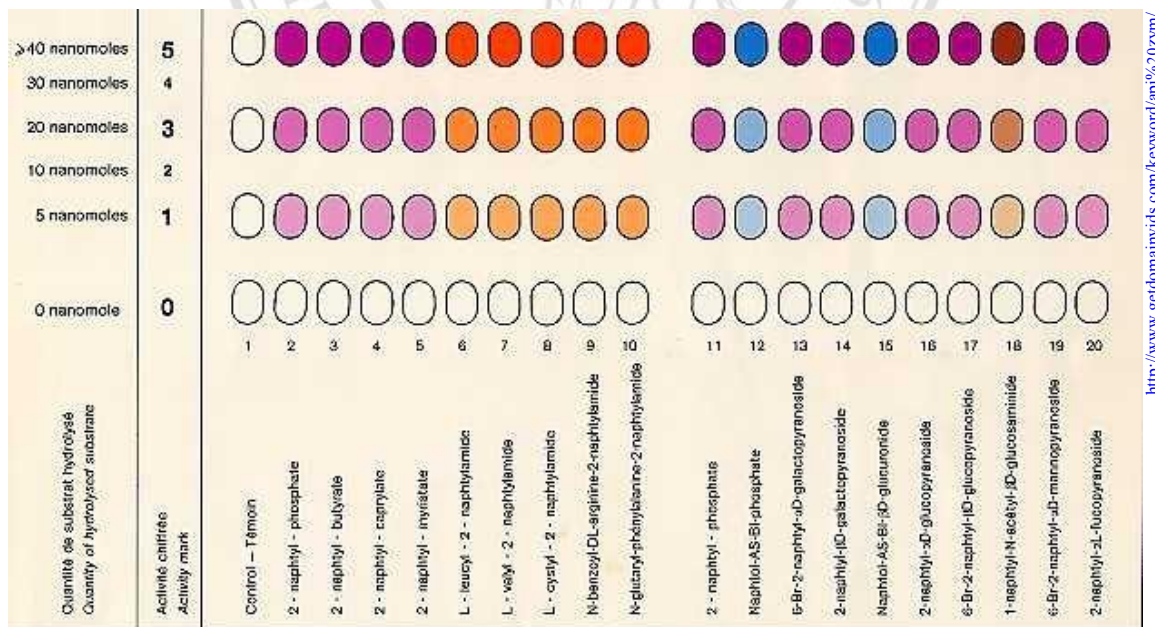
กลุ่มทดสอบ	ปฏิกิริยาหรือเอนไซม์	การอ่านผล	
		Negative	Positive
Onp	β -galactosidase	colorless	yellow
Arg	Arginine dihydrolase	yellow	red / orange
Lys	Lysine decarboxylase	yellow	red / orange
Ods	Ornithine decarboxylase	yellow	red / orange
Cit	Citrate utilization	pale green / yellow	blue-green / blue
H ₂ S	H ₂ S production	colorless / greyish	black deposit / thin line
Ure	Urease	yellow	red / orange
Trp	Tryptophane desaminase	yellow	reddish brown
Ind	Indole production	colorless	pink
		pale green / yellow	
VP	Acetoin production	colorless	pink / red
Gel	Gelatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
Glu	Fermentation	blue / blue-green	yellow / greyish yellow
Man	Fermentation	blue / blue-green	yellow
Ino	Fermentation	blue / blue-green	yellow
Sor	Fermentation	blue / blue-green	yellow
Rha	Fermentation	blue / blue-green	yellow
Sac	Fermentation	blue / blue-green	yellow
Mel	Fermentation	blue / blue-green	yellow
Amy	Fermentation	blue / blue-green	yellow
Ara	Fermentation	blue / blue-green	yellow

bioMérieux® sa api® 20 E <http://www.biomerieux.com>

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E						
Microtube	Substrat :	Caractère recherché :	Révélateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Beta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de Phénol	Lecture directe		
[CIT]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S		Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte Ajouter une goutte de réactif chlorure de fer III		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte Ajouter une goutte de réactif Kovacs		
[V.P.]	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte Ajouter 1 goutte de VP1 et VP2 Attendre 10 minutes		
[GEL]	Gélatine	gélatinase		Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO ₂ ⁻ /N ₂	Nitrates (NO ₃ ⁻)	Nitrate réductase		Lecture indirecte Ajouter 1 goutte de NIT1 et NIT2 et zinc éventuellement		

<http://image.trompo.com/da5d0e72081b87b417303c3195545328>

ภาพที่ ข.1 การอ่านผลของชุดทดสอบ API 20E



<http://www.getdomainids.com/keyword/api%20zym/>

ภาพที่ ข.2 การอ่านผลของชุดทดสอบ API ZYM® มีช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0-5 เมื่อ 0 = ไม่มีสี, 5 = สีเข้มสุด

ตารางที่ ข.2 การอ่านผลของ API Coryne

หลุม	ปฏิกิริยาหรือเอนไซม์	การอ่านผล	
		Negative	Positive
Nit	Nitrate reduction	colorless very pale pink	dark pink or red
Pyz	Pyrazinamidase	colorless very pale brown very pale orange	Brown or orange
PyrA	Pyrrolidonyl Arylamidase	colorless pale orange	orange
Pal	Alkaline phosphatase	colorless beige - pale purple pale orange	purple
β Gur	β -Glucuronidase	colorless pale grey pale beige	blue
β Gal	β -Galactosidase	colorless beige - pale purple	purple
α Glu	α -Glucosidase	colorless beige - pale purple pale green	purple
β Nag	N-Acetyl- β -Glucosamidase	colorless beige - pale purple pale brown pale grey	brown
Esc	Esculin (β -Glucosidase)	Colorless or grey	black
Ure	Urease	Yellow or orange	Red or pink

Test	Reactions/Enzymes	Results	
		Negative	Positive
Gel	Gelatine (hydrolysis)	no diffusion of black pigment	diffusion of black pigment
Glu	Glucose fermentation	Red or orange	yellow or yellow - orange
Rib	Ribose fermentation	Red or orange	yellow or yellow - orange
Xyl	Xylose fermentation	Red or orange	yellow or yellow - orange
Man	Mannitol fermentation	Red or orange	yellow or yellow - orange
Lac	Lactose fermentation	Red or orange	yellow or yellow - orange
Sac	Sucrose fermentation	Red or orange	yellow or yellow - orange
Glyg	Glycogen fermentation	Red or orange	yellow or yellow - orange
Cat		no bubbles	bubbles

bioMérieux® sa api® Coryne <http://www.biomerieux.com>

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล น.ส. นภัสนันท์ โกษาวัง
วัน เดือน ปี เกิด 29 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2531
ประวัติการศึกษา ปีการศึกษา 2553 วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ปีการศึกษา 2549 ระดับมัธยมศึกษา
โรงเรียนอรุโณทัย ลำปาง จังหวัดลำปาง
ผลงานทางวิชาการ

1. การนำเสนอผลงานประเภท poster presentation ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Kosawang N. and Lumyong S. 2013. Isolation and Identification of Chitinase from Soil Actinomycetes. Program & Abstract of the Burapha University International Conference “Global Change: Human and Social Impacts”, Jomtien Palm Beach Hotel & Resort, Pattaya, Thailand, July, 4-5, 2013.



มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved