ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหาร PDA

มันฝรั่ง	200	กรัม
วุ้น	17	กรัม
น้ำตาล glucose	30	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

ล้างมันฝรั่งให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก นำไปต้มจนสุก กรองเอาแต่น้ำ แล้วต้มวุ้นให้ละลาย เติมน้ำตาล glucose ผสมส่วนผสมทั้งสองเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1 ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

2. การเตรียมอาหาร PDA ผสมสารละลายไคโตซาน

การเตรียมอาหาร PDA ผสมสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.05, 0.25, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ จาก Stock สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างการคำนวณ

การเตรียมอาหาร PDA ผสมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

C_1 = ความเข้มข้นของ Stock ที่เตรียมไว้ (ไคโตซาน 2%)

V_1 = ปริมาตรที่ต้องใช้ (กำหนดให้เป็น X)

C_2 = ความเข้มข้นสารละลายไคโตซานที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรที่ใช้ (100 ml)

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$2X = (1)(100)$

$X = 50$ ml

ดังนั้น เตรียมอาหาร PDA ผสมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 100 ml จะต้องใช้ Stock ไคโตซาน 2% ปริมาตร 50 ml ผสมกับ PDA 50 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหาร PDA ผสมสารละลายไคซานความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$2X = (0.5)(100)$

$X = 25$ ml

ดังนั้น เตรียมอาหาร PDA ผสมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.5% ปริมาตร 100 ml จะต้องใช้ Stock ไคโตซาน 2% ปริมาตร 25 ml ผสมกับ PDA 75 ml

อาหาร PDA ผสมสารละลายไคซานความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$2X = (0.25)(100)$

$X = 12.5$ ml

ดังนั้น เตรียมอาหาร PDA ผสมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.25% ปริมาตร 100 ml จะต้องใช้ Stock ไคโตซาน 2% ปริมาตร 12.5 ml ผสมกับ PDA 87.5 ml

อาหาร PDA ผสมสารละลายไคซานความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$2X = (0.05)(100)$

$X = 2.5$ ml

ดังนั้น เตรียมอาหาร PDA ผสมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05% ปริมาตร 100 ml จะต้องใช้ Stock ไคโตซาน 2% ปริมาตร 2.5 ml ผสมกับ PDA 97.5 ml

อาหาร PDA ผสมสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$2X = (1)(100)$

$X = 50$ ml

ดังนั้น เตรียมอาหาร PDA ผสมสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 100 ml จะต้องใช้ Stock ไคโตซาน 2% ปริมาตร 50 ml ผสมกับ PDA 50 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การเตรียมสารทดสอบและ reagent

3.1 Phosphate buffer pH 6.5

- สารละลายไดโพแทสเซียมไฮเดรเจนฟอสเฟต (di-potassium hydrogen phosphaste, Merck) เตรียมโดยชั่งไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3.4023 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

- สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate, Merck) ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.354 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

เติมสารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรด) ลงในสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ด่าง) จนได้ค่า pH เท่ากับ 6.5 เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

3.2 DNS reagent

NaOH	1%
3, 5 dinitrosalicylic acid	1%
Na_2CO_3	0.05%
Phenol	0.2%

ละลาย NaOH 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร เติม 3, 5 dinitrosalicylic acid 0.5 กรัม คนให้ละลายแล้วเติม Na_2CO_3 0.025 กรัม คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติม Phenol 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร เก็บเป็น stock ในขวดสีชา

3.3 Sodium potassium tartate 40%

ละลาย Sodium potassium tartate 20 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

3.4 สารละลายอัลคาร์ไลคอปเปอร์

- สารละลายโซเดียมคาร์บอร์เนต เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- สารละลายโพแทสเซียมทาร์เตรท เตรียมโดยชั่งโพแทสซียมทาร์เตรท 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 500 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายคอปเปอร์ สีฟ้าใส เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

3.5 Folin 50%

เตรียมโดยใช้โฟลิน 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การทำกราฟมาตรฐาน

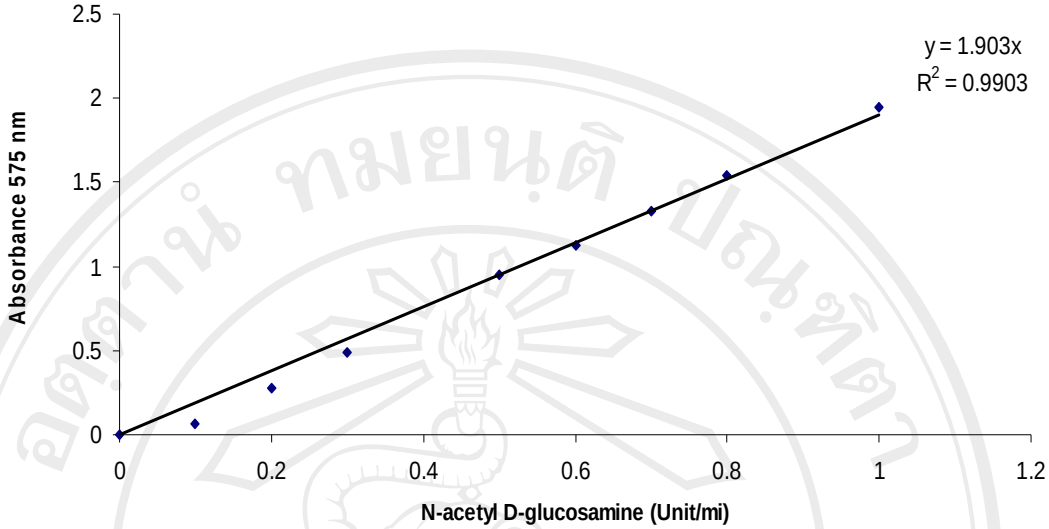
การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetyl D-glucosamine (NAG)

1. เตรียม working solution ของ N-acetyl D-glucosamine ความเข้มข้น 1.0 mg/ml โดยชั่ง N-acetyl D-glucosamine 0.1 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml
2. เตรียมสารละลาย NAG 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 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
4. เติม DNS หลอดละ 2 ml ปิดหลอดด้วยลูกแก้วแล้วนำไปต้มด้วยน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที
5. เติม 40% Sodium potassium tartrate หลอดละ 1 ml ทำให้เย็นลงทันที
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank (ตาราง 8.1)

ตาราง 7.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ N-acetyl D-glucosamine ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 575 nm

N-acetyl D-glucosamine	ค่าการดูดกลืนแสง
0.0	0.000
0.1	0.064
0.2	0.273
0.3	0.490
0.5	0.952
0.6	1.130
0.7	1.331
0.8	1.545
1.0	1.951

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 8.1 กราฟมาตรฐานของ N-acetyl D-glucosamine ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 575 nm

หน่วยการทำงานของเอนไซม์ (unit of enzyme)

กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการปล่อย N-acetyl D-glucosamine 1 µmol ในเวลา 1 นาที

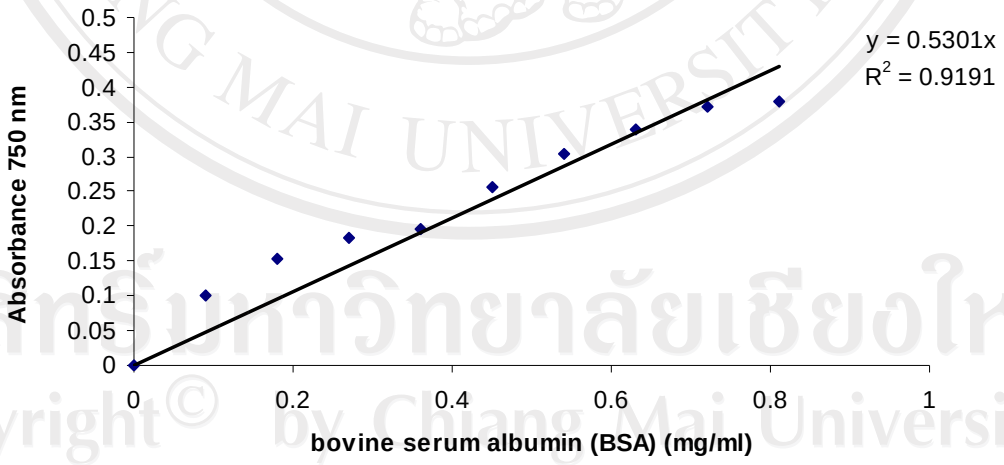
การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน bovine serum albumin

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 0.09, 0.18, 0.27, 0.36, 0.45, 0.54, 0.63, 0.72 และ0.81 ml เติมน้ำให้มีปริมาตรรวมแต่ละหลอดเท่ากับ 0.5 ml
3. เติมสารละลายอัลคาร์ไลคอปเปอร์ ปริมาตร 2,000 µl ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
4. เติมสารละลายโฟลิน 50% ปริมาตร 250 µl ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืน (OD) ที่ความยาวคลื่น 750 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank (ตาราง 8.2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 7.2 ค่าการดูดกลืนแสงของ bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 750 nm

ความเข้มข้นโปรตีน (mg)	ค่าการดูดกลืนแสง
0.00	0.000
0.09	0.101
0.18	0.154
0.27	0.184
0.36	0.195
0.45	0.256
0.54	0.304
0.63	0.338
0.72	0.372
0.81	0.379



ภาพ 8.2 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 750 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณค่าการดูดกลืนแสง (OD)

1. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และ Chitinase activity

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ = OD(ES-EC-SC)

เมื่อ

ES = Enzyme substrate
EC = Enzyme control
SC = Substrate control

เปลี่ยนค่า OD ที่ได้เป็น ปริมาณเนื้อสาร (mg) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน NAG

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ X mg

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.3 mg ระยะเวลาการบ่มเอมไซม์ 30 นาที

น้ำหนักโมเลกุลของ NAG = 221.21 = 1 mole

NAG 221.21 mg = 1×10^3 µmole

$$= \frac{X \times 10^3}{221.21} \text{ µmole /30 min/ enzyme 0.3 ml}$$

$$= \frac{X\times10^3}{221.21\times30\times0.3} \text{ µmole / min/ ml}$$

$$= \frac{X}{1.99} \text{ µmole / min/ ml}$$

$$= (0.502)X \text{ µmole / min/ ml}$$

กำหนดให้ 1 unit ของ enzyme = ปริมาณของเอนไซมที่ทำให้เกิดการปลดปล่อย N-acetyl D-glucosamine 1 µmole ในเวลา 1 นาที

ดังนั้น Chitinase activity = (0.502)X µmole / min/ ml
= (0.502)X unit/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การคำนวณปริมาณโปรตีน

เปลี่ยนค่า OD ที่ได้เป็นปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน (µg/ml) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

ปริมาณโปรตีน = Y mg/ml

จากการทดลองใช้ enzyme 0.5 ml

ดังนั้น ปริมาณโปรตีน $= \frac{Y}{0.5}$ µg/ml

$= \frac{Y}{500}$ mg/ml

3. การคำนวณค่า Specific activity

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{Chitinase activity (unit/ml)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (mg/ml)}}$$

Specific activity ของ enzyme chitinase = กิจกรรมของเอมไซม์ไคติเนส หมายถึง ค่าอัตราส่วนของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ศึกษาต่อโปรตีนทั้งหมด ถ้าตัวอย่างมีค่า Specific activity สูง แสดงว่ามีค่าเอนไซม์ไคติเนสอยู่มากเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว ปิยะวรรณ ขวัญมงคล

วัน เดือน ปี เกิด 23 ตุลาคม 2526

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาต้น โรงเรียนวิทยานุกูลนารี เพชรบูรณ์ ปีการศึกษา 2540

สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนวิทยานุกูลนารี เพชรบูรณ์ ปีการศึกษา 2543

สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2547

ทุนที่ได้รับ

ทุนโครงการพัฒนาบัณฑิต และวิจัยเทคโนยีหลังการเก็บเกี่ยว สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ทุนสนับสนุนการวิจัยบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail: p_k_tom@hotmail.com

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved