

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

**Casein Starch Agar (CSA)**

Soluble starch	10	กรัม
Casein	0.3	กรัม
KNO <sub>3</sub>	2	กรัม
NaCl	2	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	0.02	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Glucose Soybean media (GSM)**

Glucose	20	กรัม
Soybean	20	กรัม
NaCl	4	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	5	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Inhibitory Mold Agar-2 (IMA-2) (Shimizu *et al.*,2002)**

Glucose	5	กรัม
Soluble starch	5	กรัม
Beef extract	1	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
NZ-case (enzyme hydrolyzed casein)	2	กรัม
NaCl	2	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	1	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Nutrient Agar (NA)**

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Nutrient Broth (NB)**

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### Potato Dextrose Aga (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

นำมันฝรั่งมาล้างให้สะอาด และปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1\*1 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนัก 200 กรัม แบ่งน้ำออกเป็นสองส่วนเท่าๆกัน นำมันฝรั่งไปต้มในน้ำ 500 มิลลิลิตร ต้มจนมันฝรั่งสุก จากนั้นกรองเอากากมันฝรั่งทิ้งไป นำน้ำตาลกับวุ้นไปละลายกับกับน้ำที่เหลืออีก 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มจนวุ้นสุก จากนั้นนำมาผสมกันน้ำต้มมันฝรั่ง ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร จึงอาหารที่ได้นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

#### Soil Extract Glucose Agar

$K_2HPO_4$	0.25	กรัม
$CaCO_3$	0.25	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.125	กรัม
Dextrose	0.375	กรัม
Agar	5	กรัม
**ASE	100	มิลลิลิตร
Distilled water	150	มิลลิลิตร

\*\*ASE (Autoclaved soil Extract) ได้จากการนำดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ผสมน้ำ ปริมาตร 1:1 (500 มิลลิลิตร :500 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน กรองจนได้สารละลายดินที่ไม่มีอนุภาคดินเจือปน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที อีกครั้ง

**Starch Casein Agar**

Soluble starch	10	กรัม
Casein	0.3	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	กรัม
NaCl	2	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	0.02	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·8H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
KNO <sub>3</sub>	2	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Tetrazolium Chloride Medium (TZC) (Atlas, 1993)****1. TZC broth**

Peptone	1	กรัม
Glucose	0.5	กรัม
Pancreatic digest of casein	0.1	กรัม
2, 3, 5 – Triphenyl tetrazolium chloride solution	10	มิลลิลิตร
Distilled water	990	มิลลิลิตร

**2. TZC agar**

TZC broth	1	ลิตร
Agar	17	กรัม

ละลาย 2, 3, 5 – Triphenyl tetrazolium chloride 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แยกเก็บไว้ในขวดฝาเกลียว ส่วนผสมที่เหลือให้ละลายให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เมื่อจะนำมาใช้ให้ทดสอบละลาย 2,3,5 – Triphenyl tetrazolium chloride 10 มิลลิลิตร ผสมลงในขวดอาหารที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วเขย่าให้เข้ากัน

#### Yeast extract - Malt extract - Glucose Broth (YMGB)

yeast extract	4	กรัม
malt extract	10	กรัม
glucose	4	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	กรัม
Bacto-agar	16	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### Yeast Starch Agar (YSA)

Yeast extract	2	กรัม
Soluble starch	10	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### อาหารทดสอบเอนไซม์เซลลูเลส

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	กรัม
MgSO <sub>4</sub>	1	กรัม
CaCl <sub>2</sub>	1	กรัม
MnSO <sub>4</sub>	1	กรัม
Carboxy Methyl Cellulose (CMC)	10	กรัม
Yeast extract	1	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

Glucose	10	กรัม
Agar	18	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ละลาย CMC ในน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร เมื่อละลายดีแล้วจึงเติมสารเคมีทีละชนิด จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### สีย้อมทดสอบ

#### 0.1% Congo red

Congo red	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ละลาย Congo red ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## ภาคผนวก ข

ตารางที่ 8 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแอคติโนมัยซีสไอโซเลท  
ต่างๆ

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (เซนติเมตร) <sup>1</sup>
S4, S5, S32, S52, S54	0.3
C3-4, S11, S36 , S59	0.4
S2, S30, S34, S39, S51, S60	0.9
S10, S12, S31, S37, S43	1.0
C4-9, S13, S33, S35, S50	1.2
S3, S8, S21, S44, S45	1.6
S9, S18, S26, S27, S42, S57	1.7
C1-1, S7, S17, S29, S38, S53	1.8
C3-6, C3-7, S14, S20, S40, S56	1.9
C3-5, C4-14, S6, S15, S23, S49	2.0
C2-1, C2-2, S16, S28, S41, S58	2.1
C1-2, S1, S19, S46	2.2
C4-5, C4-6, C4-15, S22, S55	2.5
C3-2, C4-2, C4-4, C4-11, S24	2.6
C3-1, C4-1, C4-7, C4-13	2.7
C3-3, C4-3, C4-8, C4-12, S25, S47	2.8
C1-3, C4-10, S48	2.9

<sup>1</sup> เฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวศวดี อุดมพิทักษ์เดชา
วัน เดือน ปีเกิด	27 มีนาคม 2525
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น จากโรงเรียนพระหฤทัย เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2537  สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนปิ่นสร้อยแยลส์วิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2539  สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2547

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved