ภาคผนวก

1. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา** Potato Dextrose Agar (PDA)

ละลาย PDA 39 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ก่อนเทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 8 มิลลิลิตร

2. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา** Potato Dextrose Broth (PDB)

ละลาย PDB 24 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตรแล้วนำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงก่อนเทใส่ขวดเลี้ยงเชื้อราขวดละ 150 มิลลิลิตร

3. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา** Lima bean agar

ละลาย Lima bean agar 23 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงก่อนเทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละ 8 มิลลิลิตร

4. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา 10 % ถั่วซีก**

ต้มถั่วซีก 100 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร จนเปื่อยจากนั้นนำไปปั่นด้วย blender กรองสารละลายที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น เติมผงวุ้น 1.5 กรัม ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงก่อนเทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละ 8 มิลลิลิตร

5. **การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน** (BSA)

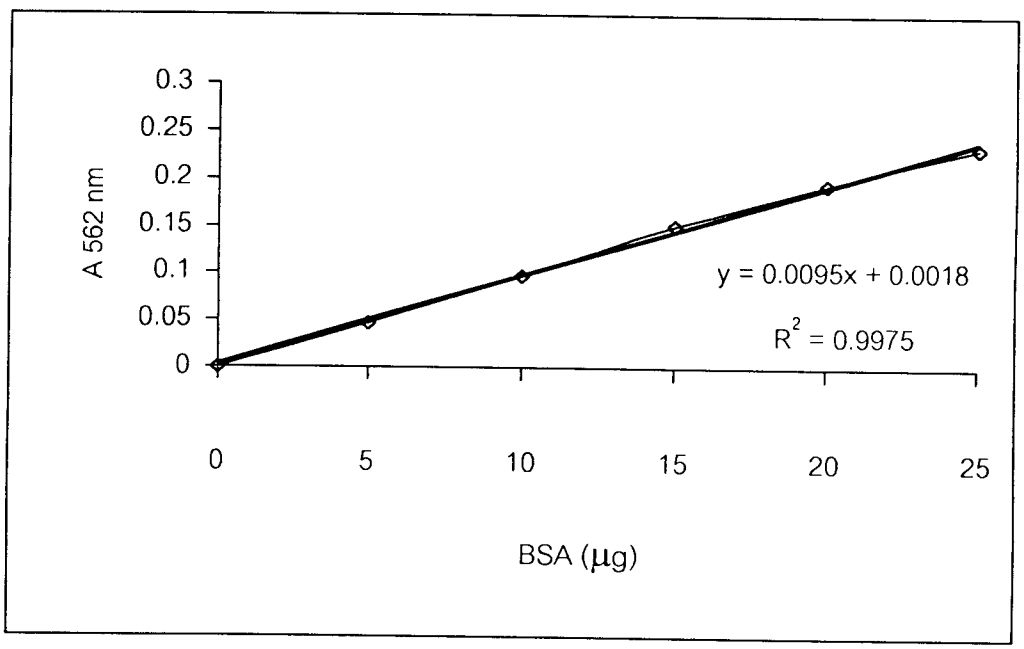
ละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) จำนวน 0.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จะได้โปรตีน BSA ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของ BSA เท่ากับ 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตรตามลำดับ

6. **การเตรียมสารละลาย C**

เตรียมโดยการผสมกันระหว่างสารละลาย A ซึ่งประกอบด้วย 1% (w/v) BCA-Na_2, 2% (w/v) sodium carbonate, 0.16% (w/v) sodium tartrate, 0.4% (w/v) sodium hydroxide และ 0.95 % (w/v) sodium bicarbonate 100 ส่วน ผสมกับสารละลาย B คือ 4 % (w/v) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2 ส่วน สารละลาย C ที่ได้จะมีสีเขียวและมีความเสถียรไม่เกิน 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง (Smith *et al.*, 1985)

7. **การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีใช้กรดไบซินโคนินิค**

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Smith *et al.* (1985) โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตรทำปฏิกิริยากับสารละลาย C ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง โดยนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐานเปรียบเทียบ



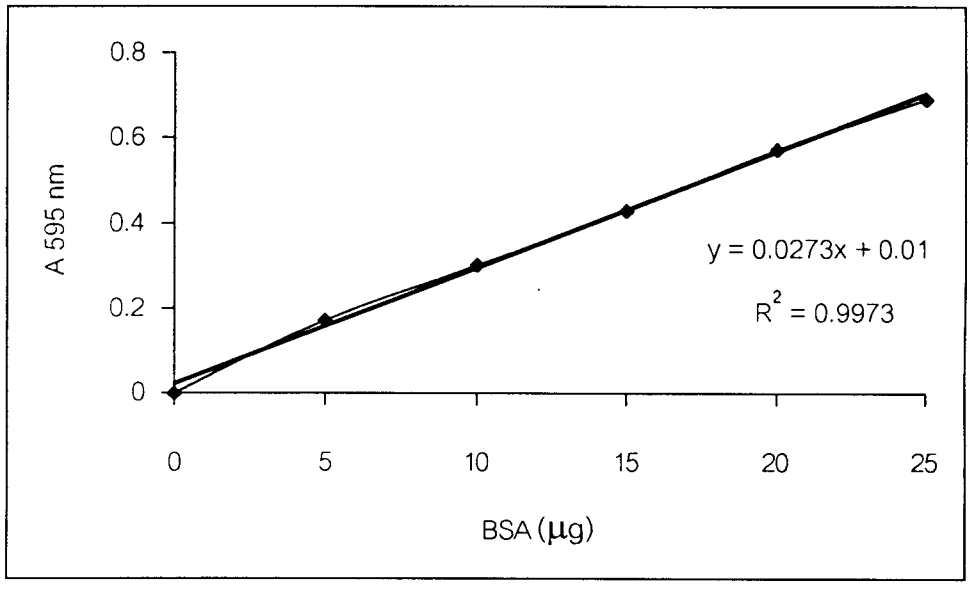
กราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA) โดยใช้ปริมาณของโปรตีน BSA เป็น 5, 10, 15, 20, และ 25 ไมโครกรัม อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร

8. การเตรียมสารละลายแบรดฟอร์ด

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 จำนวน 100 มิลลิกรัมใน 95 % ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 85 % phosphoric acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตรคนให้เข้ากันแล้วเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร กรองก่อนนำไปใช้

9. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด

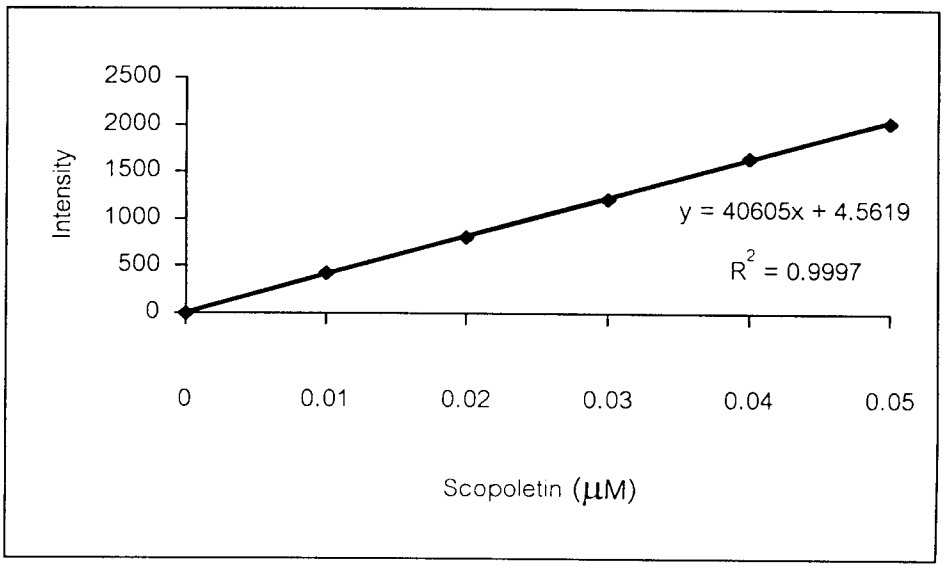
หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตรทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA



กราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA) โดยใช้ปริมาณของโปรตีน BSA เป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัม อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

10. การเตรียมสคอพอลิตินมาตรฐาน

ละลายสคอพอลิติน จำนวน 96.1 มิลลิกรัมใน 95% เอทานอล 10 มิลลิลิตร จะได้สคอพอลิติน ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำการเจือจางสารละลายสคอพอลิตินแบบ serial dilution ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสคอพอลิตินเท่ากับ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ excitation) 340 นาโนเมตรและความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) 440 นาโน-เมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน (Scp) (ไฟโตเอ็ก-ซินที่พบในใบยางพารา)



กราฟมาตรฐานสคอพอลิติน โดยใช้ความเข้มข้นของสคอพอลอตินเป็น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 ไมโครโมลาร์ อ่านค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 340 นาโนเมตร (λ excitation) และความยาวคลื่นปลดปล่อย 440 นาโนเมตร (λ emission) ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน

11. การเตรียมลามินาริน

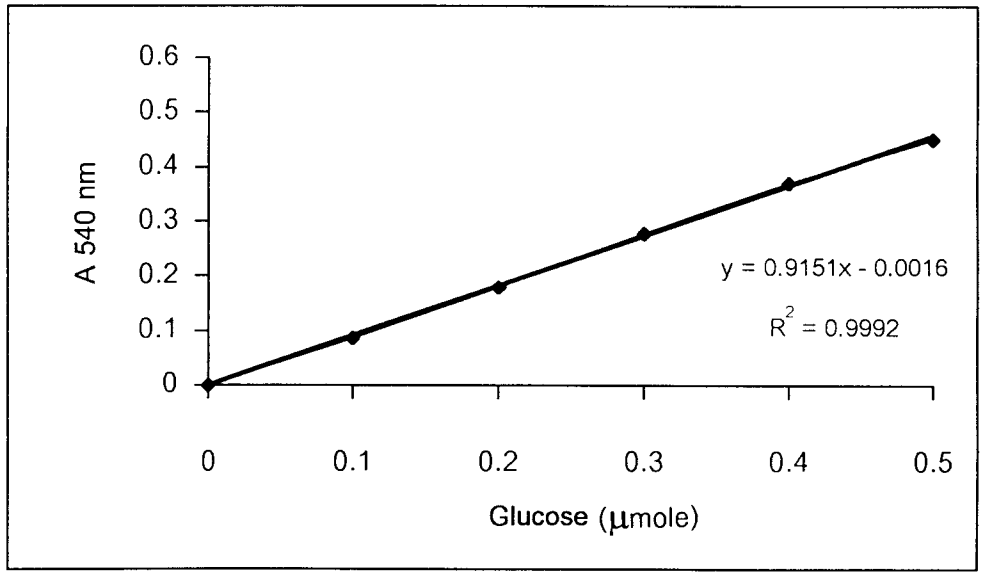
ละลายลามินารินจำนวน 0.1 กรัมใน 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้สารซับสเตรตที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

12. การเตรียมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS)

ละลาย DNS 5 กรัมใน 2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายโซเดียมโปตัสเซียมทาร์เตรต (จำนวน 150 กรัมซึ่งละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร) ลงไปในขณะที่ยังร้อนอยู่คนให้เข้ากันแล้วเติมน้ำให้ครบ 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง (Burner, 1964)

13. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ละลายน้ำตาลกลูโคสจำนวน 1.94 กรัมใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้ 0.1 M ของน้ำตาลกลูโคส หลังจากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ไมโครโมลต่อ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ นำ 100 ไมโครลิตรของแต่ละความเข้มข้นไปเติมสารละลาย DNS 0.2 มิลลิลิตร และ 0.1 M โซเดียมอะซิเตต pH 5.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที เติมน้ำกลั่นอีก 0.9 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ไมโครโมล อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

14. การเตรียม Colliodal chitin

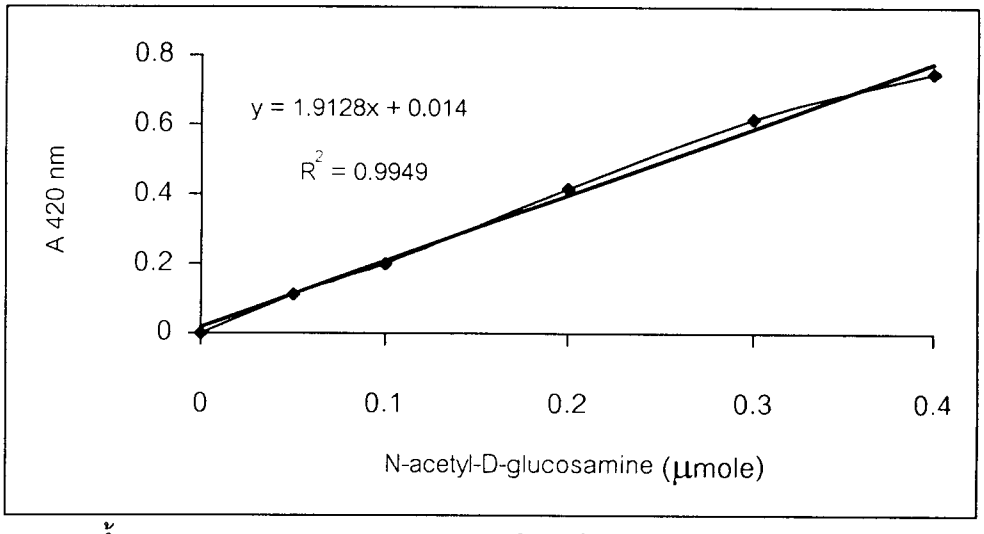
ละลายผงไคติน 10 กรัมในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 200 มิลลิลิตรคนด้วยแท่งแก้วจนผงไคตินละลายหมด ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสตลอดคืนแล้วเทสารละลายที่ได้ลงใน 600 มิลลิลิตรของ 50 % เมธานอลซึ่งเย็นจัดหลังจากคนแรงๆตะกอนของไคตินจะค่อยๆตกลงมา จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองด้วย suction flask แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำปลอดไอออน จนน้ำที่ล้างมี pHประมาณ 7 ดูดด้วยเครื่องปั๊มสูญญากาศจนตะกอนจับตัวกันแน่นชั่งน้ำหนักของตะกอนเปียกที่ได้แล้วเตรียมไคตินให้มีความเข้มข้น 1% (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

15. การเตรียมสารละลาย Schales (Schales reagent)

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 5.295 กรัม ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร เติมโปตัสเซียมเปอร์ไซยาไนด์ 0.05 กรัม ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

16. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine

ละลาย N-acetyl-D-glucosamine (น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 221.2) จำนวน 110.6 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้ 50 มิลลิโมลาร์ ของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine หลังจากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ไมโครโมลต่อ 100 ไมโครลิตรตามลำดับ นำ 100 ไมโครลิตรของของแต่ละความเข้มข้นมาเติม 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 650 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Schales อีก 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร



กราฟมาตรฐานน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine โดยใช้ความเข้มข้นเป็น 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ไมโครโมล อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร