ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YA

ส่วนประกอบอาหาร 1 ลิตร

Carbon source		
1. D – glucose	10	กรัม
Nitrogen source		
2. $(NH_4)_2SO_4$	5	กรัม
Salts		
3. $CaCl_2.2H_2O$	0.1	กรัม
4. KH_2PO_4	1	กรัม
5. $MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
6. NaCl	15	กรัม
Amino acids		
7. DL-methionine	20	มิลลิกรัม
8. DL-tryptophan	20	มิลลิกรัม
9. L-histidine .HCl.H_2O	10	มิลลิกรัม
Compounds supplying trace elements		
10 $CuSO_4$. $5H_2O$.	40	ไมโครกรัม
11. $FeCl_3.6H_2O$	200	ไมโครกรัม
12. H_3BO_3	500	ไมโครกรัม
13. KI	100	ไมโครกรัม
14. $MnSO_4.H_2O$	400	ไมโครกรัม
15. $Na_2MoO_4.2H_2O$	200	ไมโครกรัม
16. $ZnSO_4.7H_2O$	400	ไมโครกรัม

Vitamin

17. Biotin	2	ไมโครกรัม
18. Calcium pantothenate	400	ไมโครกรัม
19. Folic acid	2	ไมโครกรัม
20. Inositol	2,000	ไมโครกรัม
21. Niacin (Nicofinamide)	400	ไมโครกรัม
22. P – aminobenzoic acid	200	ไมโครกรัม
23. Pyridoxine . HCl (B_6)	400	ไมโครกรัม
24. Riboflavin (B_2)	200	ไมโครกรัม
25. Thiamine. HCl (B_1)	400	ไมโครกรัม

ชั่งสารข้อ 1, 2, 3 และ 5 ยกเว้นข้อ 4 และ 6 แล้วเติม yeast extract ลงไป คนให้ละลายแล้วจึงเติม stock dilution ของ Compounds supplying trace elements, $MgSO_4.7H_2O$ และ $CaCl_2.2H_2O$ เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร โดยปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 4.5 – 6.5 เติมวุ้น 15 กรัม/ลิตร ทำให้ละลาย ทำให้ปราศจากเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเติม Amino acids และ Vitamin ซึ่งได้ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรอง

หมายเหตุ

1. เติม yeast extract 10 กรัม/ลิตร ผสมในอาหาร เมื่อ Amino acids ที่ใช้มีแต่ L

2. Compounds supplying trace elements ที่เตรียมแยกเป็น 2 กลุ่ม คือ สารตั้งแต่ข้อ 10 -16 ยกเว้น 13 และ $FeCl_3.6H_2O$ (เนื่องจากจะเกิดการตกตะกอนเมื่อผสมกับตัวสารอื่น ๆ)

ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป

1. Casein hydrolysis/ skim milk agar

Skim milk 10 %	10	มิลลิกรัม
MRS agar	990	มิลลิกรัม

เตรียม MRS agar ที่มีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร แต่เติมน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเตรียมสารละลาย skim milk 10% นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110°C ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเทสารละลาย skim milk ผสมลงใน MRS agar ปราศจากเชื้อผสมให้เข้ากันจึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. MRS (Man Rogosa and Sharpe)

Bromocresol purple	0.4	กรัม
Peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
K_2HPO_4	2	กรัม
Tween 80	1	มิลลิกรัม
Sodium acetate.$3H_2O$	5	กรัม
Diammonia citrate	2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	กรัม

Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH 6.0		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อนๆจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับการเตรียม MRS broth เตรียมเหมือนกับ MRS agar แต่ไม่ต้องเติม agar

3. Nutrient agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.2-7.4		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Tryptic Soy Agar (TSA)

Peptone from casein	15	กรัม.
Peptone from soymeal	5	กรัม.
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
NaCl	15	กรัม/ลิตร

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 40 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ต้มให้ละลาย pH 7.3±0.2 ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

5. Fowell's acetate agar

ละลาย sodium acetate trihydrate 5.0 กรัม ในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 6.5-7.0 เติมผงวุ้น 20.0 กรัม แล้วต้มจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Gorudkowa agar

Glucose	1 กรัม
NaCl	5 กรัม
Peptone	10 กรัม
Agar	20 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากัน แล้วต้มจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. 5% Malt extract agar

Malt extract	50 กรัม
Agar	20 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากัน แล้วต้มจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Urea agar

Peptone	1	กรัม
glucose	1	กรัม
NaCl	5	กรัม
KH_2PO_4	2	กรัม
Phenol red	0.012	กรัม
agar	20	กรัม

ละลายสารทั้งหมด แล้วปรับ pH เท่ากับ 6.8 แล้วจึงเติมวุ้น ต้มจนผงวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอด หลอดละ 4.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมสารยูเรียที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่าน membrane filter ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลอด ผสมให้เข้ากันและปล่อยให้แข็งในสภาพเอียง

9. Fermentation basal medium

Yeast extract	4.5 กรัม
peptone	7.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย bromothymol blue (ภาคผนวก ค) ใน fermentation basal medium ที่มีสีเขียวเข้ม แบ่งใส่หลอดทดสอบ หลอดละ 2 มิลลิลิตร ภายในมีหลอดดักแก๊ส (Durham tube) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบ ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่าน membrane filter ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อหลอด

10. Medium for Assimilation of carbon compound

Bacto yeast nitrogen base	6.7 กรัม
Sugar ที่จะใช้ทดสอบ	5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย membrane filter ใช้ปิเปตปราศจากเชื้อ ดูดอาหารที่ได้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดสอบ

11. Corn meal agar

Cornmeal, infusion form	50 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากัน แล้วต้มจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

12. Nitrate assimilation medium

Bacto yeast carbon base	11.7 กรัม
KNO_3	0.78 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายสารอาหารทั้งหมดในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองใช้ปิเปตปราศจากเชื้อดูดอาหารที่ได้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดทดสอบ

13. PDA

Potatose	4	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 แล้วต้มจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

14. PCA

Casein	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
dextrose	1	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 7.0 แล้วต้มจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

15. TCBS

Peptone from casein	5	กรัม
peptone from meat	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium citrate	10	กรัม
Sodium trio sulfate	10	กรัม
Ox bile dried	5	กรัม

Sodium cholate	3	กรัม
Sucrose	20	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
Iron(lll) citrate	1	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Bromothymol blue	0.04	กรัม
agar	14	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 8.6 แล้วต้มจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

16. Starch agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Soluble starch	2	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.2 และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

17. Tributyrin agar

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม

Tributyrin	10	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้น Tributyrin ด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี แล้วทำให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส ปรับ pH เป็น 7.4 แล้วใส่ Tributyrin ปั่นใน blender 10 นาที นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค. สารเคมีทั่วไป

1. Methylene blue

ละลาย methylene blue chloride 0.3 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2. Bromothymol blue

ละลาย Bromothymol blue 50 มิลลิกรัม ในน้ำปริมาตร 75 มิลลิลิตร วิธีนำไปใช้คือ ใส่ Bromothymol blue stock solution ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใน fermentation basal medium 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง การเตรียมสารเคมีสำหรับการนับปริมาณเม็ดเลือด

1. Trypan blue

เตรียม Trypan blue 0.15 g / 2.6 % NaCl โดยชั่ง Trypan blue 0.15 g ละลายในน้ำเกลือ 2.6 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นให้ละลายเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 2 จากนั้นนำไปปั่นด้วยเซนติฟิวจ์ที่ความเร็ว 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน อีกครั้งหนึ่ง แล้วแบ่งใส่ใน microtube หลอดละ 450 ไมโครลิตร แช่เย็นเก็บไว้จนกว่าจะใช้งาน

ภาคผนวก จ การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ฟีนอลออกซิเดสแอคติวิตี้

1. M-199

ใช้ 1 ซอง ละลายในน้ำกลั่น deionize sterilized 500 มิลลิลิตร เติม $NaHCO_3$ 2.2 g ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.6 นำไปกรองแล้วเก็บในตู้เย็น

2. K-199 ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- M-199	50	มิลลิลิตร
- salt mixture	10	มิลลิลิตร (ดูส่วนประกอบในข้อ 4)
- $CaCl_2 . 2H_2O$	10	มิลลิลิตร
- NaCl	10	มิลลิลิตร
- L-glutamine	1	มิลลิลิตร (เตรียมแช่แข็งเก็บไว้)
- Hepes	0.238	กรัม

เติมน้ำกลั่น deionize sterilized ปรับให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 7.6 กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 μm

3. Cacodylate buffer (CAC buffer) : ใน 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- Na Cacodylate	1.07	กรัม
- $CaCl_2$	0.37	กรัม
- $MgCl_2$	5.08	กรัม

ละลาย Cacodylate buffer ในน้ำกลั่น deionize sterilized แล้วเติม $CaCl_2$ ปั่นให้ละลายแล้วเติม $MgCl_2$ เมื่อละลายแล้วปรับ pH ให้ได้ 7.0 ไม่ต้องกรอง เก็บไว้ในตู้เย็น

*** CAC buffer** ที่ใช้เตรียมสาร เมื่อนำออกมาจากตู้เย็น ควรตั้งไว้ให้เท่ากับอุณหภูมิห้องก่อน

4. Stock solution

salt mixture : ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- KCl	0.4	กรัม

- $MgSO_4 .7H_2O$ 3 กรัม

- $MgCl_2.6H_2O$ 3.3 กรัม

- $NaH_2PO_4.2H_2O$ 0.05 กรัม

$CaCl_2.2H_2O$: ชั่ง 0.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่น deionize sterilized 100 มิลลิลิตร

NaCl ชั่ง 11 g ละลายในน้ำกลั่น deionize sterilized 100 มิลลิลิตร

L – glutamine ชั่ง 0.015 g ใส่ใน microtube ละลายในน้ำกลั่น deionize sterilized 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหลอดละ 1 มิลลิลิตร แช่แข็งไว้ แล้วแบ่งมาใช้ตามต้องการ

5. L- cysteine 3 %

ชั่ง 0.03 กรัม ใส่บีกเกอร์ละลายใน K-199 1 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.6 แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 μm แช่เย็นไว้

6. Trypsin

ชั่ง 0.001 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง ละลายด้วย CAC buffer 1 มิลลิลิตร เขย่าจนกว่าละลายจนหมด กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 μm แช่เย็นไว้

7. L- DOPA

ชั่ง 0.003 กรัม ใส่ใสหลอดทดลอง ละลายด้วย CAC buffer 1 มิลลิลิตร เขย่าจนกว่าละลายจนหมด (เนื่องจากละลายยาก จึงควรแบ่งมาละลายครั้งละน้อย ๆ) กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 μm แช่เย็นไว้

8. Folin Reagent

นำมาเจือจาง 1 : 10 เก็บไว้ในตู้เย็น

9. Working Alkaline Copper Solution ประกอบด้วย

- 0.5 % $CuSO_4.5H_2O$ 1 ส่วน

- 1% NaKtatrate 1 ส่วน

- 1 % Na_2CO_3 ใน 0.5 N NaOH 50 ส่วน

0.5 % $CuSO_4.5H_2O$: เตรียมโดยชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ มา 0.015 กรัม ละลายในน้ำกลั่น deionize sterilized 3 มิลลิลิตร

1% NaKtatrate : เตรียมโดยชั่ง NaKtatrate มา 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่น deionize sterilized 3 มิลลิลิตร

1 % Na_2CO_3 ใน 0.5 N NaOH : เตรียมโดยต้มน้ำกลั่น deionize sterilized 100 มิลลิลิตร แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นสนิท แล้วใส่ NaOH 2 กรัม เมื่อละลายแล้วจึงเติม Na_2CO_3 ลงไป 1 กรัม ปั่นหรือคนให้ละลายจนหมด

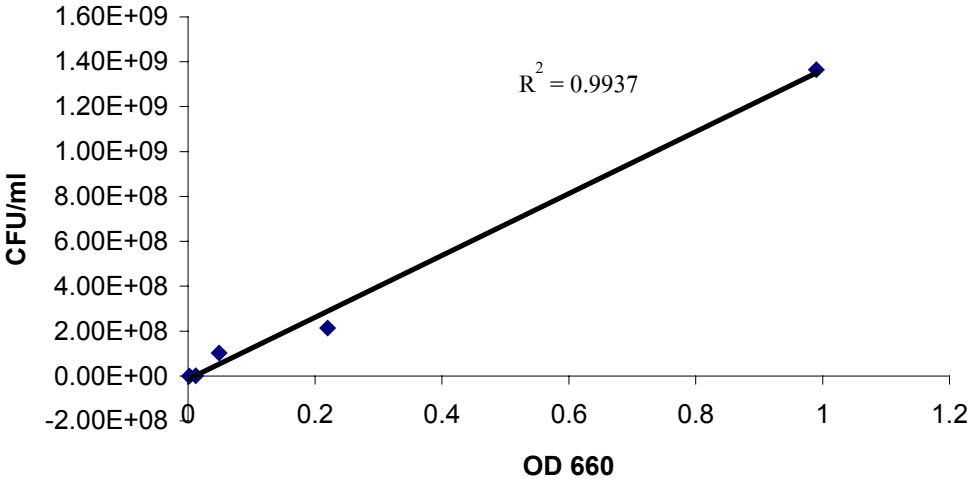
ผสมสารละลายทั้ง 3 อย่างรวมกันตามสัดส่วน จะได้ Working Alkaline Copper Solution เก็บไว้ใช้ได้

ภาคผนวก ฉ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเชื้อ *V. harveyi*

ขีดเชื้อ *V. harveyi* บน TSA + 1.5 % NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลง TSB + 1.5 % NaCl ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มใน incubater shaker ด้วยความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำเกลือ 1.5 % ในอัตราส่วน 1:5 จำนวน 5 หลอด นำทุกหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย 1.5 % NaCl เป็น Blank แล้วนำทุกหลอดมาทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี spread plate บนอาหาร TSA + 1.5 % NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ของ *V. harveyi* แล้วเขียนกราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ สำหรับใช้เป็นกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ดังตารางที่ 10 และรูปที่ 8

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณเชื้อ *V. harveyi*

ค่าการดูดกลืนแสง (660 nm)	จำนวนเซลล์ *V. harveyi* (CFU/ml)
0.990	1.37×10^{9}
0.220	2.14×10^{8}
0.049	1.03×10^{8}
0.012	1.77×10^{6}
0.002	3.27×10^{5}



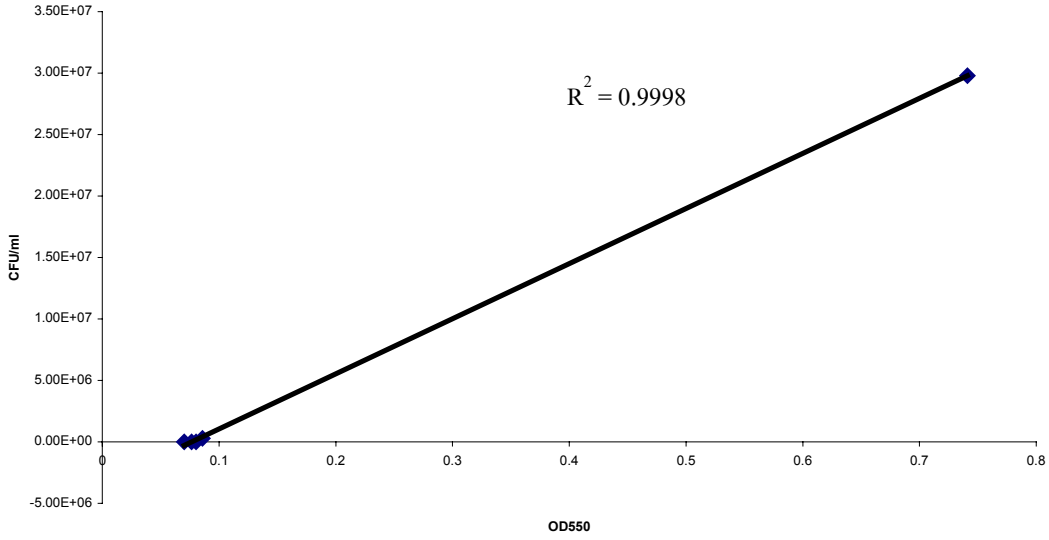
รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณเชื้อ *V. harveyi*

ภาคผนวก ช ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเชื้อ yeast

ขีดเชื้อ yeast บน PDA + 1.5 % NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลง PDB + 1.5 % NaCl ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มใน incubater shaker ด้วยความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำเกลือ 1.5 % ในอัตราส่วน 1:5 จำนวน 5 หลอด นำทุกหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย 1.5 % NaCl เป็น Blank แล้วนำทุกหลอดมาทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี spread plate บนอาหาร PDA + 1.5 % NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ของ yeast แล้วเขียนกราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ สำหรับใช้เป็นกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณเชื้อ yeast ดังตารางที่ 11 และรูปที่ 9

ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณเชื้อ yeast

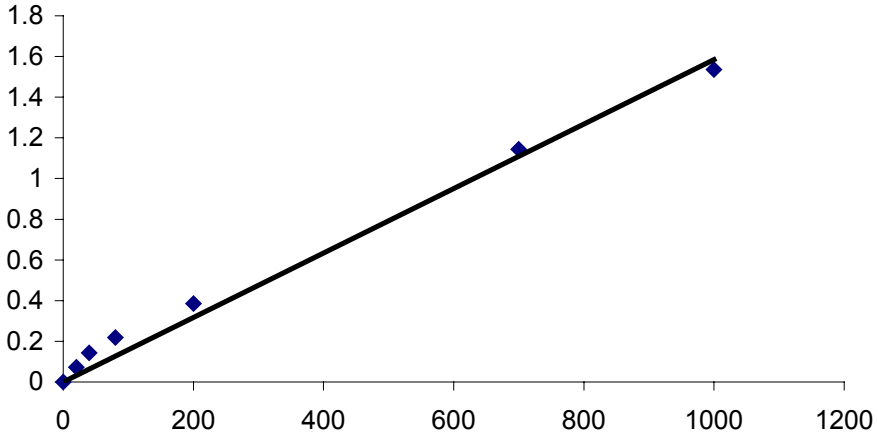
ค่าการดูดกลืนแสง (550 nm)	จำนวนเซลล์ yeast (CFU/ml)
0.741	2.98×10^{7}
0.086	3×10^{5}
0.040	1.37×10^{3}
0.011	160
0.004	20



รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณเชื้อยีสต์

ภาคผนวก ซ กราฟแสดงค่าแอลบูมินมาตรฐาน โดยวิธีการของ Lowry *et al,* (1951) ที่ดัดแปลงโดย กิจการ และคณะ (2543)

ดูดส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงเซลล์เม็ดเลือดที่ทำให้แตกแล้ว (จากขั้นตอนการหาความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส) มา 100 ไมโครลิตร ผสมรวมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 900 ไมโครลิตร เติม alkaline copper solution 2 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม folin reagent 1:10 ลงไป 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยน้ำกลั่นที่เติมสารเช่นเดียวกันกับตัวอย่างเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหาปริมาณโปรตีน (mg protein) โดยเปรียบเทียบกับค่าแอลบูมินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0 20 40 80 100 200 400 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ซ)



รูปที่ 9 กราฟแสดงค่าแอลบูมินมาตรฐาน

ภาคผนวก ฌ ผลทดสอบทางชีวเคมีของยีสต์ (+ หมายถึงยีสต์มีการใช้น้ำตาล - หมายถึงยีสต์ไม่มีการใช้น้ำตาล)

รหัสเชื้อ	ลักษณะเซลล์	Fermentation					Assimilation						ยูเรีย	ไนเตรท
		maltose	lactose	glucose	galactose	surcrose	xylose	maltose	lactose	surcrose	galactose	glucrose		
AJ 43	โคโลนีเรียบขอบเรียบ	-	-	-	-	-	+	±	-	±	±	+	+	+
AJ 70	โคโลนีเรียบขอบเรียบ	-	-	+	-	-	-	+	±	+	+	+	-	+
AJ 98	โคโลนีเรียบ	-	-	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+

AJ 176	โคโลนีเรียบขอบเรียบ	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
AJ 179	โคโลนีเรียบขอบเรียบ	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
AJ 181	โคโลนีเรียบขอบเรียบ	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
AJ 188	โคโลนีเรียบขอบเรียบ	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

ภาคผนวก ญ คุณสมบัติของยีสต์ที่คัดเลือกได้

Yeasts	Description	Where found
Cryptococcus sp. AJ43	Pink to red, butyrous colonies : vegetative reproduction by budding	1. Dew – retted flax straw in Denmark 2. flower of Adonis vernalis 3. chicory cichorium intybus, stag axis in france
Candida sp. AJ70	White to cream, butyrous colonies, vegetative reproduction by budding	1. Fermenting cucumber brines in USA 2. Soybean mash in Japan and Taiwan, Sugar
Cryptococcus sp. AJ98	Cream, butyrous colonies, vegetative reproduction by budding	1. Scum on water of Malham Tarn in UK
Stengmatomyces sp. AJ176	Cream, butyrous colonies, vegetative reproduction by budding	1. Groin of man with seborrhoeic eczema in Finland 2. flour and atmosphere in a French bakery
Pichia sp. AJ179	Budding cell	1. tree, water, flower
Rhodotorula sp. AJ181	White to cream, butyrous colonies, vegetative reproduction by budding	1. Tunnels of pin-borer beetles *Xyleborus aemulus* in south africa
Malassezia sp. AJ188	Cream to tan, butyrous colonies, vegetative reproduction by budding	1. Axilla of healthy beagle dog in UK, Sweden Netherlands

ที่มา : Kurtzman and Fell (1998)