

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสูตร Horikoshi II agar สำหรับการคัดแยกเชื้อ (screening) ประกอบด้วย

- Soluble starch	1.00	กรัม
- Yeast extract	0.50	กรัม
- Peptone	0.50	กรัม
- K_2HPO_4	0.02	กรัม
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02	กรัม
- Phenolphthalein	0.02	กรัม
- Na_2CO_3	1.00	กรัม
- Agar	1.50	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 10.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตร Horikoshi II medium สำหรับการเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi II medium ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 10.0 โดยไม่เติม phenolphthalein และ agar จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

3. สารละลายบัฟเฟอร์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการคือ 4.0, และ 5.0

- สารละลาย A : 0.1 M sodium acetate (ละลาย CH_3COONa 1.64 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)
- สารละลาย B : 0.1 M acetic acid (ผสม CH_3COOH เข้มข้น ปริมาตร 1.15 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

3.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับ สารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการคือ 6.0, 7.0 และ 8.0

- สารละลาย A : 0.1 M monobasic sodium phosphate (ละลาย $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.12 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

- สารละลาย B : 0.1 M dibasic sodium phosphate (ละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.37 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

3.3 สารละลายไกลซีน – โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (glycine – NaOH buffer) เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ คือ 8.5, 9.0 และ 10.0

- สารละลาย A : 0.1 M glycine (ละลาย $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 1.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

- สารละลาย B : 0.1 M sodium hydroxide (ละลาย NaOH 0.8 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

4. การเตรียม Stock enzyme glucoamylase ให้มีกิจกรรม 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

enzyme glucoamylase บริษัท Fuka

enzyme glucoamylase มีกิจกรรม 21,100 ยูนิตต่อกรัม

กิจกรรม 21,100 ยูนิต ใช้ เอนไซม์ 1 กรัม

กิจกรรม 500 ยูนิต จะต้องใช้เอนไซม์ 0.024 กรัม

หรือเท่ากับเอนไซม์ 0.024 กรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง enzyme glucoamylase 0.480 กรัม ละลายในสารละลาย 0.02 M อะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิลิตร

5. จุดอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต

Final concentration of ammonium sulphate % saturation

	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
	Grams solid ammonium sulphate to be added to 1.0 L of solution																
0	56	144	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	622	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	618
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30					19	30	62	94	127	162	198	265	273	314	356	449	516
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
50										33	66	101	137	176	214	302	392
55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314
65													34	70	107	109	275
70														35	72	153	237
75															36	115	198
80																77	157
90																	79