ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 APT (All Purpose Tween) broth

ประกอบด้วย

Bacto yeast extract	7.5	กรัม
Bacto tryptone	12.5	กรัม
Bacto dextrose	10	กรัม
Sodium citrate thiamine	5	กรัม
Hydrochloride	0.001	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium phosphate	5	กรัม
Manganese chloride	0.14	กรัม
Magnesium sulfate	0.8	กรัม
Ferrous sulfate	0.04	กรัม
Sorbitan monooleate complex	0.2	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

หมายเหตุ : ATP Agar เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ ATP broth แต่เติม Bacto agar 1.5 %

1.2 CJ (Coconut Juice) Broth

ประกอบด้วย

Pepton	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม

Sodium acetate	5	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
น้ำมะพร้าวแก่	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

หมายเหตุ : CJ Agar เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ CJ broth แต่เติม Bacto agar 1.5 %

1.3 MRS (de, Man and Rogosa and Sharpe) broth

ประกอบด้วย

Bacto protease peptone NO.3	10	กรัม
Bacto beef extract	10	กรัม
Bacto yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Sorbitan monoleate complex	1	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Potassium phosphate, dibasic	0.05	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

หมายเหตุ : MRS Agar เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ MRS broth แต่เติม Bacto agar 1.5 %

1.4 TGE (Trypticase Glucose Yeast Extract) Broth

ประกอบด้วย

Trypticase	10	กรัม

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Tween 80	2	มิลลิลิตร
Manganese	0.033	มิลลิโมลาร์
Magmesium	0.02	มิลลิโมลาร์
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

หมายเหตุ : TGE Agar เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ TGE broth แต่เติม Bacto agar 1.5 %

1.5 TJ (Tomato Juice) Broth

ประกอบด้วย

Tomato juice (400 ml)	20	กรัม
Bacto peptone	10	กรัม
Peptonized milk	10	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

หมายเหตุ : TJ Agar เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ TJ broth แต่เติม Bacto agar 1.5 %

1.6 BHI (Brain Heart Infusion) Soft Agar

ประกอบด้วย

Calf brains, infusion form	200	กรัม
Beef heart, infusion form	250	กรัม
Bacto protease peptone	10	กรัม
Bacto dextrose	2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม

Disodium phosphate	2.5	กรัม
Bacto agar	7.5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

1.7 NA (Nutrient Agar)

ประกอบด้วย

Bacto beef extract	3	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
Bacto agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

2. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับใช้ในการศึกษาเอนไซม์

Phosphate buffer

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ปริมาตรต่างๆ ตาม pH ที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.2 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4 . 2H_2O$ 31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4 . 7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4 . 12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)	pH

87.7	12.3	6.0
85.0	15.5	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51.5	48.5	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5

ภาคผนวก ข

1. การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำส่วนใสปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยแบ่งระดับความอิ่มตัวต่าง ๆ คือ 0-30 % , 30- 50 % , 50 - 70 % และ 70-90 % โดยค่อย ๆ เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ละน้อยอย่างช้า ๆ ขณะกวนด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิ 4 °ซ เมื่อเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในระดับความอิ่มตัวที่ต้องการละลายหมด จะสังเกตเห็นโปรตีนตกตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที และนำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 หลังจากนั้นนำส่วนใสมาเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวเป็น 50, 70 และ 90 % แล้วปั่นแยกตะกอนของโปรตีนเช่นเดิมจนครบความเข้มข้นที่ต้องการ

ตารางที่ 23 ปริมาณแอมโนเนียมซัลเฟต (กรัม) ที่ใช้เติมในสารละลาย 1 ลิตรและเปอร์เซ็นต์ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

From % ↘	To % →	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0		27	55	84	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
	5		27	56	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
		10		28	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
			15		28	58	88	119	151	185	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
				20		29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
					25		29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
						30		30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
							35		30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
								40		31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
									45		31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
										50		32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
											55		33	66	101	138	175	215	256	298	343
												60		33	67	103	140	179	219	261	305
													65		34	69	105	143	183	224	266
														70		34	70	107	146	186	228
															75		35	72	110	149	190
																80		36	73	112	152
																	85		37	75	114
																		90		37	76
																			95		38

ที่มา : Scope (1978)

2. การหาน้ำหนักแห้งของเชื้อ *L. plantarum* A49a (วัดการเจริญของเชื้อ)

ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์แบคทีเรีย *L. plantarum* A49a ที่ได้จากการเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ครั้งละ 5 มิลลิลิตร ทำเวลาละ 3 ซ้ำใส่ในหลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ต่ออีก 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้จากการปั่นล้างเข้าอบที่อุณหภูมิ 90 °ซ จนกระทั่งได้น้ำหนักเซลล์แห้งที่แน่นอน