

ก.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง Inhibitory Mold Agar-2 (IMA-2) ปริมาตร 1 ลิตร

ส่วนประกอบ

Glucose	5	กรัม
Soluble starch	5	กรัม
Beef extract	1	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Casein Enzyme Hydrolysate Type II	2	กรัม
Sodium chloride	2	กรัม
Calcium carbonate	1	กรัม
Agar	15	กรัม

วิธีการ

ชั่งสารเคมีให้ได้ปริมาณที่ต้องการ นำสารเคมีข้างต้นมาละลายน้ำ และปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลว Inhibitory Mold Broth-2 (IMB-2) ปริมาตร 1 ลิตร

ส่วนประกอบ

Glucose	5	กรัม
Soluble starch	5	กรัม
Beef extract	1	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Casein Enzyme Hydrolysate Type II	2	กรัม
Sodium chloride	2	กรัม
Calcium carbonate	1	กรัม

วิธีการ

ชั่งสารเคมีตามสูตรข้างต้นมาละลายน้ำ และปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารแข็ง Potato Dextrose (PDA) ปริมาตร 1 ลิตร

ส่วนประกอบ

Potato Dextrose Agar	39	กรัม
----------------------	----	------

4. อาหารเหลว Potato Dextrose (PDB) ปริมาตร 1 ลิตร

ส่วนประกอบ

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม

วิธีการ

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นขนาด 2 x 2 เซนติเมตร นำไปต้มในน้ำกลั่น อัตราส่วนมันฝรั่งหนัก 200 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 15 นาที กรองแยกส่วนน้ำออกมา เติมน้ำตาลกลูโคส 20 กรัม ปรับปริมาตรด้วยกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเข้าหม้อนึ่งมาเชื้อแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) ปริมาตร 1 ลิตร

ส่วนประกอบ

Nutrient Agar	28	กรัม
---------------	----	------

6. อาหารแข็ง Chitin Selective Agar (Gomez และคณะ, 2004) ปริมาตร 1 ลิตร

ส่วนประกอบ

Colloidal chitin	20	กรัม
Diammonium citrate	0.625	กรัม
Sodium chloride	0.250	กรัม
Potassium hydrogen phosphate	0.375	กรัม
Magnesium sulphate	0.125	กรัม
Sodium carbonate	0.375	กรัม
Agar	15	กรัม

การเตรียม Colloidal chitin (ดัดแปลงจาก Gomez และคณะ, 2004)

นำ Chitin ผง หนัก 10 กรัม มาผสมกับ Phosphoric acid ความเข้มข้นร้อยละ 85 ต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) คนตลอดเวลาด้วยเครื่อง Stirrer นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำออกมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนได้ pH 6.5

วิธีการ

ชั่งสารเคมีให้ได้ปริมาณที่ต้องการ นำสารเคมีดังกล่าวมาละลายน้ำและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก. 2 การเตรียมสารละลาย Benomyl 200 ppm. ปริมาตร 1 ลิตร

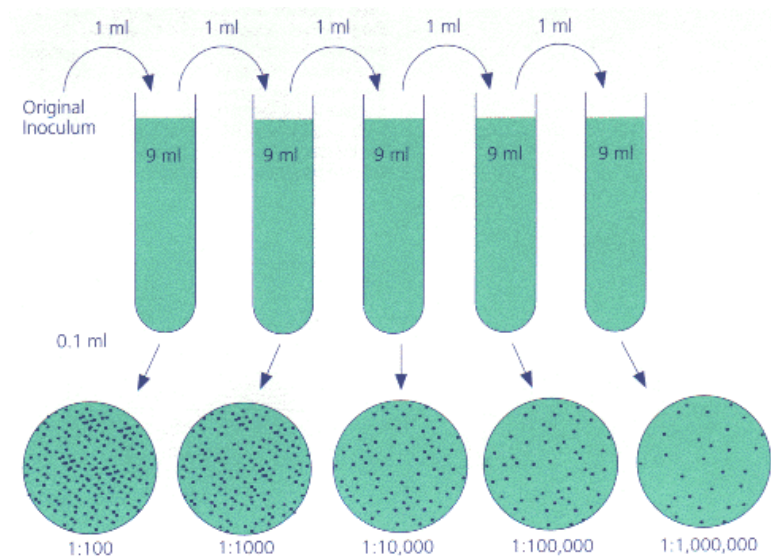
ชั่ง Benomyl หนัก 0.4 กรัม (ค่า active ingredient (a.i.) เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์) ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย Benomyl ความเข้มข้น 200 ppm.

ก. 3 การทำ Serial dilutions plate count

นำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท F3 ที่อ่านค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 0.5 และเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ที่เตรียมได้จาก นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. จำนวน 10 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหาร PDB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการบ่มภายใต้สภาวะเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ New Brunswick Scientific รุ่น Innova 43R (Germany) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการปั่นเส้นใยด้วยเครื่อง Homogenizer ยี่ห้อ Heidolph รุ่น Silent Crusher M (Germany) ที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำมาทำ serial dilution plate count ดังรูปที่ ก. 1 ใช้อาหาร IMA-2 สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *Streptomyces* sp. และอาหาร PDA สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน นำมาคำนวณหาความเข้มข้นเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *Streptomyces* sp. และเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ดังสูตรต่อไปนี้

Number of Microbial (cfu/ml for bacteria and colony/ml for fungi)

= Number of colonies x Dilutions of sample



รูปที่ ก. 1 การทำ Serial dilutions plate count สำหรับหาความเข้มข้นเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. และเชื้อรา *Rhizoctonia* sp.

(Online :<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/microbiology/learning-center/theory/introduction.html>)

ก. 4 การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ในน้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. และในใบกวาดุ้ง

Colloidal chitin (ดัดแปลงจาก Gomez และคณะ, 2004)

นำผง Chitin จำนวน 10 กรัม ในบีกเกอร์ จากนั้นเติม Phosphoric acid ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) โดยคนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนสารละลาย นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำ chitin ที่ได้ซึ่งจะมีลักษณะหนืดและข้น นำมาเติมน้ำปริมาตร 2 ลิตร ลงในบีกเกอร์จะได้ chitin ที่มีลักษณะเป็นของเหลวขุ่น (colloidal chitin) นำมากรองด้วยผ้าขาวบางและล้างด้วยน้ำกลั่นจนได้ pH 6.5 จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำมาปั่นด้วย Blender ให้ Chitin มีลักษณะเป็นผงละเอียด

สารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS)

นำ Sodium hydroxide จำนวน 1.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Dinitrosalicylic acid จำนวน 0.9 กรัม ละลายให้เข้ากันแล้วเติม Potassium sodium tartate จำนวน 28.22 กรัม คนให้

สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย Citrate buffer (pH 6.0)

เตรียมสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 95 มิลลิลิตร (สารละลาย A) และสารละลาย Sodium phosphate monobasic ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 415 มิลลิลิตร (สารละลาย B) จากนั้นนำสารละลาย A และสารละลาย B มาผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร และปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 6.0 ด้วยสารละลาย Sodium hydroxide 10 โมลาร์ จากนั้นเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

ก. 5 การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonialyase (PAL) (ดัดแปลงจาก Zucker, 1968)

สารละลาย Sodium borate buffer pH 8.0

เตรียมสารละลาย Boric acid ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (สารละลาย A) จำนวน 1,000 มิลลิลิตร และสารละลาย Sodium borate ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (สารละลาย B) จำนวน 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลาย B ใส่ในสารละลาย A ปรับให้ได้ pH 8.0 ด้วยเครื่อง pH meter แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลาย Phenylalanine ความเข้มข้น 10 โมลาร์

ชั่ง phenylalanine จำนวน 161.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ก. 6 การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-Glucanase (Salles และคณะ, 2002)

สารละลาย Somogyi's reagent

สารละลาย I: ชั่ง Sodium sulphate จำนวน 228 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้น เติม Potassium sodium tartrate จำนวน 24 กรัม Sodium carbonate จำนวน 48 กรัม และ Sodium hydrogen carbonate จำนวน 32 กรัม ละลายให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำต้มให้ได้ 1600 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย II: ชั่ง Sodium sulphate จำนวน 72 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Copper sulphate จำนวน 8 กรัม ละลายให้สารละลายทั้งหมดเข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำต้มให้ได้ 400 มิลลิลิตร

การนำไปใช้: ผสมสารละลาย I และ สารละลาย II ในอัตราส่วน 4:1

สารละลาย Nelson's reagent

ชั่ง Ammonium molybdate จำนวน 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,800 มิลลิลิตร เติม sulfuric acid (conc.) จำนวน 84 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Sodium hydrogen arcinate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ละลาย Sodium hydrogen arcinate จำนวน 12 กรัมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร) ละลายส่วนผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง (ไม่ควรเก็บสารละลาย Nelson's ไว้เกิน 68 ชั่วโมง)

สารละลาย Laminarin ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์

ชั่ง Laminarin จำนวน 0.075 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

ก. 7 การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

Coomassie Brilliant blue (Bradford, 1976)

ชั่ง Coomassie Brilliant Blue G250 จำนวน 100 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย 95% Ethanol จำนวน 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรด 85% Phosphoric acid 100 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำสารละลาย Coomassie Brilliant Blue G250 จำนวน 150 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การหาปริมาณโปรตีน (Bradford, 1976)

ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดจำนวน 1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย Coomassie Brilliant Blue G250 จำนวน 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA เพื่อหาปริมาณโปรตีนสำหรับการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ PAL

การเตรียมโปรตีนมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Chitinase, β -1,3-Glucanase และ PAL
 ชั่งโปรตีนมาตรฐาน BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) จำนวน 25 มิลลิกรัม ละลายใน
 สารละลาย Sodium borate buffer pH 8 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มี BSA 1000
 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาทำให้เจือจางด้วย Sodium borate buffer จนได้ระดับ
 ความเข้มข้นเท่ากับ 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืน
 แสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ BSA ที่ต้องการ ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาตร BSA ที่ใช้จาก stock 1000 $\mu\text{g/ml}$ (ml)	ปริมาตรน้ำกลั่นที่ใช้ (ml)	ปริมาตรรวม (ml)
0	0	25	25
20	0.5	24.5	25
40	1	24	25
60	1.5	23.5	25
80	2	23	25
100	2.5	22.5	25