ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงที่ปราศจากไนโตรเจน (Koomnok, 2006)

Glucose	2.5	g
Mannitol	2.0	g
Sucrose	2.5	g
Sodium malate	3.0	g
K_2HPO_4	0.2	g
KH_2PO_4	0.6	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	g
$CaCl_2.2H_2O$	0.02	g
NaCl	0.02	g
Sodium lactate 60%(v/v)	5.0	ml
1.64% FeEDTA solution	4.0	ml
0.5% bromthymol blue (in 0.2 M KOH)	2.0	ml
Sterile filtrate vitamin solution	1.0	ml
Sterile filtrate micronutrient solution	2.0	ml
Distillation water	1,000	ml
	pH 6.5-7.0	

The vitamin solution (per 100 distilled water)

Biotin	10	mg
Pyridoxal-HCl	20	mg

The micronutrient solution (per 1,000 distilled water)

$CuSO_4.5H_2O$	0.04	g
$ZnS\ O_4.7H_2O$	0.12	g
H_2BO_3	1.40	g
$Na_2MoO_4.2H_2O$	1.00	g
$MnSO_4.H_2O$	1.175	g

Tris-YMRT medium (Jatish *el al.*, 2000)

Manitol	10.00	g
$CaCl_2.H_2O$	0.15	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.25	g
Tris : [hydroxy methyl] amino acid	1.21	g
Yeast extract	0.20	g
Tryptophane	0.102	g
Distillation water	1,000	ml

pH 6.8

* Tris : hydroxy methyl amino methan

Peptone-Yeast Extract (PYE) medium

Peptone	10	g
Yeast extract	5	g
NaCl	5	g
Distilled water	1000	ml
pH	7.2	

½ DYGS medium (Eckert *et al.*, 2001)

Glucose	1.0	g
Malate	1.0	g
Yeast extract	2.0	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	g
L-glutamic acid	1.5	g
PH	6.0	

Potato infusion agar (BMS)

Potatoes	200	g
malic acid	2.5	g
KOH	2.0	g
Sucrose	2.5	g
vitamin solution	1.0	ml

Carboxy methyl cellulose agar (CMC)

Solution A:		
Carboxy methyl cellulose	2.5	g
K_2HPO_4	1.5	g
NaCl	0.25	g
Distilled water	400	ml
Solution B:		
$MgSO_4.7H_2O$ solution	1.0	M
Solution C:		
$Na_2HPO_4.12H_2O$	3.0	g
NH_4Cl	5.0	g
Glycerol	2.5	g
Yeast extract	0.5	g
Agar	6.5	g
Distilled water	100	ml
Solution D		
$CaCl_2$	7.5	g
Distilled water	100	ml

เตรียมสารละลายและทำการฆ่าเชื้อสารละลายทั้ง 4 แยกจากกัน แล้วนำสารละลาย A และ C นำมาผสมกันกันในขณะร้อน โดยเติมสารละลาย B และสารละลาย D อย่างละ 1.0 มล. ลงในส่วนผสม

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินโดลอะซีติก (IAA production)

สารละลาย

Developing reagent : Salkovskii reagent

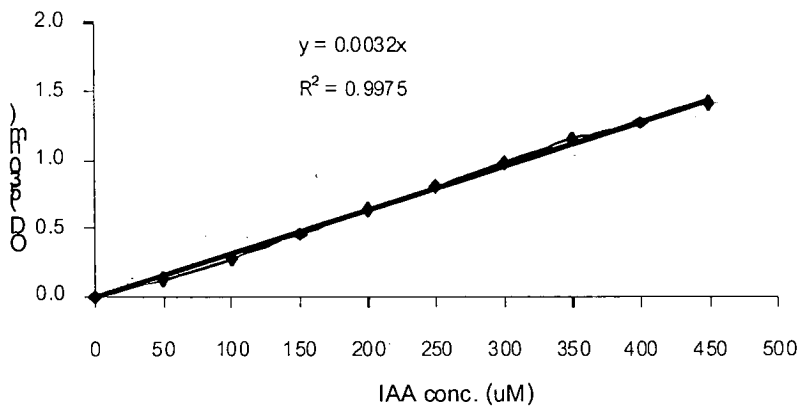
0.5 M $FeCl_3$	1.0	ml
35% $HClO_4$	50.0	ml

Standard IAA : Indole-acetic acid (MW = 175.19) 10 mM

IAA	0.1751	g
50% Methanol	100.0	ml

วิธีการวิเคราะห์

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1.0 มล. เติมลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย Salkovskii reagent 2.0 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปหาปริมาณ IAA โดยวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 530 nm. โดยเทียบค่ากับสารละลายมาตรฐาน IAA ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 and 450 µM.



ภาพที่ ผนวก-1 เส้นกราฟมาตรฐานของสารละลาย IAA

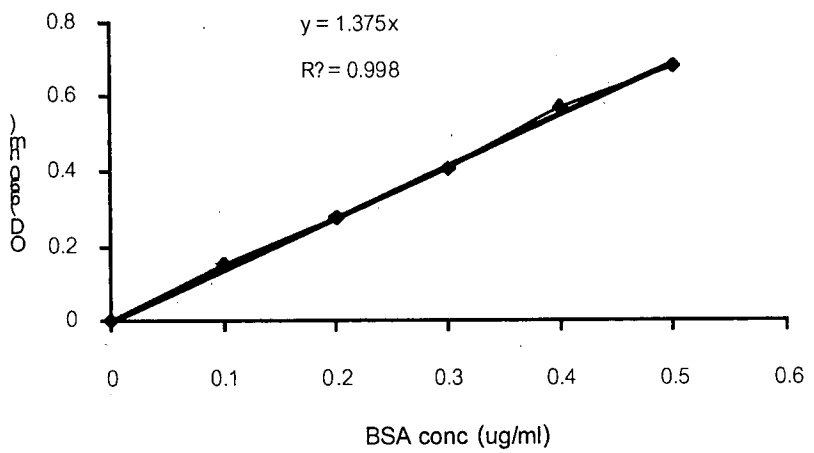
การวิเคราะห์โปรตีน

สารละลาย

สารละลาย A	$CuSO_4.5H_2O$	0.5	g
	$Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$	1.0	g
	Distillated water	100.0	ml
สารละลาย B	Na_2CO_3	20.0	g
	NaOH	4.0	g
	Distillated water	1,000.0	ml
สารละลาย C	สารละลาย A	1.0	ml
	สารละลาย B	50.0	ml
สารละลาย D	Folin Ciocalteau phenol reagent	10.0	ml
	Distillated water	10.0	ml

วิธีการวิเคราะห์

นำสารละลาย 0.5 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วจึงเติมสารละลาย C 2.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเติมสารละลาย D จำนวน 0.25 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปหาปริมาณโปรตีน โดยวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 nm เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 และ 450 µg/ml.



ภาพที่ ผนวก-2 เส้นกราฟมาตรฐานของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA).

การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน (Kjeldahl method)

ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 1 กรัม ใส่ในหลอดย่อยขนาด 100 มล. เติมกรดย่อย (salicylic acid 2.5% ใน conc. H_2SO_4) 4 มล. เขย่าให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง แล้วเติมกรด $Na_2S_2O_3.5H_2O$ ประมาณ 0.5 กรัม เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปให้ความร้อนบนเตาย่อยจนเกิดควันสีขาว จึงนำหลอดย่อยออกมาวางไว้ให้เย็นลงแล้วเติม catalyst (1.5 g K_2SO_4 + 0.0075 g Se) 1 เม็ด จากนั้นทำการย่อยจนได้สารละลายใน วางไว้ที่อุณหภูมิลดลงเท่ากับห้อง แล้วนำหลอดต่อเข้ากับเครื่องกลั่น เติม 4% NaOH ลงไป 50 มล. ทำการกลั่นประมาณ 5 นาที โดยจุ่มก้านคอนเด็นเซอร์ขวดลูกชมพู่ขนาด 250 มล. ซึ่งบรรจุสารละลาย H_3BO_3-indicator 25 มล. เพื่อจับ NH_3 ที่ได้จากการกลั่น จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วนำไปไตเตรทด้วย 0.05 N H_2SO_4 จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู