เอกสารอ้างอิง

พนา โลหะทรัพย์ทวี และ สัณห์ พนิชยกุล , หนังสือกำหนดการและบทคัดย่อการประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 15 , หน้า 661-617,2532.

Alfermann, W. , Reinhard, E. "Isolierung anthocyanhaltiger and anthocyanfreier Gewebestamme von Daucus carota : Einfluss von Auxinen auf die Anthocyanbilkdung, " Experienta , 27, 353-354, 1971.

Bader, S.M., Cachita-Cosma, D., and Cracium ,C. " Cellular ultrastructure in calluses of *Forsynthia suspensa* obtained from callus explants," Stud,Cercet.Biol, , Ser.Biol. Veg., 36, 53-56 , 1984.

Ball, E.A., Harborne, J.B. and Arditti, J. " Anthocyanins of *Dimorphotica (Compoisitae)* . I. Identity of pigments in flowers, stemp, and callus cultures," Am.J.Bot. , 59 , 924-930, 1982.

Berdick, M. Safety of food colors, Nutritional Toxicology Vol 1 Edited by Hathcock J.N., Acadamic Press, 1982.

Blieichert, E. and Ibrahim, R.K. " Flavonoids of *Parthenocissus* tissue culture, " Experienta, 30 , 104-105 , 1979.

Boure, A.R., Nelson, A.A. and Fitzhugh, O.G., Chronic toxicity of FD & C Orange no.1 Fed. Proc, 15 : 404. CA no.1315, 1956.

Brouillard , R. and Delaporte, B. J. Am. Chem. Soc. 998461, 1977.

Carew, D.P. and Krueger, R.J. "Anthocyanidins of *Catharanthus roseus* callus cultures," Phytochemistry , 15 , 442 , 1976.

Chi Bao Do and Girmier, F., "Effects of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera L.*) cell suspension cultured in a production medium, " Plant Cell ,Tissue and Organ Culture , 27, 169-174, 1991.

Colijn, C.M. Johnson, L.M.V. , Schram, A.W. and Kool , A.. " Synthesis of malvidin and petunidin in pigmented Tissue cultures of *Pitunia hybrida* ," Protoplasma , 107, 63-68 , 1981.

Concon, J.M. Food additives , Food toxicology Part B. : Contaminate and additives , Marcel Dekker, INC., 1988.

D'Amato ,F. "Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures," In : Plant Cell , Tissue and Organ Culture , ed.J. Reinert and Y.P.S. Bajaj, pp. 343-357 , Berlin , Heidelberg and New York : Springer Verlag, 1977.

Davis, K.J. " Chronic toxicity of Ponceau SX to rats, mice and dogs," Toxicol. Appl. Pharmacol. 8 : 306-317, 1966.

Davies, M.E. "Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's scaret rose, " Planta, 104 , 50-65, 1972.

Dobberstein, R.H. and Staba, E.J. "*Ipomoea*,*Rivea* and *Argyeia* tissue cultures: influence of various chemical factors on indole alkaloid production and growth," Lloydia, 32, 141, 1969.

Dougall, D.K. and Weyrauch, K.W. "Ability of organic acids to support growth and anthocyanin accuamulation by suspension cultures of wild carrot cells using ammonium as the sole nitrogen source," In vitro , 16 , 969-975, 1980.

Eriksson, T., "Studies on the growth requirements and growth measurements of cell culture of *Haplopappus gracilis*," Physiol. Plant., 18, 976,1965.

Food and agricultural organization. (1970) " Specification for the identity and purity of somefood colours, emulsifiers, stabilizers, anti-caking agents and certin other substances," Tech. Rep. Ser. No.46B. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.

Francis, F.J. Handbook of Food Colourant Patents : 1968-1985. Food and Nutritional Press, p.185, 1986.

Furia, T.E. ed. CRC Handbook of Food Additives. Vol. 1 2nd ed. New York : CRC Press , pp. 587-615, 1982.

Goodwin, T.W. and Mercer, E.I. Introduction to Plant Biochemistry Pergamon , Oxford, 1972.

Harborne, J.B. and Simmonds, N.W. " Potato cell and tissue culture ,"

Annu.Rep.John Innes Inst., 53 , 29-30 , 1962.

_____, J.B. , Arditti ,J. and BAll , E. "The anthocyanins of a callus culture from the stem of *Dimorphotheca auriculata* ," Am.J.Biot. , 57 , 763 , 1970.

_____, J.B., Mayer, A.M. and Bar-Nun , N. "Identification of the major anthocyanin of carrot cells in tissue cultures as cyanidin 3-(sinatoylxylosylglucosylgalactoside)Z," Naturforsch. C. Biosci. 38c, 1055-1056 , 1983.

Haung,L.C. and Murashinge,T. "Plant tissue culture media : major constituents, their preparatives and some applications ," Tissue Culture Assoc. Man. , 3 , 539, 1977.

Heminangson , J.C. and Collins ,R.P. "Anthocyanins present in cell cultures of *Daucus carita* ," J.NAt.Prod, , 45 , 385-389 ,1982.

Hirasuna, T.J., Shuler, M.L., Lackney , V.K., and Spanswick , R.M. "Enhanced Anthocyanin Production in Grape Cell Culture . Plant Science . 78: 107-120, 1991.

Hooker, B.S., Lee, J.M., and An, G. "Response of plant tissue culture to a high shear environment" Enzyme Microb. Technol., 11, 484-490, 1989

Horowitz, R.M. and Gentili, B. J.Agric. Chem. , 17 , 696-700, 1969.

Ibrahim, R.K. , Thakur, M.L. and Permanand , B. " Formation of anthocyanins in callus tissue cultures, " Lloydia, 34: 175-182, 1971.

Jain, S.C. and Sahoo, S.L. "Flavonoids profile in *Solanum* species *in vivo* and *in vitro.* ," In : Plant Tissue Culture (A. Fujiwara, ed.) , 353-354 , Maruzen, Tokyo, 1982.

Kamimura, S. and Nishikawa, M. "Growth and Alkaloid Production of the Cultured Cells of *Papaver bracteatum* . Agri. and Biol. Chem. 40: 907-911, 1976.

Kato, A.,Fukasawa, A.,Shimizu, Y.,Soh, Y., and Nagai, S., "Requirements of PO_4^{-3},NO_3^-,SO_4^-,K^+, and Ca^{2+} for the growth of tobaco cells in suspension culture," J. Ferment. Technol.,

55 :207,1977.

Knobloch, K.H., , BAst, G. and Berlin, J. "Medium and light induced formation of surpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus,*" Phytochemistry , 21, 591-594,1982.

Linsmaier,C.M. and Skoog,F. "Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures ,"Phisiol. Plant. , 18 ,100, 1965.

Lewke, B. and Forkmann, G. " Genetically controlled anthocyanin synthesis in cell cultures of *Matthiola incana ,"* Plant Cell Rep. , 1, 98-100 ,1982.

Markham, K.R., "Ultraviolet-visible Absorbtion Spectroscopy" In " Techniques of Flavonoid Identification " Academic Press, 37-51, 1982.

Markakis, P. ed., Anthocyanin as Food Colours, Acadamic Press, pp. 245-253 ans preface, 1982.

Martin, S.M. "Environmental Factor : B. Temperature, Aerations and p^H" Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals . Edited by Staba , E.J. pp. 143-148, 1982.

Martin, S.M., and Rose ,D., "Growth of Plnat Cell (Ipomoea) Suspension Cultures at controlled p^H Levels" Can. J. Bot. , 54:1264-1270, 1975 .

Matsubara, K., Kitami,S., Yoshioka, T., Morimoto, T., Fujita , Y. and Yamada, Y. High Density Culture of *Coptis japonica* Increases Berberine Production. J. Chem. Techonol. Biotechnol.,46:61-69, 1989 .

Matsumoto, T. Nishida , K., Noguchi, M. and Tamaki, E. " Some factor affecting the anthocyanin formation by *Populus* cell in suspension culture," Agric. Biol.Chem. , 37, 561-567, 1973.

Mehra, P.N. and Jaidka , K. "*In vitro* morphogenetic studied in pear *Pyrus communis* ," 29, 286-298, 1979.

Misukami, H.,Konoshima, M.,and Tabata, M., "Effect of Nutritional factor on Shikonin derivative Formation in *Lithospernum*

Callus Cultures , Phytochemistry , 16:1183 , 1977 .

————, H.,Tomita, K.,Ohashi, H., and Hiraoka, N. " Anthocyanin production in callus cultures of roselle (Hibiscus sabalariffa L.) Plant Cell Reports. 7, 553-556, 1988.

Mizukami, H., Tomita , K. and Ohashi, H. " Anthocyanin accumulation and changes in activities of phenylalanine ammonia-Lyase and Chalcone synthase in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) callus cultures ," Plant Cell Reports , 8 : 467-470 , 1989.

————, H., Konoshima, M., and Tabata, M., "Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum* callus cultures" phytochemistry, 16, 1183, 1977.

Morris, P., Scragg, A.H., Smart, N.J., and Stafford, A. "Secondary product formation by cell suspension by cell suspension cultures" In "Plant Cell Culture : A Practical Approach." R.A.Dixon(ed), Oxford:IRL Press, p.127

Murashige, T. and Skoog, F., "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures" Physiol. Plant., 15, 473, 1962.

Nallin, B.K. and Smith , B.J. Grape Anthocyanins as Food Colouring : Source Compared. Int. Flavors Food Addit. 8:pp. 102-105, 1977.

Nesius, K.K. and Fletoher, J.S. "Contribution of Nonautotrophic Carbon Dioxide Fixation to Protein Synthesis in Suspension Culture of Paul' s Scarlet Rose, Plant Physiol , 55,643 , 1975.

Niizeki, M., Tanaka, M.. Akada, S., Hirai, A. and Saito, K.I. "Callus formation of somatic hybrid of rice and soybean and characteristics of the hybrid callus ," Jpn. J. Genet., 60, 81-92 , 1985.

Noe', W., Langebartels, C. and Seitz, H.U. "Anthocyanin accumulation and PAl-activity in suspension culture of *Daucus carota* L. inhibition by L-α-aminooxy-β-phenylpropionic acid and T-cinnamic acid ," Planta 149 , 283-287 , 1980.

Nozue, M. and Yasuda, H. "Occurence of anthocyanoplasts in cell

suspension cultures of sweet potato," Plant Cell Rep. , 4 , 252-255, 1985.

Ozeki, Y. and Komamine , A. " Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture : correlation of metabolic differentiation anthomorphologocal differntiation, " Physiol.Plant., 53, 570-577, 1981.

Oota, S. Masuda,T. and TAmuura, T. " Apple (*Marlus pumila* var. domestica cultivar McIntosh - red flesh) tissue culture and anthocyanin formation in the derived callus tissues," J.Jpn.Soc. Hortic.Sci., 52 , 117-122, 1983.

Palamides, N. and Markzkis, P. J. Food Sci. , 40 1047-1049, 1975.

Radomski, J.L. The absorption, Fate and excretion of Citrus Red no. 2 (2,5-dimethoxyphenyllazo-2-naphtol) and ext. D & C Red no.14 (1-xylolazo-2-naphtol) J.Pharmacol.Exp.Ther. , 134 : 100-109, 1961.

Ram, H., Rao, C.H. and Mathur , .M.S. " Anthocyanin development *in vitro* in tender internode explants of *Eukalyptus*," Curr. Sci. , 18, 499-500, 1971.

Schmitz, M. and Seitz, H.U. "Hemmung der Anthocyansynthese durch Gibberellinsaure A_3 bei Kalluskultaren von *Daucus carata* Z." Pflanzenphysiol. , 68 , 259-265 , 1972.

Scragg, A.H. , Bond ,P., Leckie,F. Cresswell, R. and Fowler , M.W. " Growth and product formation by plant cell suspensions cultivated in bioreactors," Biioreactors and Biotransformations, edited by Moody , G. W. and Baker, P.B. , Elsevier Applied Science Publishers , pp. 12-25 , 1987.

———, A.H., Allan, E.J, and Leckie, F. "Effect of shear on the viability of plant cell suspensions," Enzyme Microb. Technol., 10, 361-367, 1988.

Seitz, H.U. "Anthocyanins," Cell culture and Somatic cell Genetics of Plants, 5, 49-75, 1988.

Shyr, S.E. and Staba, E.J. " Examination of squill tissue cultures for

buladiennolides and anthocyanins ," Planta Med., 29, 86-90 , 1976.

Siegelman, H.W. In Biochemistry of Phenolic Compounds (H.W. Harbourne, ed.) pp. 437-456 Acadamic Press, New York, 1964.

Slebecka-Szeweykowska, A. "On the condition of anthocyanin formation in the *Vitris vinifera* cultivated *in vitro* , " Acta .Soc. bot.pol. , 21 , 537-576 , 1952.

Smith , S.L. Slywka, G.W. and Krueger, R.J. "Anthocyanins of *Strobilanthes dyeriana* and their production of callus culture," J. Nat. Prod. , 44 , 609-610, 1981.

Stanko, S.A. and Bardinskaya, M.X. "Anthocyanins of callus tissue of *Pathenocissus tricuspidata*," Dokl. Biol. Sci.(Engl. Transl.), 146, 1152-1155 , 1963.

Stickland, R.G. and Suderland, N. "Production of anthocyanins, flavoniods and chlorogenic acids by cultured callus tissued of *Haplopappus gracillus*, " Ann.Bot.(London) [N.S.], 36, 443-457, 1972.

Straus, J. "Anthocyanin synthesis in corn endosperm tissue culture. I. Identity of the pigments and general factors," Plant.Physiol., 34, 536-541, 1959.

Sugano,N. and Ahyashi, K. "Dynamic interrelation of cellular ingredients relevant to the biosynthesis of anthocyanin during tissue culture of carrot aggregen, " Bot. Mag., 80 , 440-449, 1967.

Thomas , E. and Davey , M.R. " The culture of plant cells," In : Thomas ,E. and davey, M.R. (eds.) From Single Cell to Plants pp. 50-75 , Wykelham Publication, London , 1975.

Timberlake, C.F. and Bridle, P. Anthocyanin. In : J. Walford (ed.), Developments in Food Colours. 1, pp.115-149 London : Applied Science Publish., 1980.

von Ardenne, R, Bestimmung der Natur der Anthocyane in Gewebekulturen von *Haplopapus gracillis* Z. Naturforch. B. Anorg. Chem.,

Org.Chem.Biochem. Biophys.Biol. , 20B, 186-187, 1965

Wagner, F. and Vogelmann, H." Cultivation of Plant Tissue Culture in Bioreactors and Formation of Secondary Metabolites"Plant Tissue Culture in Biotechnological Applications.ed. W.Barz,E. Renhard and M.H. Zenk, pp. 245-252 . Springer-Verlag, 1977.

Wellmann , E. " Eine Quantitative Analyse des Lichteffekts auf die Flavonoidsynthese in pflanzlichen Zell und Gewebeklturen," Planta Med. , Suppl., pp. 107-111, 1975.

Widholm, J.M. " The use of fluoresein diacetate and phenosofranine for determining viability of cultured plant cells," Stain Technol., 47, 189-197, 1974.

Yamamoto, Y. Mizuguchi, R. and Yamada ,Y."Chemical constituents of cultured cells of *Euphoria tirucalli* ," Plant Cell Rep., 1, 29-30, 1981.

Yamamoto, Y.,Kinoshita ,Y.,Watanabe ,S., and Yamada ,Y. " Aathocyanin Production in Suspension Cultures of High-producing Cells of *Euphorbia milli* ". Agric. Biol. Chem. 53(2) , 417-423, 1989.

Yeoman, M.M. and Forch , E. "Cell prolifration and growthin callus cultures, " International Review of Cytology, Supplement, 11 A ,1-24.

Zenk, M.H.,El-Shagi, H., and Schulte, U. "Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia* ," Planta Med. Suppl. 79,1975.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962)

Macronutrients	มก./ล.	Iron	มก./ล.
NH_4NO_3	1650	Sodium EDTA	37.25
KNO_3	1900	$FeSO_4.7H_2O$	27.85
$CaCl_2.2H_2O$	440		
$MgSO_4.7H_2O$	370	Organic component	มก./ล.
KH_2PO_4	170	Glycine	2
Micronutrients	มก./ล.	Nicotinic acid	0.5
H_3BO_3	6.2	Pyridixin-HCl	0.5
$MnSo_4.H_2O$	6.9	Thiamine-HCl	0.1
$ZnSO_{4.H2}O$	6.14		
KI	0.83	Sucrose	30 กรัม/ลิตร
$Na_2M_{oO4}.2H_2O$	0.25		
$CuSO_4.5H_2O$	0.025		
$CoCl_2.6H_2O$	0.025		

ภาคผนวกที่ 2

สูตรอาหาร Gamborg B5 medium (1970)

Macronutrients	มก./ล.
$CaCl_2.2H_2O$	150
$NaH_2PO_4.H_2O$	150
KNO_3	2500
$MgSO_4.7H_2O$	250
$(NH_4)_2SO_4$	134
Micronutrients	**มก./ล.**
H_3BO_3	3.0
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$CuSo_4$	0.024
KI	0.750
$MnSO_4.H_2O$	10.0
$Na_2MoO_4.2H_2o$	0.25
$ZnSO_4.7H_2O$	2.0

Iron	มก./ล.
NaFeEDTA	28.0
Organic components	**,มก./ล.**
myoinositol	100.0
nicotinic acid	1.0
Pyridoxine-HCl	1.0
thiamine-HCl	10.0
sucrose	30 กรัม/ลิตร

ภาคผนวกที่ 3

การเตรียม stock MS

Stock Ia	NH_4NO_3 24.75 กรัม $MnSo_4.4H_2O$ 0.3345 กรัม
	KH_2PO_4 2.55 กรัม $ZnSO_4.7H_2O$ 0.159 กรัม
	H_3BO_3 0.093 กรัม
	ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 300 มล. ใช้ 20 มล. ต่ออาหาร 1 ลิตร
Stock Ib	KNO_3 28.5 กรัมปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 300 มล.
	ใช้ 20 มล. ต่ออาหาร 1 ลิตร
Stock II	KI 0.083 กรัม $CuSo_4.5H_2O$ 0.0025 กรัม
	$Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.025 กรัม $CoCl_2.6H_2O$ 0.0025 กรัม
	ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 200 มล. ใช้ 2 มล. ต่ออาหาร 1 ลิตร
Stock III	$CaCl_2.2H_2O$ 13.2 กรัมปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 300 มล.
	ใช้ 10 มล. ต่ออาหาร 1 ลิตร
Stock IV	$MgSo_{4.7H_2}O$ 10 กรัมปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 300 มล. ใช้
	10 มล. ต่ออาหาร 1 ลิตร
Stock V	Na_2 EDTA 0.9325 กรัม
	Fe $SO_4.7H_2O$ 0.695 กรัม
	ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 250 มล. ใช้ 10 มล. ต่ออาหาร 1 ลิตร
Stock VI	myoinositol 6 กรัม
	nicotinic acid 0.030 กรัม
	amino gylcine 0.12 กรัม
	pyridoxine HCl0.03 กรัม
	Thiamine HCl 0.006 กรัม
	ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 300 มล. ใช้ 5 มล. ต่ออาหาร 1 ลิตร

ภาคผนวกที่ 4

การเตรียม Stock B5

Major Salt Solution

$Na_2HPO_4.4H_2O$	3 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.68 กรัม
$MgSo_4.7H_2O$	5 กรัม
KNO_3	50 กรัม
KI	15 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 1 ลิตร ใช้ 50 มล. ต่ออาหาร 1 ลิตร

Ca Stock

$CaCl_2.2H_2O$	15 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 1 ลิตร ใช้ 10 มล. ต่ออาหาร 1 ลิตร

Fe EDTA Stock

Na_2 EDTA	3.73 กรัม
$FeSo_4.7H_2O$	2.78 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 1 ลิตร ใช้ 10 มล. ต่ออาหาร 1 ลิตร

Vitamin Stock

Nicotinic acid	50 มก.
Thiamine-HCl	500 มก.
Pyreidoxine-HCl	50 มก.
myoinositol	5 มก.

ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 500 มล. เก็บไว้ในอุณหภูมิ-20 C

Micronutrient Stock

H_3 Bo_3	300 มก.
$MnSo_4.H_2O$	1 กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	200 มก.
$Na_2MoO_4.2H_2O$	25 มก.
$CuSo_4.5H_2O$	2.5 มก.
$CoCl_2.6H_2O$	2.5 มก.

ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 1 ลิตรใช้ 10 มล. ต่ออหาร 1 ลิตร

ภาคผนวกที่ 5

สูตรอาหารปรับปรุงใหม่เพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน (J-B5)

Macronutrients		Iron	มก./ล.
$CaCl_2.2H_2O$	600 มก./ล.	NaFeEDTA	28.0
$NaH_2PO_4.H_2O$	20 มก./ล.		
KNO_3	10 mM	Organic components	,มก./ล.
$MgSO_4.7H_2O$	250 มก./ล.		
$(NH_4)NO_3$	2.5 mM	myoinositol	100.0
		nicotinic acid	1.0
Micronutrients	มก./ล.	Pyridoxine-HCl	1.0
		thiamine-HCl	10.0
H_3BO_3	3.0		
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	sucrose	30 กรัม/ลิตร
$CuSo_4$	0.024		
KI	0.750		
$MnSO_4.H_2O$	10.0		
$Na_2MoO_4.2H_2o$	0.25		
$ZnSO_4.7H_2O$	2.0		

ภาคผนวกที่ 6

การย้อมเซลล์พืชเพื่อศึกษาความมีชีวิตด้วยดลูออเรสซีนไดอะซีเตท

ดัดแปลงจากวิธี Windholm (Widholm,1972)

การเตรียมสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท

ละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท 0.01 กรัม ไนอะซีโตน 2 มล. (0.5% น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วเก็บในตู้เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เวลาใช้ทำให้เจือจางโดยปิเปต สารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท 20 ไมโครลิตร แล้วทำให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเหลว สารละลายนี้เตรียมแล้วใช้ทันที

การย้อมเซลล์

หยดเซลล์แขวนลอย 1 หยด และสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตทที่เจือจางแล้ว 1 หยด ผสมกันทิ้งไว้ 5 นาที แล้วจิ้งดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เซลล์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เนื่องจากเซลล์มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเทอเรสที่จะ deacetylate ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท ได้เป็นฟลูออเรสเซนต์อิสระจึงเรืองแสงได้โดยตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

ภาคผนวกที่ 7

การวัดปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

การไฮโดรไลซ์น้ำตาลซูโครส

ใส่อาหารเพาะเลี้ยงที่แยกเซลล์พืชออกแล้ว 1 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. (มีหลอดแก้วเสียบตรงกลางจุก) เติมกรดไฮโดรคลอริก 0.1% ปริมาณ 40 มล. นำไปต้มใน water bath 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N. จนได้ pH เท่ากับ 5.0 เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายที่มีกลูโคส 100-500 ไมโครกรัม/มล.

วิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี 3,5 dinitrosalicylic acid

การเตรียมสารละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid 0.1%

สารเคมี

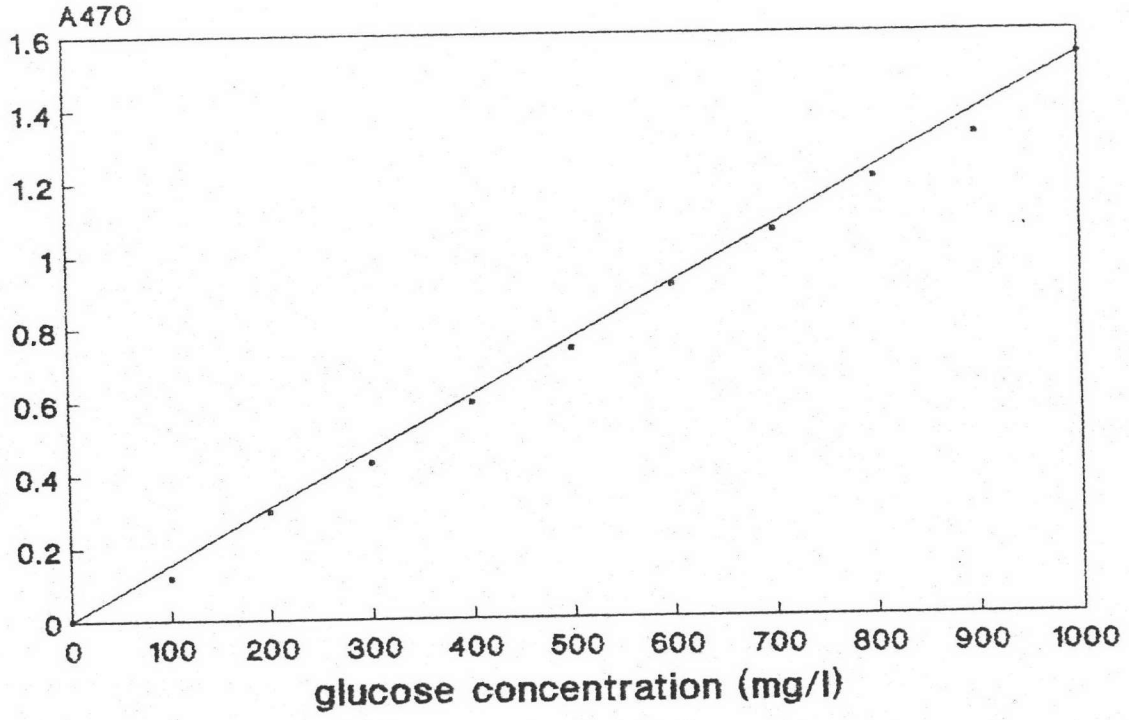
3,5 dinitrosalicylic acid	1 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2N	400 มล.
โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต	200 กรัม
เติมน้ำจนครบ	1,000 มล.

วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 1 มล. (ควรจะมีปริมาณน้ำตาลไม่เกิน 500 ไมโครกรัมต่อ มล.) ลงในหลอดทดลอง
2. ปิเปต สารละลาย 0.1% 3,5 dinitrosalicylic ลงไป 1 มล.
3. นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที
4. เติมน้ำกลั่น 6 มล.
5. นำไปวัดความเข้มของสีโดยใช้ความยาวคลื่น 470 บาโนเมตร
6. เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสโดยใช้น้ำตาลกลูโคส 50,100,200,300,400 100,200,300,400 และ 500 ไมโครกรัม/ มล. ตามลำดับ โดยใช้วิธีการเหมือนข้อ 1
7. ในกรณีของ blank ใช้น้ำกลั่นเปล่าแทนสารละลายตัวอย่าง
8. เทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสของสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่วัดได้

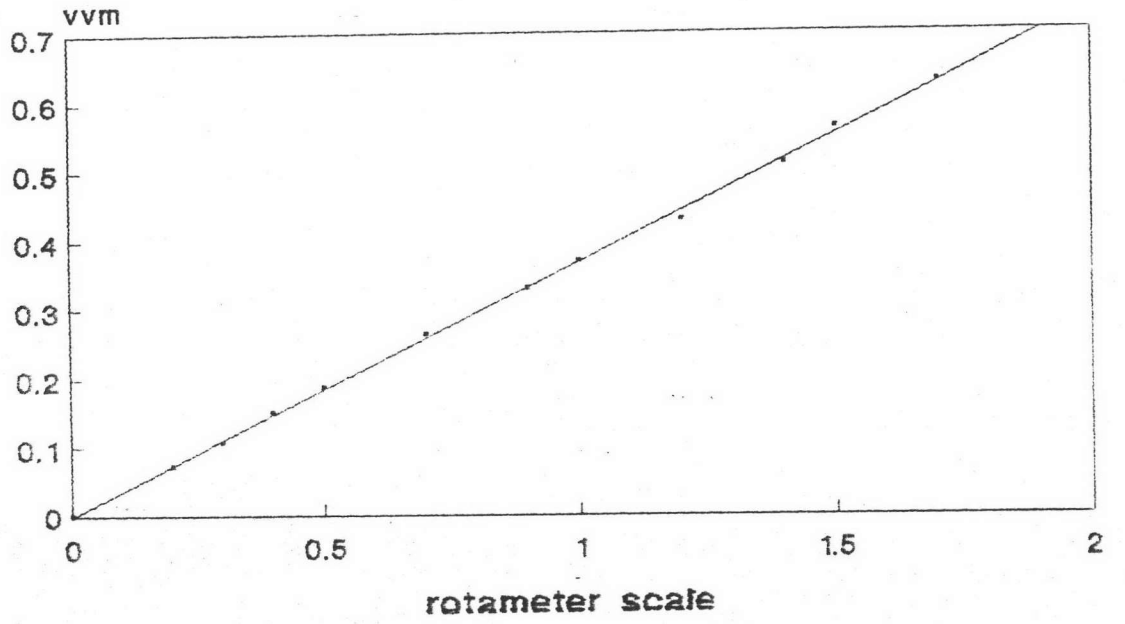
ภาคผนวกที่ 8

กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่วิเคราะห์ด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid

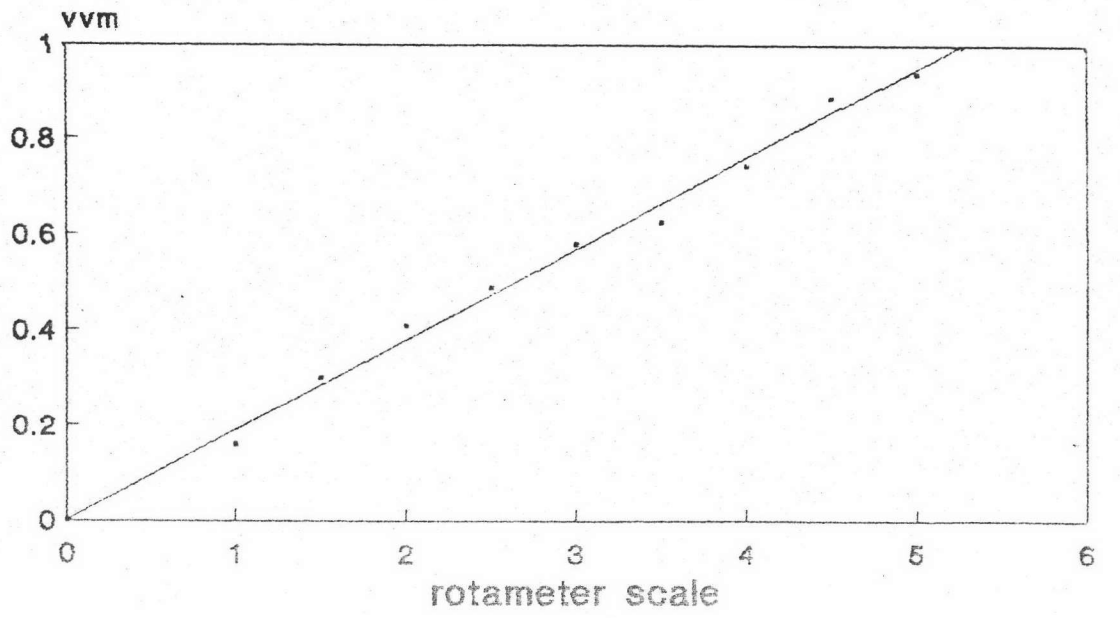


กราฟค่ามาตรฐานระหว่างหน่วย vvm กับสเกลบน rotameter

ก. rotameter ขนาด 0.2 - 2.0 $N.L.Hr^{-1}$



ข. rotameter ขนาด 1.0 - 10.0 $N.L.Hr^{-1}$



ภาคผนวกที่ 10

การคำนวณหาปริมาณเซลล์ยูนิตโดยใช้ haemacytometer

วิธีการตรวจนับ

1. ล้างเครื่องมือ Haemacytometer ซึ่งเป็นสไลด์ภายในแบ่งออกเป็น 25 ช่องใหญ่และแต่ละในช่องใหญ่แบ่งเป็น 16 ช่องเล็ก ให้สะอาดและเช็ดให้แห้ง
2. ปิดทับบริเวณสี่เหลี่ยมซึ่งเป็นช่องแบ่งด้วยกระจกปิดสไลด์
3. ใช้ปิเปตปากตัดดูดเซลล์แขวนลอย และปิเปตตรงที่มีช่องว่างระหว่างสไลด์เพื่อให้ตัวอย่างซึมเข้าไปในบริเวณช่องกำหนดปริมาตรไว้ดังนี้

   เครื่องนับจำนวนเซลล์ 1 \องใหญ่ $= 0.2 \times 0.2 \times 0.1$ มม.^{3}

   $= 4.0 \times 10^{-6}$ มล.

4. ตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า
5. นับจำนวนเซลล์แขวนลอยทั้งหมดจาก 25 ช่องใหญ่

การคำนวณปริมาณเซลล์แขวนลอย

$$\text{จำนวนเซลล์แขวนลอยใน 1 มล.} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดใน 25 ช่อง}}{25 \times 4.0 \times 10^{-6}}$$

$$= \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดใน 25 ช่อง} \times 10^4$$

ประวัติผู้เขียน

นางสาวกนกวรรณ รัตนสโนบล เกิดวันที่ 10 กุมภาพันธ์ 2510 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2532 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2532