บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์การทดลอง

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psychotherm incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., N.J., USA.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น RC-TK ของบริษัท Infor Co.,Ltd.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Aquatherm water bath shaker) รุ่น G-86 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., USA.

หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร TL 20W/80 F20 T12 BLB บริษัท Philips, Holland.

ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น IN-81 ของบริษัท Yamato Scientific Co.,Ltd., Japan

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Laboratory hot plate PC-101 Corning Glass Works, Corning, N.Y. 14830, USA.

เครื่องเขย่า (Vortex) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries, Inc.,USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Minor 35 MSE ของบริษัท MSE Ltd., England

เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-26 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan

ตู้อบแห้ง ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CHA ของบริษัท Olympus Optical Co.,Ltd., Japan

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) สำหรับถ่ายรูป รุ่น UFX-IIA ของบริษัท Nikon Corporation, Japan

แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (Haemacytometer) รุ่น Neubauer Bright Line ของบริษัท Bacco Co., Ltd., Germany

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท Bausch & Lomb USA.

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น HI 8424 ของบริษัท Hanna Instruments, Italy

เครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) RE 52 ของบริษัท Yamoto Scientific Co., Ltd., Japan

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High performance liquid chromatography) Shimadzu Co., Ltd., Japan

เครื่องกลั่นหาไนโตรเจน (Unit distillation) รุ่น Buchi 315 ของบริษัท Laboratoriums-Technik AG Co., Ltd., Switzerland

ถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น MD 300-5L เป็นของบริษัท L.E. Marubishi, Tokyo, Japan ตัวถังหมักเป็นแก้ว มีใบพัด (impeller) แบบ 6-blade turbine ตัวควบคุมสภาวะเป็น bioprocess controller รุ่น MDIAC-SS เครื่องอัดอากาศ (air compresser) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Hitachi, Japan และเครื่องควบคุมระบบหล่อน้ำเย็น (circular type handy cooler) รุ่น TRL-108 เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Kagaka, Japan

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ทินเลเยอร์โครมาโตรกราฟี (High performane Thin-layer Chromatography) รุ่น Camag CH-4132 MUTTENZ, Switzerland

1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1.กรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) มาตรฐาน	Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
2.พาราเซตามอล	Atlantic laboratories ประเทศไทย
3.พี.จี.โอ. เอนไซม์	Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
4.เมทธิลแอลกอฮอล์	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
5.เอนไซม์อินเวอร์เทส	Wako Pure Chemical ประเทศญี่ปุ่น
6.อะซิโตรไนไตรล์	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
7.NTG	Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
8.TLC aluminium sheets silica gel $60F_{254}$	Merck ประเทศเยอรมัน

สารเคมีที่ใช้นอกจากที่กล่าวมานี้ สั่งซื้อจากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน และสารอาหาร เช่น วุ้นผง น้ำตาลซูโครส น้ำมันถั่วเหลือง ที่ใช้เป็นส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อจะใช้เกรดการค้า (Commercial grade) ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ส่วนกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันแล้ว และกากเมล็ดฝ้ายที่สกัดน้ำมันแล้วได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท วิวัฒน์อุตสาหกรรม จำกัด

2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดย จันทร์ธิรา ลัภยพร(2536) และได้ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขวดเขย่าและในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยศุภชัย สมัปปิโต(2537)

3. วิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เขี่ยสายใยของเชื้อ *G. fujikuroi* โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โพเทโตเด็กซ์โทรสอาการ์เสริมแร่ธาตุ (potato dextrose agar,PDA)(ภาคผนวกที่ 1.1) ที่อยู่ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

4.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยเส้นใยของเชื้อ *G.fujikuroi* ลงบนอาหารแข็งเอียงอะซิเตต (Acetate agar slant) (ภาคผนวกที่ 1.2) ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดไฟความเข้มแสง 9840 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่มีทวีน-80 ร้อยละ 0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เข็มเขี่ยสปอร์ให้กระจายทั่ว เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) กรองสปอร์แขวนลอยที่ได้ผ่านผ้าสาลู (ประยูรศรี วัฒนโกศล,2537) นับจำนวนสปอร์แขวนลอยโดยใช้แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (Haemacytometer)

ในกรณีที่ใช้เชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงเพื่อเตรียมสปอร์ จะต้องนำเชื้อไปเลี้ยงในอาหารแข็งเอียงโพเทโตเด็กซ์โทรสอาการ์เสริมแร่ธาตุ(ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้เส้นใยเจริญเต็มที่ จึงนำมาใช้เพื่อเตรียมสปอร์ตามวิธีข้างต้น

4.2 การเตรียมหัวเชื้อ

นำสปอร์แขวนลอยจากข้อ 4.1 จำนวน 10^6 สปอร์ ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.5) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (rotary incubator shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน

4.3.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 4.2 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวกที่ 1.6) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ตรวจหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง

4.3.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตจิบเบอเรลลินในระดับถังหมัก 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 4.2 ให้ได้ปริมาตรรวม 350 มิลลิลิตร ถ่ายลง

ในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวกที่ 1.7) ปริมาตร 3150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ให้ค่าความเป็นกรดด่างแปรผันตามสภาวะการเลี้ยงเชื้อ(ไม่ควบคุม) ตามวิธีของ อรไท สุขเจริญ(2533) และใช้อะดีคานอล(adecanol) เป็นสารต่อต้านการเกิดฟอง เก็บตัวอย่างทุกวันครั้งละ 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน นำมาวัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด และวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกตามวิธี HPLC ในข้อ 7.3

5. การกลายพันธุ์ *Gibberella fujikuroi* ด้วยสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

5.1 การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

เตรียมสปอร์แขวนลอยตามข้อ 4.1 ให้มีความหนาแน่น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 - 30 มิลลิลิตร นำสปอร์แขวนลอยใส่ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว พร้อมคริบเสียบกระดาษที่ดัดเป็นรูปตัว Z เพื่อใช้เป็นอุปกรณ์กวนวางบนเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ฉายแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กำลังงาน 15 วัตต์ จำนวน 3 หลอด ระยะห่างจากแหล่งกำเนิดแสง 30 เซนติเมตร โดยมีการกวนตลอดเวลา เก็บตัวอย่างที่เวลาการฉายแสง 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 วินาที ตามลำดับ ทดลองในที่มืดเพื่อป้องกันการเกิด photoreactivation ตรวจสอบสปอร์ที่อยู่รอด (viable count) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์ โดยเจือจาง (dilution) สปอร์ที่ผ่านการฉายแสงแล้วให้ได้

จำนวนสปอร์ที่เหมาะสม จากนั้นกระจายสปอร์ 0.1 มิลลิลิตรลงบนอาหารแข็งโพเทโตเด็กซ์โทรส บ่มที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นับจำนวนโคโลนีที่เจริญจำนวนระหว่าง 30 - 300 โคโลนี คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์รอดตายที่เวลาต่างๆ เก็บโคโลนีแบบสุ่มในช่วงเปอร์เซ็นต์รอดตายน้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ และแบ่งกลุ่มตามลักษณะภายนอกโคโลนี จากนั้นนำสายพันธุ์ที่มีลักษณะภายนอกเหมือนหรือคล้ายกับสายพันธุ์ตั้งต้น มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลินและทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงขึ้นตามวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ข้อ 6

5.2 การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

เตรียมสปอร์แขวนลอยตามวิธีการทดลองข้อ 4.1 ใส่ในอาหารเหลว (nutrient broth) (ภาคผนวก ที่ 1.8) ให้ได้ความหนาแน่น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อกระตุ้นให้สปอร์งอกตามวิธีของ Avalos และคณะ(1985) เป็นเวลา 3 ชม. (จันทร์ธิรา ลัภยพร, 2536) นำมาปั่นและทำให้แขวนลอยอีกครั้งใน 0.5 โมลาร์ ทริส - กรดมาลิอิก บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8 (ภาคผนวก 2.7) เติมสารละลาย NTG ลงใน 0.2 มิลลิลิตรของสปอร์แขวนลอยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ NTG เท่ากับ 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, และ 5.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตรด้วย 0.5 โมลาร์ทริส - กรดมาลิอิก บัฟเฟอร์ พีเอช 8 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ที่ได้มาปั่นด้วยความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจือจางสปอร์ให้มีความหนาแน่นที่เหมาะสม ตรวจสอบสปอร์ที่อยู่รอดโดยกระจาย 0.1 มิลลิลิตรของสปอร์ที่ได้บนอาหารแข็งโพเท

โตเด็กซ์โทรส บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส คำนวณเปอร์เซ็นต์รอดตายที่ความเข้มข้น NTG ต่างๆ เก็บโคโลนีแบบสุ่มในช่วงเปอร์เซ็นต์รอดตาย 2.4 เปอร์เซ็นต์ และแบ่งกลุ่มตามลักษณะภายนอก จากนั้นนำสายพันธุ์ที่มีลักษณะภายนอกเหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้น มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงขึ้นตามวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ข้อ 6

6. การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงขึ้น

6.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (primary screening)

เตรียมสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ตามวิธีในข้อ 5.1 และ 5.2 นำสปอร์จำนวน 10^6 สปอร์ เติมลงในอาหารเหลวเพื่อเตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 4.2 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารสูตรสำหรับผลิตจิบเบอเรลลินตามวิธีข้อ 4.3.1 เก็บตัวอย่างน้ำหมักในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง นำไปตรวจหาและวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ขั้นปฐมภูมิ ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีตามวิธีในข้อ 7.1 โดยเปรียบเทียบความเข้มของจุด GA_3 ของสายพันธุ์กลายพันธุ์สายพันธุ์ต่างๆ กับความเข้มของจุด GA_3 ของสายพันธุ์ตั้งต้น โดยดูการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Kumar and Lonsane, 1986) กำหนดให้ความเข้มของจุด GA_3 ที่ปรากฏบนแผ่น TLC มี 5 ระดับ คือ

0 หมายถึง ไม่ปรากฏจุดสาร GA_3 บนแผ่น TLC

1 หมายถึง ความเข้มของจุด GA_3 บนแผ่น TLC ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

2 หมายถึง ความเข้มของจุด GA_3 บนแผ่น TLC เท่ากับสายพันธุ์ตั้งต้น

3 หมายถึง ความเข้มของจุด GA_3 บนแผ่น TLC มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

4 หมายถึงความเข้มของจุด GA_3 บนแผ่น TLC มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นมากๆ

คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความเข้มจุด GA_3 บนแผ่น TLC มีความเข้มมากกว่าจุดสาร GA_3 ของสายพันธุ์ตั้งต้น จากนั้นนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาได้ไปสแกนด้วย TLC-densitometric ตามวิธีทดลองข้อ 7.2

6.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (secondary screening)

นำน้ำหมักของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากวิธี TLC - densitometric ในข้อ 7.2 มาวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตรด้วยวิธี HPLC ตามวิธีในข้อ 7.3 คัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

7. วิธีการวิเคราะห์

7.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC)

นำน้ำหมักมาสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต ในอัตราส่วนน้ำหมักต่อเอทธิลอะซิเตต เป็น 1:1 เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer)อย่างแรงเป็นเวลา 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น นำชั้นเอทธิลอะซิเตตจำนวน 6 ไมโครลิตร ค่อยๆ จุด (spot) ลงบนแผ่น TLC ขนาด 10X20 เซนติเมตร ห่างกันจุดละ 1 เซนติเมตร วางในถังแก้วที่มีระบบตัวทำละลายอิ่มตัวที่ประกอบด้วย ตัวทำละลายที่ 1 คือ เบนซีน : กรดโพรพิโอนิค : น้ำ ในอัตราส่วน 6:3:1 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมกับตัวทำละลายที่ 2 คือเอทธิลอะซิเตต ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 10 เซนติเมตร นำแผ่น TLC

ออกมาเป่าให้แห้งพ่นด้วย 5 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริกในเอทธานอล จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่และความเข้มข้นของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของจุด GA_3

7.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (HPTLC)

นำน้ำหมักมาสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต ในอัตราส่วนน้ำหมักต่อเอทธิลอะซิเตต เป็น 1:4 เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จากนั้นขั้นตอนเหมือนวิธี TLC ในข้อ 7.1 หลังจากนั้นเมื่ออบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะนำแผ่นนี้ไปสแกน (scan) ด้วยวิธี TLC-densitometric

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ด้วยวิธี TLC-densitometric

Instrumental model	CAMAG
Determination mode	Reflectance
Lamp	Mercury (Hg)
Optical slit	Micro
Slit width	4 มิลลิเมตร
Slit lenght	4 มิลลิเมตร
Sensitivity	220
Scanning speed	0.5 มิลลิเมตรต่อนาที
Span	3
Wavelength detector	290 นาโนเมตร

โดยใช้สภาวะดังกล่าวมาทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้น 0-200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปสแกน คำนวณปริมาณ GA_3 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 2.9) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร

7.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) โดยปรับปรุงจากวิธีการของ อรไท สุขเจริญ (2533) และ สุภาพร พรพรหมกุล (2533)

นำตัวอย่างน้ำหมักมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 ด้วย 2 โมลาร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำตัวอย่างที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างแล้วมา 3 มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) คือพาราเซตามอลที่มีความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 200 ไมโครลิตร สกัดด้วยเอทธิลอะซิเตตจำนวน 5 มิลลิลิตร ในหลอดฝาเกลียว เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสมนาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น แล้วจึงนำชั้นของน้ำหมักจำนวน 2 มิลลิลิตร มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 70 ไมโครลิตร จากนั้นสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตตจำนวน 4 มิลลิลิตร เขย่านาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น นำชั้นของเอทธิลอะซิเตตมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulphate anhydrous) เพื่อขจัดน้ำ นำสารละลายที่ได้ 3 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำมาละลายด้วยสารละลาย เมทธานอล เข้มข้นร้อยละ 35 ในสารละลายกรดฟอสฟอริกค่าความเป็นกรดด่าง 3 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตตที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ด้วยเครื่อง HPLC คำนวณ

ปริมาณ GA_3 เปรียบเทียบ กับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 2.8) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ อรไท สุขเจริญ (2537)

คอลัมน์	: Spherisorb 5 C8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 46 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	: เมทธานอลและสารละลายกรดฟอสฟอริก พีเอช 3 อัตราส่วน 35 ต่อ 65 คงที่ตลอดการทดลอง
อัตราการไหลของสารละลายตัวพา	: 1 มิลลิลิตรต่อนาที
ตรวจวิเคราะห์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต	: 208 นาโนเมตร
ความไวของเครื่องตรวจวัด	: 0.08 AUFS (absorbance unit full scale)
ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์	: 10 ไมโครลิตร
ความดัน	: 195 - 225 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร
เวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์ (retention time)	: 8.90 - 10.00 นาที

7.4 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักปริมาตร 20 มิลลิลิตร มากรองผ่านกระดาษกรองวัตแมนเบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ล้างเส้นใยบนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักและหักลบน้ำหนักกระดาษจะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง

I20502977

7.5 การหาค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก

วัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

7.6 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธีของ Kjeldahl

ชั่งของผสมของเกลือ (ภาคผนวกที่ 2.5.1) ปริมาณ 7 กรัม ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมด้วยเครื่อง Buchi 425 ในตู้ควันจนได้สารละลายใสสีเขียว ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้อินดิเคเตอร์ (indicator) (ภาคผนวกที่ 2.5.2) จำนวน 2-3 หยด กลั่นจนกระทั่งสารละลายกรดบอริก (ภาคผนวกที่ 2.5.3) มีปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาไตเตรทกับ 0.1 โมลาร์ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

โดยที่

ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด = (A - B) X N X 1.4

เมื่อ A = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

B = ปริมาตร(มิลลิลิตร)ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรทกับแบลงค์

N = ความเข้มข้น (นอร์มอล) ของกรดไฮโดรคลอริก

7.7 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธีการของ Bernfeld (Bernfeld, 1955)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวกที่ 2.2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นทันที แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 0.1 - 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

7.8 การวิเคราะห์ปริมาณซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

เติมสารละลายอินเวอร์เทสในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4 (ภาคผนวกที่ 2.3) ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีตามข้อ 7.7 นำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากข้อ 7.7 ลบออกจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากข้อ 7.8 จะเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากน้ำตาลซูโครสในตัวอย่าง

กราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายซูโครสมาตรฐานเข้มข้น 0.1 - 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7.9 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยใช้พีจีโอ เอนไซม์ โดยวิธีการของ Huggelt และ Nixon (Huggelt and Nixon, 1957)

เติมสารละลายพีจีโอเอนไซม์ (P.G.O. enzyme) (ภาคผนวกที่ 2.4) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

7.10 การวิเคราะห์ปริมาณฟรักโทรส

นำปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากข้อ 7.9 ไปลบออกจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดในข้อ 7.7 จะเป็นปริมาณน้ำตาลฟรักโทรสที่มีในตัวอย่าง