บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์การทดลอง

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Incubator Shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc.,N.J.,U.S.A.

ถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300 พร้อมใบพัดแบบเทอร์ไบน์ (Turbine Impeller) และชุดควบคุมสภาวะ ของบริษัท Marubishi,Tokyo,Japan.

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

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง(pH meter)ของบริษัท Radiometer Copenhagen,Denmark.

เครื่องเขย่า (Vortex) รุ่น Vortex-Genie No.16824 ของบริษัท Scientific Industries,U.S.A

เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน Buchi 315 Distillation Unit และ Buchi 425 Digestor ของบริษัท Buchi Labotary Techniques Ltd.,Switzerland.

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography) Shimadzu LC-6A ของบริษัท Shimadzu Co.Ltd.,Japan.

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb Co.,U.S.A.

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

2.1.2. สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. จิบเบอเรลลิน (GA_3)	Sigma Chemical Co.,U.S.A.
2. จิบเบอเรลลิน (GA_4 และ GA_7)	Kyawa Hukko Kogyo Co.Ltd.,Japan.
3. เอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase)	Wako Pure Chemical Co,Ltd.,Japan.
4. พี.จี.โอ.เอนไซม์ (P.G.O Enzyme)	Sigma Chemical Co.,U.S.A.

สารเคมีอื่นที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ สั่งซื้อจากบริษัท Merck ประเทศเยอรมันนี ส่วน กลูโคส ซูโครส น้ำมันถั่วเหลือง ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจะใช้เกรดทางการค้า (commercial grade)

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

2.2.1 เชื้อ Gibberella fujikuroi C ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้มีการคัดเลือกมาแล้ว และได้ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อกับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขวดเขย่า โดย วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (21)

2.2.2 วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้

เขี่ยสายใยของเชื้อ Gibberella fujikuroi C โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โปเตโตเดกซ์โตรสอาการ์ (potato dextrose agar ,PDA ภาคผนวกที่ 1.1) ที่อยู่ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว จึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -80 °ซ เพื่อเก็บเป็นเชื้อแม่แบบ (master strain) และอุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้เป็นเชื้อประจำ (working strain)

2.2.3 การเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

2.2.3.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยสายใยของเชื้อ Gibberella fujikuroi C จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ตามวิธีข้อ 2.2.2 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โปเตโตเดกซ์โตรสอาการ์ที่เสริมด้วยอาหารเสริม (ภาคผนวกที่ 1.2) ในขวดแก้วทรงแบน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 10-12 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเจริญเต็มที่ หลังจากนั้นถ่ายสปอร์ออกจากขวดแก้วทรงแบนด้วยการล้าง โดยใช้สารละลายที่มีทวีน-80 ร้อยละ 0.1 ผสมกับกลีเซอรอลร้อยละ 10 แล้วกรองผ่านผ้าขาวบางที่ซ้อนทับกันหนา 4 ชั้น นำสปอร์แขวนลอย (spore suspension) มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และนับสปอร์ที่มีชีวิตโดยวิธีเพลทเคาท์(plate count) นำสปอร์แขวนลอยทั้งหมดใส่หลอดทดลองและเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 °ซ เพื่อใช้เตรียมหัวเชื้อตลอดงานวิจัยโดยทุกๆ 4 เดือนจะตรวจสอบการทำงาน (activity) ของเชื้อโดยวิธีเพลทเคาท์

2.2.3.2 การเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C เพื่อเตรียมหัวเชื้อในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อ Gibberella fujikuroi C ปริมาณ 2×10^7 สปอร์ จากข้อ 2.2.3.1 ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.3) ปริมาณ 50 มล. ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ควบคุม

อุณหภูมิที่ 25 °ซ ด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 70-72 ชั่วโมง

2.2.3.3 การเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 2.2.3.2 ปริมาตร 5 มล. ลงในอาหารเหลวที่จะศึกษาการสร้างผลิตภัณฑ์ GA_3 GA_4 และ GA_7 (ภาคผนวกที่ 1.4) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 25°ซ ด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวิเคราะห์ตามข้อ 2.3 ทุกวัน โดยเริ่มจาก วันที่ 6 จนถึงวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง

2.2.3.4 การเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.2.3.2 ให้ได้ปริมาตรรวม 300 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวกที่ 1.4) ปริมาตร 2.7 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และควบคุมอุณหภูมิ 25 °ซ ตลอดการหมัก เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ครั้งละ 20 มล. ตั้งแต่เริ่มต้นการหมักและทุก 12 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

2.2.3.5 การเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในขวดรูปชมพู่ เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของเซลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในวันที่ 3 8 13 16 และ 19 ของการเพาะเลี้ยง

เลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ตามข้อ 2.2.3.4 โดยใช้ซูโครส 100 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตกับกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.40 และ 0.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ 25 °ซ อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที กับมีการเติมสารละลายกลูโคส เพื่อให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 25 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 162 จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง โดยวันที่ 3 8 13 16 และ 19 ของการเพาะเลี้ยงจะมีการนำน้ำหมักออกมา โดย 10 มล. แรกจะนำมาหาน้ำหนักเซลแห้ง 50 มล. ต่อมาจะนำไปเซนตริฟิวส์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที และใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดส่วนใสออกไป นำเชื้อที่ได้ไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.5.4 ส่วน 50 มล.สุดท้ายจะนำมาเพาะเลี้ยงต่อในขวดชมพู่เช่นกันเพื่อเป็นตัวควบคุม โดยใช้ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 25 °ซ เก็บตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ในวันที่ 5 และวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง นำมาวิเคราะห์ตามข้อ 2.3

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 ลักษณะของหัวเชื้อที่ใช้สำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน

รูปที่ 7 แสดงการผลิตจิบเบอเรลลิน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

2.3 วิธีการวิเคราะห์

2.3.1 การวัดการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C โดยวิธีหาน้ำหนักเซลแห้ง

นำน้ำหมักปริมาตร 20 มล. มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักเพื่อแยกส่วนที่เป็นสายใยออกจากส่วนน้ำใส ล้างสายใยด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่

2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) โดยวิธีของ Bernfeld (34)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวกที่ 2.1) 1 มล. ลงในตัวอย่าง 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.1-1.0 มก.ต่อมล. ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสง

2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งมันสำปะหลังโดยการย่อยสลายด้วยกรด

นำตัวอย่าง 1 มล.ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มล.เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มล. นำสารละลายที่ได้มาย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.1 มล. เขย่าให้เข้ากันก่อนนำมาย่อยสลายที่อุณหภูมิ 110 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็น นำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ตามวิธีของ Bernfeld (ข้อ 2.3.2)

ย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธีการดังกล่าวข้างต้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแป้งมันสำปะหลังกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

เติมสารละลายอินเวอร์เทสในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4 ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มล. ลงในตัวอย่างปริมาตร 0.5 มล.ในหลอดทดลอง นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 20 °ซ เป็นเวลานาน 20 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ด้วยวิธีตามข้อ 2.3.2 นำปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากข้อ 2.3.4 ลบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากข้อ 2.3.2 จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดจากซูโครสในตัวอย่าง

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้ซูโครสมาตรฐานเข้มข้น 0.1-1.0 มก.ต่อมล. ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณซูโครสกับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยใช้ พี.จี.โอ.เอนไซม์ ตามวิธี Huggelt และ Nixon (35)

เติมสารละลายพี.จี.โอ.เอนไซม์ (P.G.O Enzyme ภาคผนวกที่ 2.2) 2.5 มล. ลงในตัวอย่าง 0.25 มล. โดยใช้น้ำกลั่น 0.25 มล.เป็นตัวเทียบ เขย่าให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล. ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

2.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณฟรักโทส

นำปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากข้อ 2.3.2 ลบกับปริมาณกลูโคสที่ได้จากข้อ 2.3.5 จะได้ปริมาณฟรักโทสที่มีในตัวอย่าง

2.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (สารอนินทรีย์)

นำตัวอย่างปริมาตร 1 มล.ใส่ในขวดกลั่น (Kjeldahl flask) ขนาด 300 มล. เติมน้ำกลั่น 250 มล. กลั่นจนได้ปริมาตรของเหลวที่กลั่นออกมา 200 มล. นำของเหลวที่กลั่นได้มา 5 มล. เติมสารละลายเนสเลอร์ (Nessler reagent) 1 มล. (ภาคผนวกที่ 2.3) ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร โดยมีน้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ อ่านค่าไนโตรเจนเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอมโมเนียมซัลเฟต 10-40 ไมโครกรัมต่อมล.

2.3.8 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (สารอินทรีย์)

นำตัวอย่าง 1 มล. เติมลงในสารละลาย Lowry C (ภาคผนวกที่ 2.4) ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ (Folin Ciocalteu's Phenol Reagent) ที่เจือจาง 1 ต่อ 1ในน้ำ 0.5 มล.ผสมให้เข้า

กัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) นำค่าปริมาณโปรตีนที่ได้คูณด้วยแฟกเตอร์ (0.16) ซึ่งเป็นค่าของสัดส่วนระหว่างปริมาณไนโตรเจนต่อปริมาณโปรตีนของกากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้ว

2.3.9 การวิเคราะห์ความเป็นกรดด่าง

วัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก ด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)

2.3.10 วิธีการสกัดและการเตรียมสารละลายเพื่อวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินโดยวิธี HPLC ปรับปรุงจากวิธีของ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (21)

นำตัวอย่างมา 2 มล.เติมสารมาตรฐานเปรียบเทียบสำหรับ GA_3 และสารมาตรฐานเปรียบเทียบสำหรับ GA_4 กับ GA_7 0.15 มล. เขย่าและปรับความเป็นกรดด่างของสารละลายให้มีพีเอชเป็น 3-3.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 20 สกัดของผสมทั้งหมดด้วยเอทธิลอะซิเตต (ethyl acetate) 4 มล.ในหลอดเกลียว เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer)เป็นเวลา 4 นาที นำชั้นของเอทธิลอะซิเตตที่ได้เก็บไว้ นำชั้นของน้ำหมักมาสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต 4 มล. เป็นเวลา 4 นาทีอีกครั้ง นำชั้นของเอทธิลอะซิเตตนี้ไปรวมกับส่วนที่เก็บไว้ครั้งแรก และนำชั้นของเอทธิลอะซิเตตทั้งหมดมาสกัดต่อด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่พีเอช 8 ปริมาตร 5 มล. สกัดของผสมทั้งหมดโดยเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 4 นาที นำชั้นของโซเดียมไบคาร์บอเนตมาปรับความเป็นกรดด่างของสารละลายให้มีพีเอชเป็น 3-3.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 20 และสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต 5 มล. เป็นเวลา 4 นาที นำชั้นของเอทธิลอะซิเตตมาขจัดน้ำโดยใช้โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulphate anhydrous) นำสารละลายนี้ 3 มล. มาระเหยเอาเอทธิลอะซิเตตออกจนแห้งโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) อุณหภูมิ 30 °ซ แล้วนำมาละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 2 มล. และกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยวิธี HPLC ซึ่งจะกล่าวถึงในผลการทดลอง