บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

1. อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubater shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc. New Jersy, USA.
2. เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer) รุ่น AM-11 ของบริษัท Nihonseiki Kaisha, Japan.
3. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น spectronic 21 ของบริษัท Bosh and Lomb, USA.
4. เครื่องวัดค่าดูดกลืนลำแสงคู่ (double beam spectrophotometer) รุ่น 210-5763 ของบริษัท Hitachi, Japan.
5. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH-meter) รุ่น ϕ70 ของบริษัท Beckman, USA.
6. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-3D ของบริษัท Hirayama Manufacturing Cooperation, Japan.
7. เครื่องเหวี่ยง (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, USA.
8. เครื่องเก็บลำดับส่วน (fractional collector) รุ่น FRAC-100 ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.
9. เครื่องทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze dryer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Takyo Rikakikai, Japan.
10. เครื่องวัดความหนืด (viscometer) รุ่น DV-II LV ของบริษัท Brookfield, USA.

เคมีภัณฑ์

1. เคมีภัณฑ์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

แป้งมันสำปะหลัง ของโรงงานแป้งมันไทยทำ ประเทศไทย

น้ำตาลทราย ของบริษัทน้ำตาลทรายมิตรผล จำกัด

ผงสกัดยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratory, Detroit, USA

โพลีเพพโตน (polypeptone) ของบริษัท Difco Laboratory,

Detroit, USA

โซเดียมไนเตรต (sodium nitrate) ของ E. Merck, Germany.

แอมโมเนียมไนเตรต (ammonium nitrate) ของ E. Merck,Germany.

แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ของ E. Merck,Germany.

ยูเรีย (urea) ของบริษัท BDH Chemicals Ltd.,Pools,England.

เอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (α-amylase) ชนิด X-A ของบริษัท Sigma,USA.

2. เคมีภัณฑ์ในการสกัดและทำให้บริสุทธิ์

เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ของโรงงานสุราอยุธยา องค์การสุรา กรมสรรพสามิต

โซเดียมไฮดร็อกไซด์ (sodiumhydroxide) ของ E. Merck,Germany.

ซีทิลไพรีดีเนียมคลอไรด์ (cetylpyredeniumchloride;cpc) ของบริษัท BDH Chemicals Ltd.,Pools,England.

กรดอะซีติก (acetic acid) ของ E. Merck,Germany.

กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ของบริษัท BDH Chemicals Ltd.,Pools,England.

3. เคมีภัณฑ์ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์

พีจีโอ เอนไซม์ (PGO enzyme) ของ Sigma,St. Louis, USA.

สีไดอะนิซิดีน (o-dianisidine) ของ Sigma,St. Louis, USA.

ฟีนอล (Folin-ciocalteu's phenol reagent) ของ E. Merck, Germany

กรดซัลฟูริก (sulfuric acid) ของ Mallinchrodt, USA.

4. เคมีภัณฑ์สำหรับการทำเจลฟิลเตรชั่น (gel filtration)

เซฟฟาเด็กซ์ จี-200 (sephadex G-200) ของ Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

บลูเด็กซ์แทรน (blue dextran) ของ Sigma,St. Louis, USA.

เด็กซ์แทรนขนาดโมเลกุล 487,000 153,000 40,200 และ 17,200 ของ Sigma,St. Louis, USA.

โปตัสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate) ของ BDH Chemicals Ltd.,Pools,England.

2. วิธีการดำเนินการทดลอง

2.1 จุลชีพที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 สายพันธุ์ราที่แยกจากดอกเห็ด (fruiting body) ที่รับประทานได้ 5 จีนัส (genus) รวม 11 สายพันธุ์ ได้แก่

เห็ดนางนวล (สีชมพู)	(Pleurotus sp.)
เห็ดนางรม	(P. ostreatus)
เห็ดนางฟ้า	(P. florida)
เห็ดเป๋าฮื้อ	(P. cystidiosus)
เห็ดภูฐาน	(P. sejor-caju)
เห็ดฟาง (ประเทศไทย)	(Volvariella volvaceae Thailand)
เห็ดฟาง (ประเทศไต้หวัน)	(V. volvaceae Taiwan)
เห็ดหิ้ง	(Ganoderma sp.)
เห็ดหมื่นปี	(G. lucidum)
เห็ดหูหนู	(Auricularia auricular)
เห็ดตีนตุ๊กแก	(Schizophyllum commune)

ดำเนินการทดลองคัดแยก (Isolate) เชื้อเห็ดจากดอกเห็ดด้วยเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue cluture) ตามวิธีที่รวบรวมไว้โดย H.L. Barnett และคณะ (1974) โดยดำเนินการทดลองดังนี้ แยกเอาเนื้อเยื่อภายในออกด้วยวิธีที่ปลอดเชื้อ (aseptic technique) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเนื้อเยื่อออกมา วางลงบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อโปเตโตเด็กซ์โตรส เอการ์ (Potato Dextrose Agar:PDA) จากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-10 วัน จนกระทั่งมีเส้นใยเกิดขึ้นบนอาหาร แล้วแยกเก็บ (subculture) ต่อไปในอาหารวุ้นแข็งเอียง PDA

2.1.2 เชื้อราสายใย Sclerotium rolfsii จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ลักษณะโคโลนีเป็นเส้นใยค่อนข้างฟูสีขาว สร้างเม็ด sclerotium สีน้ำตาลถึงสีดำ ไม่สร้าง spore

2.2 การเก็บรักษา (maintainance) เชื้อเห็ดชนิดต่าง ๆ และเชื้อ S. rolfsii

เขี่ยเส้นใย (mycelium) ของเชื้อเห็ดชนิดต่าง ๆ และเชื้อ S. rolfsii ลงหลอดอาหารวุ้นแข็งเอียง (agar slant) ที่มีโปเตโตเด็กซ์โตรสเอการ์ (potato dextrose agar: PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเส้นใยเจริญเต็มหลอดแล้วจึงนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

2.3 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (inoculum)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) ขูด (scrab) ที่ผิวอาหารให้เส้นใยของเชื้อเห็ดชนิดต่าง ๆ และเชื้อรา S. rolfsii หลุดออกจากอาหารวุ้นแข็งเอียง จากนั้นใส่ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ที่มีปริมาตรประมาณ 20 มล. นำไปตัดเส้นใยด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ที่ปราศจากเชื้อ ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำเส้นใยที่ถูกตัดแล้ว ไปเตรียมเป็นเชื้อตั้งต้นในปริมาณ $2x10^6$ แฟรกเมนท์ (fragments) ต่อ มล.

2.4 การศึกษาโพลีแซคคาไรด์ที่สร้างจากเห็ดที่รับประทานได้ (edible mushroom) บางสายพันธุ์

2.4.1 การศึกษาชนิดของอาหารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการสร้างโพลีแซคคาไรด์

ปลูกเชื้อเห็ดชนิดต่างๆโดยใช้ปริมาณของเชื้อตั้งต้นเป็น $2x10^6$ แฟรกเมนท์ต่อ มล. ในปริมาตร 10.0 มล. ลงในอาหารเหลวสูตร Czopex's Dox (รายละเอียดดูภาคผนวก ก.) ที่แปรผันชนิดของอาหารแหล่งคาร์บอนเป็น ซูโครส,กลูโคส,แลคโตส และกาแลคโตสในปริมาณชนิดละ 3.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยมีปริมาตรของอาหารเหลวขวดละ 100 มล. บรรจุในขวดเออร์รูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ปริมาตร 250 มล. นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาสกัดแยก (extraction) โพลีแซคคาไรด์แล้วชั่งหาน้ำหนักแห้งของโพลีแซคคาไรด์และชั่งหาน้ำหนักแห้งของโพลีแซคคาไรด์ โดยนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในเดซิเคเตอร์ (desicator) แล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งต่อไป

2.4.2 วิธีการสกัดแยกโพลีแซคคาไรด์

จากวิธีของ Ueda และคณะ (1981) นำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่ด้วย (culture broth) มาปั่นแยกเส้นใยของเห็ดด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วย 95% เอธานอลในปริมาตร 1-2 เท่าของปริมาตรตั้งต้น นำตะกอนที่ได้ไปอบชั่งน้ำหนักแห้ง พร้อมทั้งตรวจสอบว่าเป็นคาร์โบไฮเดรต โดยใช้วิธีฟีนอล ซัลฟูริก (phenol,sulfuric method) (รายละเอียดดูภาคผนวก ข.)

2.4.3 การจำแนกชนิด (classification) ของโพลีแซคคาไรด์ที่สร้างจากเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ ตามลักษณะประจุไฟฟ้า

จากวิธีของ Ueda และคณะ (1981) นำโพลีแซคคาไรด์ที่ตกตะกอนด้วย 95% เอธานอล และทำให้แห้งแล้ว มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล จากนั้นเติมสารละลายซีทิลไพรีดิเนี่ยมคลอไรด์ (cetylpyridi-

niumchloride;cpc) ที่มีความเข้มข้น 10% (2.0 มก. ของโพลีแซคคาไรด์ต่อ 2-3 มก. ของ cpc) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตตะกอนในสารละลาย ถ้าพบตะกอนแสดงว่าเป็นโพลีแซคคาไรด์ประเภทที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ถ้าไม่พบตะกอนนำมาทดสอบว่าเป็นโพลีแซคคาไรด์ประเภทที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) โดยตกตะกอนซ้ำด้วย 95% เอธานอลจะเกิดตกตะกอนขึ้นอีกครั้ง

2.4.4 การทดสอบหาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโพลีแซคคาไรด์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีกระดาษ (paper chromatography)

2.4.4.1 การไฮโดรไลซ์สมบูรณ์ (complete hydrolysis)

นำโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ มาทำการไฮโดรไลซ์อย่างสมบูรณ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4.0 โมลาร์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมงในระบบรีฟลักซ์ (reflux system) จากนั้นปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ กระทำโครมาโตกราฟีกระดาษของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์สมบูรณ์ โดยจุด (spot) สารละลายดังกล่าวบนกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 แล้วโครมาโตกราฟในถังที่อิ่มตัวด้วยบรรยากาศของตัวทำละลายบิวทานอล ไพริดีนและน้ำ ในอัตราส่วน 6:4:3 (โดยปริมาตร) ตามวิธีของ Hough, L. 1954 และตรวจสอบน้ำตาลบนกระดาษ ด้วยการแช่ลงในสารละลายของเกลือเงินไนเตรตในด่าง (Mayer,F.C.และ Larner,J.,1959) โดยมีชนิดของน้ำตาลมูลฐานที่ใช้เปรียบเทียบค่า R_f เป็นกลูโคส มอลโตส แลคโตส กาแลคโตส และฟรุกโตส

สำหรับวิธีการตรวจสอบน้ำตาลบนกระดาษ ด้วยสารละลายเกลือเงินไนเตรตในด่าง มีวิธีการดำเนินงาน คือ จุ่มกระดาษลงในสารละลายเงินไนเตรตในอะซีโตน (ละลายเกลือเงินไนเตรต 2.5 กรัมในน้ำ 6 มล. ผสมกับอะซีโตน 200 มล.) จนเปียกทั่วแล้ว นำออกมาผึ่งจนแห้ง จากนั้นนำไปจุ่มลงในสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์-เมธานอล (โซเดียมไฮดร็อกไซด์เข้มข้น 10% 1 ส่วน ผสมกับเมธานอล 5 ส่วน) จนมีจุดสีดำปรากฏขึ้น จึงนำไปล้างน้ำประปา แล้วนำมาจุ่มลงในสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เพื่อขจัดคราบสีส่วนเกินออก ล้างน้ำประปา และผึ่งจนกระดาษแห้ง

จากผลการศึกษาโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อรา S. rolfsii ในอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครส พบว่าให้ปริมาณของโพลีแซคคาไรด์สูงที่สุด เมื่อเทียบกับเชื้อเห็ดชนิดต่าง ๆ (ดังแสดงผลในตารางที่ 1) ดังนั้นในการทดลองต่อจากนี้ไปจะเป็นการศึกษาสเคลอโรกลูแคนจาก S. rolfsii ทั้งหมด

3. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสเคลอโรกลูแคน

3.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน

3.1.1 การหาปริมาณของกากน้ำตาลที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีกากน้ำตาลที่แปรผันปริมาณ 7.0,10.0, 12.0,15.0 และ 20.0% (น้ำหนักต่อปริมาตรน้ำกลั่น) โดยมีปริมาตรขวดละ 100 มล. ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มล. จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ชั่งน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ (total biomass) ทุกวัน โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่น 150 มล. แล้วกรองด้วยผ้าไนลอนที่มีขนาดรู เมช (mesh) นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บในเดซิเคเตอร์ (desicator) นาน 3 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้ง (น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพประกอบด้วยส่วนที่เป็นเส้นใยปนกับโพลีแซคคาไรด์บางส่วน)

หมายเหตุ :-ตลอดการทดลองศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสเคลอโรกลูแคนครั้งนี้ ใช้ปริมาตรของอาหารเป็น 100.0 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. โดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น $2x10^6$ แฟรกเมนต์ต่อ มล. ในปริมาตร 10 มล. ต่อปริมาตรอาหารเหลว 100 มล. และในการเก็บตัวอย่างไปศึกษานั้นได้ทำ 3 ซ้ำ (repicate)

3.1.2 การหาสัดส่วนและชนิดของแหล่งอาหารไนโตรเจนและแหล่งวิตามินที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 3.1.1 พบว่าปริมาณของกากน้ำตาลที่เหมาะสมในการเจริญมีปริมาณ 10.0% ดังนั้นเตรียมอาหารเหลวที่มีกากน้ำตาลในปริมาณดังกล่าวแล้วใช้สัดส่วนผสมแหล่งอาหารไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ และแหล่งวิตามิน โดยใช้น้ำหนักแห้งดังต่อไปนี้ ผงสกัดยีสต์ 0.10% ,ผงสกัดยีสต์และโพลีเพพโตนอย่างละ 0.05%, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.10% และโพลีเพพโตน 0.10% โดยใช้ผงสกัดยีสต์เป็นแหล่งวิตามิน แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นอาหารแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic) และโพลีเพพโตนเป็นอาหารแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ (organic) จากนั้นปลูกเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน (ที่ mid-log phase) หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.1.3 การหาค่าพีเอชที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 3.1.2 พบว่าในอาหารเหลวที่มีปริมาณกากน้ำตาล 10% ที่ไม่มีการเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนและแหล่งวิตามิน ให้ค่าของน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุด ดังนั้นยังคงใช้อาหารเหลวสูตรเดิมนี้อยู่ จากนั้นแปรผันค่าพี

018280

เอชของอาหารเหลว ตั้งแต่ค่า 1.0 ถึง 10.0 (1.0,2.0,...,9.0,10.0) ด้วยการปรับสภาพสารละลายให้เป็นกรดและด่างด้วย กรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปลูกเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.1.4 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 3.1.3 ในอาหารเหลวที่มีกากน้ำตาลปริมาณ 10.0% มีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุด ดังนั้นเตรียมอาหารตามสภาพดังกล่าว ปลูกเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงในตู้เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยแปรผันค่าอุณหภูมิดังนี้ 25,ห้อง (30±2),35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.1.5 การศึกษาการเจริญและการผลิตสเคลอโรกลูแคน

จากผลการทดลองในข้อ 3.1.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญในสภาพของอาหารที่มีกากน้ำตาลปริมาณ 10.0% มีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นปลูกเชื้อในอาหารเหลว นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ตามสภาพดังกล่าว ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย ชั่งหาน้ำหนักแห้งของสเคลอโรกลูแคนและวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป ในแต่ละวันโดยมีวิธีการดังนี้

3.1.5.1 วิธีสกัดแยก (extraction) สเคลอโรกลูแคน

ใช้วิธีของ Roger,1965 (Rehm และ Reed,1982) โดยมีวิธีการดังนี้ นำอาหารเหลวที่มีเชื้อราเจริญอยู่ (culture broth) ในขวดรูปชมพู่ของแต่ละวัน มาต้มในอ่างน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มล. ลงไปเพื่อลดความหนืด นำส่วนทั้งหมดนี้ไปตัดเส้นใยด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนที่ตัดเส้นใยทั้งหมดนี้ไปสกัดแยกเส้นใยและสารละลายส่วนใสด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้ นำตะกอนที่เหลือไปล้างด้วยน้ำกลั่นและใช้เครื่องเหวี่ยง แยกสารละลายส่วนใสทั้งสองครั้ง นำส่วนที่เป็นตะกอนไปชั่งหาค่าน้ำหนักแห้ง (เป็นค่าของน้ำหนักแห้งของเส้นใย)โดยนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในเดซิเคเตอร์นาน 3 ชั่วโมงแล้วจึงชั่งหาน้ำหนัก ส่วนที่เป็นสารละลายใส นำไประเหยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วย 95% เอธานอลที่เย็นโดยใช้ปริมาตร 1.5-2.0 เท่าของปริมาตรตั้งต้น นำตะกอนที่ได้ไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง (เป็นค่าน้ำหนักแห้งของสเคลอโรกลูแคน) โดยนำไปอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในเดซิเคเตอร์นาน 3 ชั่วโมง แล้วจึงชั่งหาน้ำหนักแห้ง

3.1.5.2 การหาค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป

นำส่วนที่เป็น culture broth ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ทั้งหมดในแต่ละวัน มาวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช

3.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยใช้น้ำตาลทราย (sucrose) เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน

3.2.1 การหาปริมาณของน้ำตาลทรายที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร Czapex's Dox (ดูภาคผนวก ก.) โดยแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนน้ำตาลทรายในปริมาณต่าง ๆ กัน ดังนี้ 3.0,5.0,7.0, 10.0,15.0 และ 20.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1

3.2.2 การหาชนิดและปริมาณของแหล่งอาหารไนโตรเจนและแหล่งวิตามินที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 3.2.1 ปริมาณน้ำตาลทรายที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุด คือ ที่ปริมาณ 10.0% ดังนั้น เตรียมอาหารเหลวที่มีปริมาณน้ำตาลทรายดังกล่าว และผสมอาหารแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ และแหล่งวิตามินลงไปตามชนิดและปริมาณดังนี้

5.2.2.1 ผงสกัดยีสต์

5.2.2.2 โพลีเพพโตน

5.2.2.3 โซเดียมไนเตรต

5.2.2.4 แอมโมเนียมไนเตรต

5.2.2.5 แอมโมเนียมซัลเฟต

5.2.2.6 ยูเรีย

โดยแปรผันปริมาณแหล่งอาหารไนโตรเจนทั้ง 5 ชนิดและแหล่งวิตามินในปริมาณ 0.20,0.40,0.60,0.80,1.0 และ 3.0% โดยน้ำหนักแห้ง ปลูกเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.2.3 การหาค่าพีเอชที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 3.2.2 ปลูกเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลทรายปริมาณ 10.0% ผงสกัดยีสต์ 1.0% ที่แปรผันค่าพีเอชตั้งแต่ 1.0 ถึง 10.0 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.2.4 การหาชนิดและปริมาณของแร่ธาตุต่าง ๆ ที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 3.2.3 พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมที่

ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุด มีค่าพีเอชเป็น 5.0 ดังนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3 โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 แล้วแปรผันชนิดและปริมาณของแร่ธาตุต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

3.2.4.1 โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่แปรผันปริมาณเป็น 0.00, 0.50,1.00,1.50 และ 2.00 กรัมต่อลิตร โดยน้ำหนักแห้ง

3.2.4.2 โปตัสเซียมคลอไรด์ที่แปรผันปริมาณเป็น 0.00,0.25, 0.50,0.75 และ 1.00 กรัมต่อลิตร โดยน้ำหนักแห้ง

3.2.4.3 แมกนีเซียมซัลเฟตที่แปรผันปริมาณเป็น 0.00,0.25, 0.50,0.75 และ 1.00 กรัมต่อลิตร โดยน้ำหนักแห้ง ปลูกเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.2.5 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการทดลองในข้อ 3.2.4 พบว่าชนิดและปริมาณของแร่ธาตุที่เหมาะสมที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุดคือ โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.50 กรัมต่อลิตร โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.25 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร ดังนั้นเตรียมอาหารเหลวเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4 โดยมีชนิดและปริมาณของแร่ธาตุต่าง ๆ ที่เหมาะสมดังกล่าว จากนั้นปลูกเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงในตู้เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ โดยค่าอุณหภูมิที่ใช้เช่นเดียวกับข้อ 3.1.4 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.2.6 การศึกษาการเจริญและการผลิตสเคลอโรกลูแคน

จากผลการทดลองในข้อ 3.2.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญมีค่าเป็น 35 องศาเซลเซียส ดังนั้นปลูกเชื้อลงในอาหารเหลวตามสูตรในข้อ 3.2.5 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิเป็น 35 องศาเซลเซียส ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย ชั่งหาน้ำหนักแห้งของสเคลอโรกลูแคน วัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป ในแต่วัน ตามวิธีในข้อ 3.1.5.1 และ 3.1.5.2

3.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยใช้แป้งมันสำปะหลัง (tapioca starch) เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน

3.3.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ยังไม่ได้ไฮโดรไลซ์ (non-hydrolyseed) เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน

3.3.1.1 การหาปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร Czapex' Dox (ดูภาคผนวก ก.) โดยแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนแป้งมันสำปะหลังในปริมาณต่าง ๆ กันดังนี้ 2.5,3.0, 3.5,4.0,5.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1

3.3.1.2 การหาชนิดและปริมาณของแหล่งอาหารไนโตรเจนและแหล่งวิตามินที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.1.1 ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุดคือ ที่ปริมาณ 3.5% ดังนั้นเตรียมอาหารเหลวที่มีปริมาณของแป้งมันสำปะหลังดังกล่าว และผสมอาหารแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ และแหล่งวิตามินลงไป ตามชนิดและปริมาณเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.2.2 จากนั้นปลูกเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.3.1.3 การหาสัดส่วนที่เหมาะสมของแหล่งวิตามิน

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.2 พบว่าชนิดและปริมาณของอาหารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ โซเดียมไนเตรตปริมาณ 0.8% ดังนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2 ผสมอาหารแหล่งไนโตรเจนในชนิดและปริมาณดังกล่าว จากนั้นเติมผงสกัดยีสต์ที่แปรผันปริมาณ 0.2,0.4,0.6,0.8 และ 1.0% โดยน้ำหนักแห้ง (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปลูกเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.3.1.4 การหาค่าพีเอชที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.1.3 สัดส่วนของแหล่งวิตามินที่เหมาะสมที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุดคือ ผงสกัดยีสต์ในปริมาณ 0.8% ดังนั้นเตรียมอาหารเหลวเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 ที่มีแหล่งวิตามินในปริมาณดังกล่าว จากนั้นแปรผันค่าพีเอชตั้งแต่ 1.0 ถึง 10.0 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.3.1.5 การหาชนิดและปริมาณของแหล่งแร่ธาตุที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.1.4 พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุด มีค่าพีเอชเป็น 5.0 ดังนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 จากนั้นเติมแหล่งแร่ธาตุที่แปรผันชนิดและแปรผันเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4 ปลูกเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.3.1.6 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.1.5 พบว่าชนิดและปริมาณของแร่ธาตุที่เหมาะสมที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุดคือ โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.75 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร ดังนั้นเตรียมอาหารเหลวเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.5 โดยมีชนิดและปริมาณของแร่ธาตุต่าง ๆ ที่เหมาะสมดังกล่าว จากนั้นปลูกเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงในตู้เขย่า

แบบควบคุมอุณหภูมิ โดยค่าอุณหภูมิที่ใช้เช่นเดียวกับข้อ 3.1.4 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.3.1.7 การศึกษาการเจริญและการผลิตสเคลอโรกลูแคน

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญมีค่าเป็น 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นปลูกเชื้อลงในอาหารเหลวตามสูตรในข้อ 3.3.5 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

แต่เนื่องจากยังคงมีส่วนเป็นแป้งมันสำปะหลังหลงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสามารถตกตะกอนได้ด้วยเอธานอล จึงต้องดำเนินการทดลองเพื่อกำจัดส่วนที่เป็นแป้งออก ดังนี้ หลังจากสกัดแยกเส้นใยออกจากสารละลายส่วนใส ตามวิธีในข้อ 3.1.5.1 แล้ว นำสารละลายส่วนใสไประเหยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วปรับค่าพีเอชให้มีค่าเป็น 6.9 จากนั้นใส่สารละลายเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยใช้ความเข้มข้น 0.01 กรัมเอนไซม์ต่อ มล. ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในปริมาณ 2 มล. ต่อ 100 มล. จากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยา โดยนำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วจึงนำมาตกตะกอนด้วย 95% เอธานอลที่เย็น โดยใช้ปริมาตร 1.5-2.0 เท่าของปริมาตรตั้งต้น นำตะกอนที่ได้ไปชั่งหาน้ำหนักแห้งของสเคลอโรกลูแคนต่อไป ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย วัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป ตามวิธีในข้อ 3.1.5.1 และ 3.1.5.2 ในแต่ละวัน

3.3.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed) ด้วยเอนไซม์อัลฟา อะไมเลส เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน

3.3.2.1 การหาปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่นำไปไฮโดรไลซ์ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลังในปริมาตร 100 มล. ต่อ 1 ขวดรูปชมพู่ โดยแปรผันปริมาณของแป้งมันสำปะหลังเป็น 3.5,5.0,10.0 และ 15.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับค่าพีเอชเป็น 6.9 จากนั้นใส่สารละลายเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 กรัมเอนไซม์ต่อ มล. โดยใช้ปริมาณดังนี้

สารละลายแป้งมันสำปะหลัง 3.5% ต่อสารละลายเอนไซม์ 3.0 มล.
สารละลายแป้งมันสำปะหลัง 5.0% ต่อสารละลายเอนไซม์ 5.0 มล.
สารละลายแป้งมันสำปะหลัง 10.0% ต่อสารละลายเอนไซม์ 10.0 มล.
สารละลายแป้งมันสำปะหลัง 15.0% ต่อสารละลายเอนไซม์ 15.0 มล.

จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวลา 2 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยนำมาต้มในอ่างน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงใส่อาหารแหล่งไนโตรเจน แหล่งวิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ ในชนิดและปริมาณเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.3.5 จากนั้นดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1

3.3.2.2 การหาค่าพีเอชที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.2.1 ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่นำไปไฮโดรไลซ์ที่เหมาะสมโดยให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงสุด คือ ประมาณ 10.0% ดังนั้นเตรียมอาหารเหลวให้มีสภาพดังกล่าว จากนั้นแปรผันค่าพีเอชตั้งแต่ค่า 1.0 ถึง 10.0 ปลูกเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.3.2.3 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.2.2 พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเป็น 4.0 ดังนั้นเตรียมสูตรอาหารเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 จากนั้นปลูกเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ โดยค่าอุณหภูมิที่ใช้เช่นเดียวกับข้อ 3.1.4 ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ชั่งหาน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

3.3.2.4 การศึกษาการเจริญและการผลิตสเคลอโรกลูแคน

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.2.3 อุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญมีค่าเป็น 35 องศาเซลเซียส ดังนั้นปลูกเชื้อลงในอาหารเหลวสูตรเช่นเดียวกับข้อ 3.4.3 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิเป็น 35 องศาเซลเซียส ชั่งหาน้ำหนักแห้งเส้นใย ชั่งหาน้ำหนักแห้งสเคลอโรกลูแคน วัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนไปในแต่ละวัน เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.1.5.1 และ 3.1.5.2

4. การศึกษาความบริสุทธิ์ของสเคลอโรกลูแคน

4.1 การตรวจสอบประจุบนสเคลอโรกลูแคนที่แยกสกัดได้

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับวิธีของ Ueda และคณะ (1981) ในข้อ 2.4.3

4.2 การกำจัดส่วนที่เป็น impurity

จากวิธีของ Prem และ Roy (1974) นำผงสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้ 0.75 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.10 นอร์มอล ปริมาตร 50 มล. จากนั้นปรับค่าพีเอชให้เป็น 7.0 โดยใช้กรดอะซีติกที่เย็นที่ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ จากนั้นตกตะกอนซ้ำด้วย 95% เอธานอลที่เย็น นำตะกอนที่ได้ไปไดอะไลซ์ (dialyze) ให้น้ำที่ปราศจากอิออน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บส่วนของสเคลอโรกลูแคนที่ไดอะไลซ์แล้ว นำไประเหยน้ำออกโดยวิธีใช้เครื่องทำให้แห้งด้วยความ

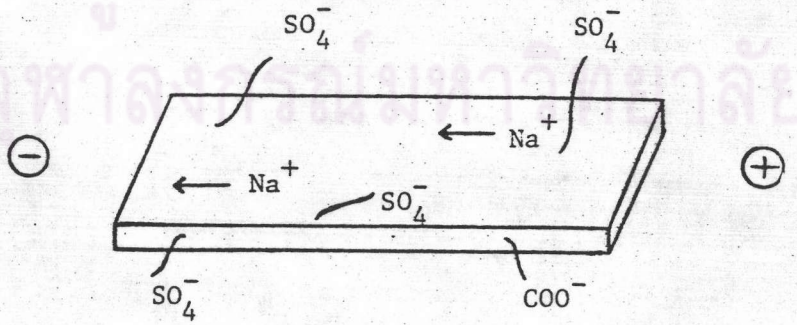
เย็น (freeze dryer)

4.3 การตรวจวิเคราะห์น้ำตาล

จากวิธีของ Kritzman,Chet และ Heris (1978) นำผงสเคลอโรกลูแคนทั้งที่เป็นส่วนที่ยังไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (crude) และที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มาไฮโดรไลซ์อย่างสมบูรณ์ (complete hydrolysis) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ ในระบบรีฟลักซ์ (reflux system) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าพีเอชของส่วนที่ไฮโดรไลซ์แล้ว (hydrolysate) ให้เป็นกลาง แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี ฟีนอล-ซัลฟูริก,น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธี DNSA และปริมาณกลูโกส โดยพีจีโอ เอนไซม์ (PGO-enzyme) (รายละเอียดดูในภาคผนวก ข.)

4.4 การตรวจสอบการมีขั้ว (Polarity)

ทำการตรวจสอบโดยวิธีอิเลคโทรเอนดอสโมซิส (Electroendosmosis, EEO) ตามวิธีของ Weim,R.J., (1965) การตรวจสอบการมีขั้วเป็นลักษณะหนึ่งที่ใช้บ่งบอกถึงเกณฑ์ความบริสุทธิ์ โดยพิจารณาจากค่าของ EEO ซึ่งหมายถึงการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุในตัวค้ำจุน (matrix) หรือเจลนั่นเอง เมื่อมีกระแสไฟฟ้าผ่านตัวค้ำจุน ตัวอย่างของโมเลกุลที่มีประจุลบ มักเป็นซัลเฟต (SO_4^-) และไพรูเวต (pyruvate) และประจุบวกมักเป็นโซเดียมอิออน (Na^+) ดังนั้นเมื่อมีการให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านตัวค้ำจุนที่เป็นเจลนี้ ส่วนที่เป็นโซเดียมอิออนที่มีน้ำล้อมรอบอยู่ ก็จะวิ่งไปยังขั้วลบ ส่วนพวกที่มีประจุลบ จะถูกตรึงอยู่กับตัวค้ำจุน ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ดังแสดงในรูป



ดังนั้นค่า EEO จึงเป็นค่าที่สามารถบ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของสารที่ใช้เป็นตัวค้ำจุนหรือเจลได้ โดยถ้าค่า EEO สูงแสดงว่ามีส่วนของประจุลบอยู่มาก และถ้าค่า EEO ต่ำจนเข้าใกล้ 0 แสดงว่ามีลักษณะประจุเป็นกลาง การทดลองหาค่า EEO มีวิธีการดังนี้

เตรียมสารละลายของตัวอย่างเจลที่ใช้เป็นตัวค้ำจุน ความเข้มข้น 1.0% ปริมาตร 3 ลบ.ซม. ในสารละลายบาร์บิทอลบัฟเฟอร์ (barbital buffer) จากนั้นเทราด (pour) ลงบนแผ่นสไลด์ (slide) ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จนเจลแข็งตัวดี เจาะเจลให้เป็นรูด้านปลายของพาสเจอร์ปิเปต (pasteur pipette) แล้วใส่สารละลายผสมของ 1% ฮิวแมนอัลบูมิน (human albumin),1% เด็กซ์แทรน ที-70 และโบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ในบาร์บิทอลบัฟเฟอร์ ลงไปปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำแผ่นสไลด์ที่เตรียมได้นี้ใส่ลงใน Electrophoretic Chamber (ชนิด submerged) ที่บรรจุบาร์บิทอลบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 8.5 เปิดกระแสไฟฟ้า 6 โวลต์ต่อเซนติเมตร รอจนกระทั่งสีของโบรโมฟีนอลบลู มาถึงบริเวณตอนปลายของสไลด์

ตัดเจลออกเป็น 2 ส่วนตามยาว ส่วนแรกนำไปย้อมดูรอยของเด็กซ์แทรนในสารละลายที่มี 70% เอธานอลผสมกับ 10% กรดอะซิติก นาน 3 ชั่วโมง หรือข้ามคืนจนกระทั่งเห็นรอยสีขาวของเด็กซ์แทรนปรากฏขึ้น อีกส่วนหนึ่งนำไปย้อมสีสำหรับดูรอยของอัลบูมิน โดยย้อมในสารละลายที่มี 1% โคมาซี บริลเลียนท์ บลู (Coomasie brilliant blue) 25% เมธานอล และ 5% กรดอะซิติก เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างสีย้อมออกด้วยสารละลายที่มี 25% เมธานอล และ 5% กรดอะซิติก จะเห็นรอยสีฟ้าของอัลบูมิน

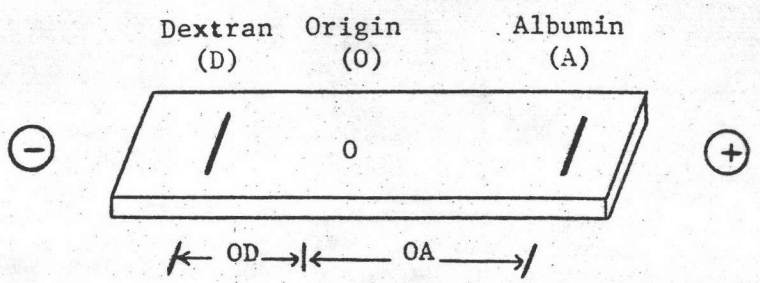
จากนั้นคำนวณหาค่า EEO โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ค่า EEO} = \frac{OD}{OD+OA}$$

โดยที่ OD หมายถึง ระยะทางที่เด็กซ์แทรนเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น

OA หมายถึง ระยะทางที่อัลบูมินเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น

ดังแสดงในรูป



เมื่อคำนวณค่า EEO ได้แล้วนำมาเปรียบเทียบช่วงค่าความเป็น EEO จากข้อมูลมาตรฐาน ดังแสดงข้างล่างนี้

	ค่า EEO
ต่ำมาก	$\leq$ 0.05
ต่ำ	0.10-0.15
ปานกลาง	0.16-0.19
สูง	0.23-0.26
สูงมาก	$\geq$ 0.30

4.5 การตรวจสอบชนิดของพันธะ (linking) โดยวิธีอินฟราเรดสเปคตรา (Infrared spectra;IR)

ทำการทดสอบ IR ของสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (model 137) ของบริษัท ir Perkin Elmer โดยใช้ pellets ที่ผสมด้วยผงสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้ 10 มก. กับโปรตัสเซียมโบรไมด์ 100 มก.

ผลของการเปรียบเทียบกราฟ IR จากสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้ กับลักษณะกราฟที่รายงานโดย Kritzman และคณะ 1978 ดูในภาคผนวก ค.

5. การศึกษาคุณสมบัติบางประการ

5.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อสมบัติการอุ้มน้ำ (imbibition property)

ตามวิธีการสกัดแยกสเคลอโรกลูแคนในข้อ 3.1.5.1 หลังจากตกตะกอนด้วย 95% เอธานอลที่เย็นแล้ว นำตะกอนที่มีลักษณะเป็นเจล (gel) ของสเคลอโรกลูแคนที่ได้ชั่งน้ำหนัก โดยมีค่าละเอียดถึง 0.1 มก. เป็นค่าน้ำหนักเปียก (wet weight) โดยใส่ในถ้วยเหล็ก จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 40,50,60 และ 80 องศาเซลเซียส ชั่งหาน้ำหนัก ตรวจสอบทุก 12 ชั่วโมง จนกว่าจะได้ค่าน้ำหนักแห้ง (dry weight) ที่คงที่ เก็บใส่เดซิเคเตอร์บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ นำน้ำกลั่นใส่ลงในแต่ละถ้วยเหล็กให้มีปริมาณมากเกินพอ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง คว่ำถ้วยเหล็กเพื่อเทน้ำทิ้ง โดยคว่ำไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำถ้วยเหล็กที่มีสเคลอโรกลูแคนบรรจุอยู่ ไปชั่งหาน้ำหนัก บันทึกผลเปรียบเทียบน้ำหนักของน้ำที่ถูกอุ้มไว้

5.2 การเปรียบเทียบค่าความหนืด (viscocity) ของสเคลอโรกลูแคน ที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

นำผงสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากแหล่งอาหารคาร์บอนทั้งหมด ที่ผ่านขั้น

ตอนการทำให้บริสุทธิ์และมาละลายในน้ำที่ปราศจากอิออน โดยให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5% จากนั้นนำไปวัดค่าความหนืดด้วยเครื่อง viscometer โดยใช้ spindle ขนาด No. 2 ความเร็วของ spindle เป็น 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

5.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความหนืด

เตรียมสารละลายสเคลอโรกลูแคน เช่นเดียวกับข้อ 5.2 โดยมีความเข้มข้น 0.07% จากนั้นนำสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 10,ห้อง (30±2), 50,70 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีและที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าความหนืดโดยวิธีการวัดเช่นเดียวกับข้อ 5.2

5.4 การศึกษาผลของค่าพีเอชต่อความหนืด

เตรียมสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่มีความเข้มข้น 0.03% โดยละลายในน้ำที่ปราศจากอิออนที่แปรผันค่าพีเอชตั้งแต่ 1.0-12.0 โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ และกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำมาวัดค่าความหนืดโดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 5.2

5.5 การศึกษาผลของปริมาณเกลือต่อความหนืด

เตรียมสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่มีความเข้มข้น 0.07% ในน้ำที่ปราศจากอิออนที่แปรผันปริมาณเกลือ (sodium chloride) ดังนี้ 0.0,1.0,1.5,2.0,2.5, 3.0,3.5 และ 4.0% จากนั้นนำมาวัดค่าความหนืดโดยวิธีการวัดเช่นเดียวกับข้อ 5.2

5.6 การหาขนาดโมเลกุล (molecular size) ของสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

จากวิธีของ Hiura และคณะ (1984) โดยกรองสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ 0.10 นอร์มอล ผ่านคอลัมน์ (column) ที่บรรจุด้วยเซฟาเด็กซ์ จี-200 เพื่อหาขนาดโมเลกุลเปรียบเทียบกับ เด็กซ์แทรนมาตรฐานและกลูโคสที่ทราบขนาดโมเลกุลดังต่อไปนี้ คือ 2,000,000 (blue dextran), 487,000, 153,000, 40,200, 17,200 โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้ บรรจุเซฟาเด็กซ์ จี-200 ที่ปล่อยให้เม็ดเจล (gel-bead) พองตัวเต็มที่ในสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.10 นอร์มอล ลงในคอลัมน์แก้วขนาด 2.4x7.0 ซม. ผ่านสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์หลาย ๆ ครั้งจนเจลในคอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์ที่อัตราการไหล 0.12 มล. ต่อนาที ภายใต้ความดันน้ำ 5-20

ชม. ผ่านสารละลายเด็กซ์แทรนมาตรฐาน, กลูโคส และสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ แล้วชะออกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.10 นอร์มอลเก็บสารละลายเด็กซ์แทรนมาตรฐานกลูโคสและสเคลอโรกลูแคนที่ผ่านคอลัมน์มาใส่หลอดทดลองหลอดละ 1.50 มล. ภายใต้สภาวะเจลที่อยู่ในสมดุล ด้วยเครื่องเก็บลำดับส่วน (fractional collector) วัดหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟเพื่อหาช่วงค่าขนาดโมเลกุลของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ เทียบกับเด็กซ์แทรนมาตรฐานและกลูโคส สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของสเคลอโรกลูแคน ใช้วิธีการของ Andrews (Andrews,1965) โดยปริมาตรช่องว่างระหว่างเม็ดเจล (void volume) หาได้จากการผ่านบลูเด็กซ์แทรน 4 มก./มล. ลงในคอลัมน์ และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า K_{av} (partition coefficient) ตามสมการต่อไปนี้

$$K_{av} = \frac{Ve-Vo}{Vt-Vo}$$

เมื่อ Ve = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ที่ใช้ในการชะโพลีแซคคาไรด์

Vo = ปริมาตรช่องว่างระหว่างเม็ดเจล

Vt = ปริมาตรภายในคอลัมน์ทั้งหมด

นำค่า K_{av} และค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของเด็กซ์แทรนมาตรฐาน ไปวาดกราฟมาตรฐาน

5.7 <u>การศึกษาผลของการไฮโดลไลซ์บางส่วน (partial hydrolysis) ของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลซ์ด้วยเอ็นไซม์ต่อขนาดโมเลกุล</u>

นำผงสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ มาทำการย่อยสลายบางส่วนในกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง ในระบบรีฟลักซ์ ปรับค่าพีเอชของส่วนที่ไฮโดรไลซ์แล้วให้เป็น 7.0 จากนั้นนำมากรองผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเซฟาเด็กซ์ จี-200 โดยดำเนินวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 5.6

5.8 <u>การศึกษาผลของการไฮโดรไลซ์สมบูรณ์ (complete hydrolysis) ของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ต่อขนาดโมเลกุล</u>

นำผงสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ มาทำการไฮโดรไลซ์สมบูรณ์โดยดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3 จากนั้นกรองส่วนที่ย่อยสลายแล้วผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเซฟาเด็กซ์ จี-200 โดยดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย