บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์การทดลอง

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

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ(Incubator Shaker) รุ่น RC-TK ของบริษัท Infors Co.,Ltd.

เครื่องผสม(Vortex) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries,Inc.,U.S.A

เครื่องปั่นเหวี่ยง(Microcentrifuge)รุ่นMC-15A ของบริษัท Tomy Seiko Co.,Ltd.,Tokyo,Japan.

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

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง(pH meter) ของบริษัท Radiometer Copen hagen Denmark

เครื่องระเหยแห้งภายใต้สูญญากาศแบบหมุน (Rotary vaccuum evapora tor) RE 52 ของบริษัท Yamato Scientific Co.,Ltd.,Japan

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

ถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300 พร้อมใบพัดแบบเทอร์ไบน์ (Turbine Impeller) และชุดควบคุมสภาวะของบริษัท L.E.Marubishi,Tokyo,Japan

เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น(circulation type handy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaka,Japan

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง(Spectrophotometer) ของบริษัท Bausch&lomb U.S.A

เครื่องอัดอากาศ(air compressor) ของบริษัท Hitachi,Japan

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

แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (haemacytometer) รุ่น Neubauer Bright Line ของบริษัท Bocco Co.Ltd.,Germany

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

สารเคมีที่ใช้นอกจากที่กล่าวมานี้ สั่งซื้อจากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน และสารอาหารเช่นวุ้นผง น้ำตาลซูโครส น้ำมันถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันแล้ว กากเมล็ดฝ้ายที่สกัดน้ำมันแล้ว ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะใช้เกรดการค้าที่มีจำหน่ายในประเทศไทย

2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อ *Gibberella fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดย จันทร์ธิรา ลัภยพร(2536)

3. วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เขี่ยเส้นใยของสายพันธุ์กลายพันธุ์เชื้อ *Gibberella fujikuroi* โดยใช้เข็มเขี่ย

เชื้อลากบนอาหารแข็งเอียง(slant agar)โพเตโตเด็กซ์โทรสอาการ์เสริมแร่ธาตุ (potato dextrose agar,PDA ภาคผนวกที่ 1.1) ที่อยู่ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

4.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยเส้นใยสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อ *Gibberella fujikuroi* ลงบนอาหารแข็งเอียงอะซิเตต(acetate agar slant) ภาคผนวกที่ 1.2 ที่อยู่ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดไฟที่มีความเข้มแสง 9840 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เข็มเขี่ยสปอร์ให้ทั่ว และกระจายสปอร์ในน้ำให้เป็นสปอร์แขวนลอย โดยเครื่องผสม(mixer) กรองสปอร์แขวนลอยที่ได้ผ่านผ้าขาวบางที่ซ้อนทับกันหนา 5 ชั้น ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นับจำนวนด้วยแผ่นนับเม็ดเลือดแดง (haemacytometer)

ในกรณีที่ใช้เชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส จะต้องนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งเอียงโพเตโตเด็กซ์โทรสอาการ์เสริมแร่ธาตุ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้เส้นใยเจริญเต็มที่ จึงนำมาใช้เพื่อเตรียมสปอร์ตามวิธีข้างต้น

4.2 การเตรียมหัวเชื้อ

4.2.1 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อใช้หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ในระดับขวดเขย่า

นำสปอร์แขวนลอยจากข้อ 4.1 จำนวน 10^6 สปอร์ ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ภาคผนวกที่ 1.3 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ(rotary incubator shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.2.2 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อใช้หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

นำสปอร์แขวนลอยจากข้อ 4.1 จำนวน 10^6 สปอร์ ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ภาคผนวกที่ 1.11 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด

250 มิลลิลิตร นำเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต GA_3

4.3.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต GA_3 ในระดับขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 4.2.1 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิต GA_3 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. และทำการแปรผันเพื่อหาปริมาณแหล่งปริมาณไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน ฟอสเฟต แมกนีเซียม อะลูมิเนียมออกไซด์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิระหว่างการหมักที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ตามสูตรอาหารที่แสดงในบทภาคผนวก และนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว ไปใช้ศึกษาการผลิต GA_3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ดังผลการทดลองในบทที่ 3 ทำการหมักบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวันที่ 7 10 และ 13 ของการหมัก วัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ตามวิธีการที่กล่าวถึงในข้อ 5

4.3.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต GA_3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามข้อ 4.2.2 ให้ได้ปริมาณรวม 350 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิต GA_3 ปริมาตร 3,150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และทำการแปรผันเพื่อหาปริมาณสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากเมล็ดฝ้าย อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ และการเติมน้ำตาลกลูโคส ที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ตามสูตรอาหารที่แสดงในบทภาคผนวก และใช้สารอะดีคานอล(adecanol) เป็นสารต่อต้านการเกิดฟอง เก็บตัวอย่างทุกวัน ครั้งละ 25 มิลลิลิตร วัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลรีดิวสทั้งหมด และวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ตามวิธีการดังกล่าวในข้อ 5

5. วิธีการวิเคราะห์

5.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักปริมาณ 25 มิลลิลิตร มากรองผ่านกระดาษกรอง วัทแมน เบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ล้างเส้นใยบนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักและหักลบน้ำหนักกระดาษ จะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง

5.2 การหาค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก

วัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

5.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) โดยวิธีการของ Bernfeld (Bernfeld,1955)

เติมสารละลายกรดไดในโตรซาลิไซลิก ภาคผนวกที่ 2.2 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

5.4 การวิเคราะห์ปริมาณซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส(invertase)

เติมสารละลายอินเวอร์เทสลงในอะซิเตตบัพเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4 ภาคผนวกที่ 2.3 ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ด้วยวิธีตามข้อ 5.3 นำปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากข้อ 5.4 ลบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากข้อ 5.3 จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดจากน้ำตาลซูโครสในตัวอย่าง

กราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายซูโครสมาตรฐานเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสกับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

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

เติมสารละลายพีจีโอ เอนไซม์(P.G.O enzyme) ภาคผนวกที่ 2.4 จำนวน

2.5 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เขย่าให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0-200ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

5.6 การวิเคราะห์ปริมาณฟรักโทรส

นำปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากข้อ 5.3 ลบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากข้อ 5.5 จะเป็นปริมาณน้ำตาลฟรักโทรสที่มีในตัวอย่าง

5.7 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธีของ Kjeldahl

นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมของผสมของเกลือ ภาคผนวกที่ 2.5.1 ปริมาณ 7 กรัม เติมกรดกำมะถันเข้มข้น ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุม(digester)ด้วยเครื่อง Buchi 425 ในตู้ควัน จนได้สารละลายใสสีเขียวทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 37 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการกลั่นจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้น โดยใช้สารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้อินดิเคเตอร์(indicator) ภาคผนวกที่ 2.5.2 จำนวน 2 หยด กลั่นจนสารละลายกรดบอริก มีปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาติเตรตกับ 0.1 โมลาร์ ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

โดยที่

ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด =(A-B) x N x 1.4

เมื่อ

A = ปริมาตร(มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการติเตรตกับตัวอย่าง

B = ปริมาตร(มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการติเตรทกับแบลงค์

N = ความเข้มข้น (นอร์มอล) ของกรดไฮโดรคลอริก

5.8 การวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก(GA_3) โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) ปรับปรุงจากวิธีการของ อรไท สุขเจริญ(2533) และ สุภาพร พรพรหมกุล(2533)

นำตัวอย่างน้ำหมักมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 (วัดด้วยเครื่องวัดพีเอช) ด้วย 2 โมลาร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำตัวอย่างที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างแล้วมา 3 มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) paracetamol ที่มีความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 200 ไมโครลิตร สกัดของผสมทั้งหมดด้วยเอทธิลอะซิเตตจำนวน 5 มิลลิลิตร ในหลอดเกลียวเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสมนาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น แล้วจึงนำชั้นของน้ำหมัก 2 มิลลิลิตร มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 3 ด้วย สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 70 ไมโครลิตร จากนั้นสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต 4 มิลลิลิตร เขย่านาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น นำชั้นของเอทธิลอะซิเตต มาขจัดน้ำออกด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส(sodium sulphate anhydrous) นำส่วนของเอทธิลอะซิเตตที่ได้ 3 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สูญญากาศแบบหมุน(rotary vaccuum evaporater) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำมาละลายด้วยสารละลายเมทธานอลเข้มข้นร้อยละ 35 ในสารละลายกรดฟอสฟอริกพีเอช 3 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตตที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ด้วยเครื่อง HPLC คำนวณปริมาณ GA_3 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ภาคผนวกที่ ค ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ อรไท สุขเจริญ(2533)

คอลัมน์ : Spherisorb 5 C_8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มม. ยาว 250 มม.

สารละลายตัวพา : เมทธานอลและสารละลายกรดฟอสฟอริก พีเอช 3 อัตราส่วน 35 ต่อ 65 คงที่ตลอดการทดลอง

อัตราการไหลของสารละลายตัวพา : 1 มล. ต่อ นาที

ตรวจวิเคราะห์ด้วย UV : 208 นาโนเมตร

ความไวของเครื่องตรวจวัด : 0.08 AUFS (absorbance unit full scal)

ความดัน : 195-225 กิโลกรัมต่อตารางลูกบาศก์เซนติเมตร

ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ : 10 ไมโครลิตร

เวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์(retention time) : 0.95-10.00 นาที