บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้

Psychrotherm incubator shaker model G-27 New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., USA.

Psychrotherm incubator shaker type KF-4 No.86129 infors AG Rittergasse 27 CH-4103 Bottmingen, Swizerland.

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) PHM 82 Standard pH meter บริษัท Radiometer Copenhagen, Denmark.

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) model HA-26 บริษัท Hirayama Manufacturing Co-oporation, Tokyo, Japan.

เครื่องเขย่า (Vortex) Vortex-Genie No.16824 Scientific industries, Inc., Bohemia, N.Y. 11716, USA.

เครื่องไฮเพอฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography) Shimadzu LC-3A บริษัท Shimadzu Co. Ltd.,Japan.

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 บริษัท Bosch & Lomb, USA.

เครื่องวัดค่าความเข้มของการดูดกลืนแสง (High Speed TLC- Scanner) รุ่น CS-920 บริษัท Shimadzu Co., Ltd., Japan.

กล้องจุลทรรศน์ (microscope)รุ่น CHA บริษัท Olympia Optical Co. Ltd., Japan.

กล้องจุลทรรศน์ Nikon UFX-11 , Nikon Inc., Instrument Division Garden City ,N.Y., USA.

2.1.2 สารเคมี

สารมาตรฐาน GA_3 GA_4 GA_7 และสารผสมของ $GA_4 + GA_7$ (ในสัดส่วน 47% และ 45.5% ตามลำดับ) ของบริษัท Kyawa Hokko Kogyo Co. Ltd., Japan.

เอทธิลอะซีเตต (ethyl acetate) เป็นเคมีภัณฑ์เกรดการค้า (commercial grade) เคมีภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ เป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (analitical grade) จากบริษัท Sigma Chemical Co., สหรัฐอเมริกา บริษัท B.D.H. ประเทศอังกฤษ บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ เป็นต้น

แผ่นทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC aluminium sheets silica gel 60 F_{254}) ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร หนา 0.2 มม. บริษัท E.Merck Damstadt, Germany.

เมล็ดข้าวแคระ Tanginbozu Dwarf Rice สำหรับการตรวจสอบจิบเบอเรลลินโดยวิธีทางชีวภาพ (bioassay) ได้รับความอนุเคราะห์จากด็อกเตอร์ Y.Murakami แห่ง National Institute of Agro-Biological Resources, ประเทศญี่ปุ่น โดยผ่านทาง Prof. Dr. Y. Yamada แห่งมหาวิทยาลัย โอซากา ประเทศญี่ปุ่น

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา Gibberella fujikuroi ที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบ 6 สายพันธุ์ โดยให้ชื่อสายพันธุ์เป็น A,B,C,D,E และ F ตามลำดับ

2.3 วิธีการเก็บและการเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการวิจัย

2.3.1 การเก็บรักษาเชื้อ Gibberella fujikuroi

เขี่ยสายใยของเชื้อ Gibberella fujikuroi โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โพเตโตเด็กซ์โตรสอการ์ (ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว จึงเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 °ซ

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อให้สร้างสปอร์และการเตรียมสปอร์แขวนลอย

ถ่ายเชื้อ Gibberella fujikuroi จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2.3.1 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียงในขวดแก้วทรงแบน (ภาคผนวกที่ 1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจะเห็นสปอร์สีชมพูหรือม่วงอ่อน หลังจากนั้นถ่ายสปอร์ออกจากขวดด้วยวิธีล้างด้วยสารละลายทวีน-80 (Tween-80) ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 50 มล. แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง ที่ทับซ้อนกันหนา 4-5 ชั้น นับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometer

2.3.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมหัวเชื้อในขวดแก้วทรงกรวย

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อปริมาณ 2×10^7 สปอร์ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.3) ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °ซ ด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 70-72 ชั่วโมง

2.3.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตจิบเบอเรลลินในขวดแก้วทรงกรวย

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.3.3 ปริมาตร 5 มล. ลงในอาหารเหลวสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ (ภาคผนวกที่ 1.4 และ 1.5) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °ซ ด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักมาทำการวิเคราะห์ทุกวันเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก

2.4 วิธีการวิเคราะห์

2.4.1 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7)

2.4.1.1 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลินโดยวิธีทางชีววิทยา (bioassay)

วิธีการที่ใช้ดัดแปลงมาจากวิธีของ R.J.Weaver

(20) โดยเตรียมเมล็ดข้าวแคระสำหรับการตรวจสอบ (Tanginbozu dwarf rice seed) โดยฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite; NaOCl) ความเข้มข้น 3% เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างเมล็ดข้าวด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง จนปราศจากโซเดียมไฮโปคลอไรท์ แช่เมล็ดข้าวที่ล้างน้ำกลั่นแล้วในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ แล้วบ่มเลี้ยงไว้ให้รากอ่อน(ceotile)งอกที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 2 วันจนเห็นรากอ่อนงอกยาวประมาณ 2 มม. นำเมล็ดข้าวที่งอกดังกล่าววางลงบนผ้าขาวบางที่ซ้อนกันหนา 8-9 ชั้น ที่ปูอยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ(petridish) ขนาด 1.5x9 ซม. ทั้งจานเพาะเลี้ยงและผ้าขาวบางผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว การวางเมล็ดข้าววางเป็นระยะโดยให้แต่ละเมล็ดห่างกันพอควร โดยในแต่ละการทดลองใช้จำนวน 12 เมล็ดต่อหนึ่งจานเพาะเลี้ยง และ 4 จานเพาะเลี้ยงต่อหนึ่งตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ จากนั้นเติมสารละลายจิบเบอเรลลินความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.01-10.0 ส่วนในล้านส่วน(ppm) ปริมาตร 3 มล. และสารละลายอาหารพืช (Hoagland's solution-half strength, ภาคผนวกที่ 2.3) ปริมาตร 5 มล. และน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 10 มล.ต่อหนึ่งจานเพาะเลี้ยง จากนั้นวางจานเพาะเลี้ยงดังกล่าว ไว้ในกล่องที่มีความชื้นอิ่มตัว และบ่มเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Psychrotherm incutator) 25°ซ ในสภาพมีแสงสว่างตลอด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 9 วัน (ลักษณะการบ่มจานเพาะเลี้ยงแสดงไว้ในรูปที่ 3 และ 4) เปรียบเทียบผลการเจริญของเมล็ดข้าวกับกราฟมาตรฐาน

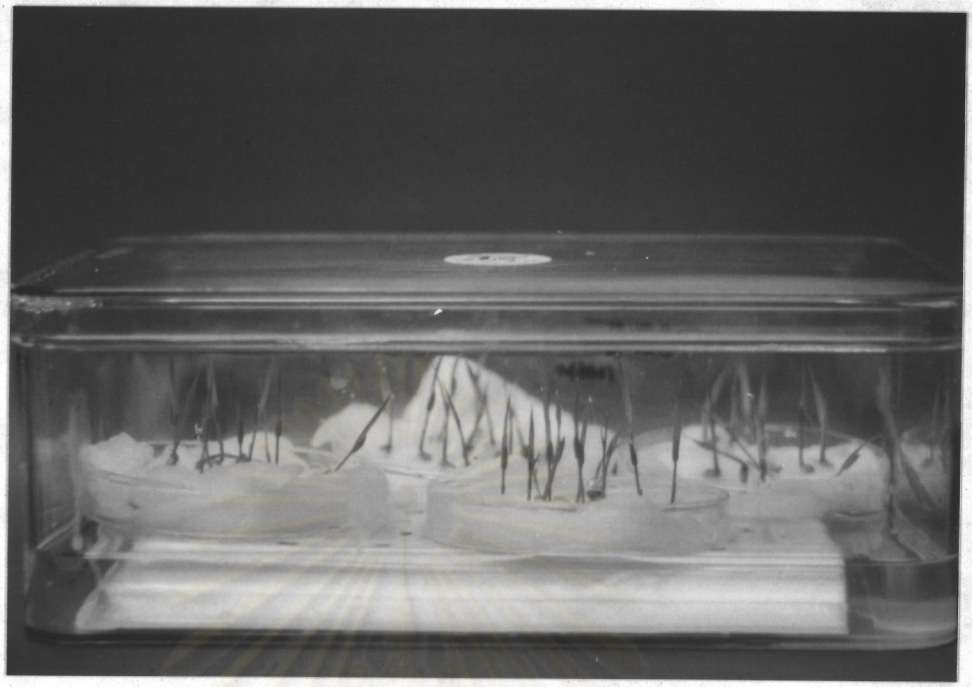
ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐาน GA_3 GA_4 GA_7 และสารผสมของ $GA_4 + GA_7$ (ในสัดส่วน 47 และ 45.5% ตามลำดับ) ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.01 0.1 1 และ 10 ppm แล้วนำไปหาปริมาณจิบเบอเรลลินตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของผลการเจริญ กับความเข้มข้นของจิบเบอเรลลิน

วิธีคำนวณค่าผลการเจริญของเมล็ดข้าว

วัดความยาวของต้นข้าวจากโคนใบแรกที่งอกถึงปลายใบที่สอง (หน่วยเป็น มม.) ของทุกเมล็ดในแต่ละจานเพาะเลี้ยง ตัดค่าความยาวดังกล่าวซึ่งเป็นค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดในแต่ละจานเพาะเลี้ยงออกอย่างละ 1 ค่า ดังนั้นจะ

เหลือค่าการเจริญ 10 ค่าต่อจานเพาะเลี้ยง หรือ 40 ค่าต่อหนึ่งตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ หาค่าเฉลี่ยของค่าการเจริญของเมล็ดข้าวดังกล่าว (หน่วยเป็น มม.) แล้วแปรเป็นค่า log ก่อนนำข้อมูลไปใช้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 การวางจานเพาะเลี้ยงในกล่องที่มีความชื้นอิ่มตัว
(หนึ่งกล่องเพาะต่อหนึ่งตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์)

รูปที่ 4 การบ่มเลี้ยงกล่องเพาะในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

2.4.1.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลินโดยวิธีทางเคมี (chemical assay)

2.4.1.2.1 โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

ละลายสารตัวอย่างด้วยเมทานอล (methanol) จุด (spot) สารละลายตัวอย่างด้วยไมโครปิเปต (micropipette) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1 มม. ลงบนแผ่นซิลิกา ทิ้งไว้ให้จุดแห้งที่อุณหภูมิห้องหรือเป่าด้วยลมเย็น นำไปวางในแนวตั้งในถังตัวทำละลาย (solvent tank) ที่ปิดสนิท ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นตามแผ่นซิลิกา ผ่านจุดสารตัวอย่างในแนวตั้งฉากจากล่างขึ้นบน (ascending) จนแนวของตัวทำละลาย (solvent front) เคลื่อนขึ้นจนเกือบถึงด้านบนสุดของแผ่นซิลิกา นำแผ่นซิลิกาดังกล่าวออกจากถังตัวทำละลาย พ่นด้วยสารละลาย 5% ของกรดกำมะถันเข้มข้นในเอทานอล (ethanol) นำแผ่นซิลิกาไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 110 °ซ เป็นเวลา 5-10 นาที หาค่า R_f ของสารตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบกับค่า R_f ของสารมาตรฐาน

2.4.1.2.2 โดยวิธีไฮเพอฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

สภาวะในการตรวจสอบด้วยเครื่อง Shimadzu LC-3A ปรับปรุงจากวิธีของ E.Jensen,et al.(21)

column : Zorbax-C_8 ขนาด 25 ซม. x 4.6 มม.
mobile phase: 57% เมทานอล + 43% กรดฟอสฟอริก (พีเอช 3.0)
flowrate : 1 มล.ต่อนาที
pressure : 120-180 กิโลกรัมต่อตาราง ซม.
temperature : อุณหภูมิห้อง
detector : ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร
chart speed : 2 ซม.ต่อนาที
Attenuation : 2^3 มิลลิโวลต์ต่อเต็มสเกล (mV/full scale)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.1.2.2.1 <u>การหาวิธีการสกัดจิบเบอเรลลินที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC</u>

ตัวอย่างที่ใช้ในการหาวิธีการสกัดคือสารมาตรฐานGA$_3$ GA$_4$ และ GA$_7$ ที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวสูตร 1.4.2 (ภาคผนวกที่ 1.4) ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 2 ไมโครกรัมต่อมล. ปริมาตร 2 มล.สกัดตามวิธีในภาคผนวกที่ 3.1 และ 3.2 จากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง LC-3A เปรียบเทียบปริมาณจิบเบอเรลลินกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาประสิทธิภาพของการสกัด (recovery yield)

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารมาตรฐาน GA$_3$ GA$_4$ และ GA$_7$ ที่ละลายในเมทานอลความเข้มข้น 1-5 ไมโครกรัมต่อมล. ปริมาตร 2 มล. เติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เพื่อกำจัดน้ำ นำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 70-80 °ซ เติมmobile phase 0.5 มล. ฉีดสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง LC-3A เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับปริมาณจิบเบอเรลลิน

2.4.1.2.2.2 <u>การหาชนิดของสารมาตรฐานเปรียบเทียบ (internal standard) ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC</u>

สารมาตรฐานเปรียบเทียบ (internal standard) ที่ใช้ศึกษา เพื่อหาชนิดที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC. คือ 5 แอลฟา-โคเลสเทน (5α-cholestane) เมทธิลพาราเบน (methylparaben) และโปรพิลพาราเบน (propylparaben) ที่ละลายในเมทานอลความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมล. ปริมาตร 10 มล. เติมลงในสารมาตรฐาน GA$_3$ GA$_4$ และ GA$_7$ ที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวสูตร 1.4.2 (ภาคผนวกที่ 1.4) ให้มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 5 ไมโครกรัมต่อมล. ปริมาตร 2 มล. และสกัดตามวิธีในภาคผนวกที่ 3.1 จากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง LC-3A ศึกษาลักษณะของโครมาโตแกรม(chromatogram) ที่เกิดขึ้น

2.4.2 การตรวจวัดการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi

นำตัวอย่างจากวิธีข้อ 2.3.4 มากรองผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก เพื่อแยกสายใยออกจากส่วนน้ำใส ล้างสายใยด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °ซ อบจนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักของสายใยแห้ง

กำหนดค่าการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi เป็นกรัมสายใยแห้งต่อลิตรอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย

2.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

โดยวิธีการของ Bernfeld (22) ดังนี้ เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (ภาคผนวกที่ 2.2) 1 มล. ลงในตัวอย่าง (ส่วนน้ำใสจากการกรองด้วยกระดาษกรอง จากวิธีข้อ 2.4.2) 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่น 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.2-2.0 มก.ต่อมล. ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสง

2.4.4 การวัดค่าความเป็นกรดด่าง

โดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)