บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญสปอร์อิสระของ Cunninghamella blakesleeana ST-22 เป็นสายใยเพื่อแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC

3.1.1 ระยะเวลาของการเจริญสปอร์ของ C.blakesleeana ST-22 และประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC

เมื่อเพาะเลี้ยง C.blakesleeana ST-22 ในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย (วิธีข้อ 2.3.2) พีเอช 7.0 ในขวดรูปชมพู่ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นำสายใยมาแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ (วิธีข้อ 2.7) และน้ำหนักสายใยแห้ง (วิธีข้อ 2.8) ในช่วงเวลาการเจริญต่างๆกัน ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่า C.blakesleeana ST-22 จะมีการเจริญสูงสุดหลังจากเพาะเลี้ยงไปแล้วนานกว่า 50 ชั่วโมง ในขณะที่สามารถแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ได้สูงสุด (1.7 ไมโครโมลต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมง) โดยใช้เวลาของการเจริญเพียง 16-20 ชั่วโมงเท่านั้น [ระยะต้นของการเจริญแบบทวีคูณ(early log phase)] ผลการวิเคราะห์ระดับของ LCA จะเห็นว่ามีความเข้มข้นลดลงสอดคล้องกับการเพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์คือ กรด 3α,15β-DHC แต่เมื่อปริมาณผลิตภัณฑ์เพิ่มสูงสุดแล้วจะลดลงอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งมีค่าคงที่หลังจากเจริญไปได้ 36 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นของ LCA ที่เหลือในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใยก็จะมีค่าคงที่ ในช่วงนี้การเจริญของสายใย C.blakesleeana ST-22 ก็จะเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่(stationary phase)ด้วย

3.1.2 ผลกระทบของกรดลิโทโคลิกต่อการเจริญของ C.blakesleeana ST-22 และประสิทธิภาพของสายใยในการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC

เมื่อทำการเลี้ยงสปอร์ของเชื้อ C.blakesleeana ST-22 ในสูตรอาหารเหลว

รูปที่ 6 รูปแบบการเจริญ ประสิทธิภาพของสายใยในการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC และการใช้กรดลิโทโคลิก ของ C.blakesleeana ST-22 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารสำหรับการงอกเป็นสายใย(วิธีข้อ 2.3.2) ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญและปริมาณผลิตภัณฑ์ตามวิธีข้อ 2.8 และ 2.7

△ ค่าการเจริญ
○ กรด 3∝ ; 15β -DHC
□ LCA
LCA ในอาหารเหลว (x10² ไมโครโมล/ลิตร)
กรด 3∝,15β-DHC (ไมโครโมล/กรัมสายใยเปียก.ชั่วโมง)
การเจริญ (กรัมสายใยแห้ง/ลิตร)
เวลา (ชั่วโมง)
0
4
8
12
16
20
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
0
2
4
6
8
10
0
10
20
30
40
50
60
70

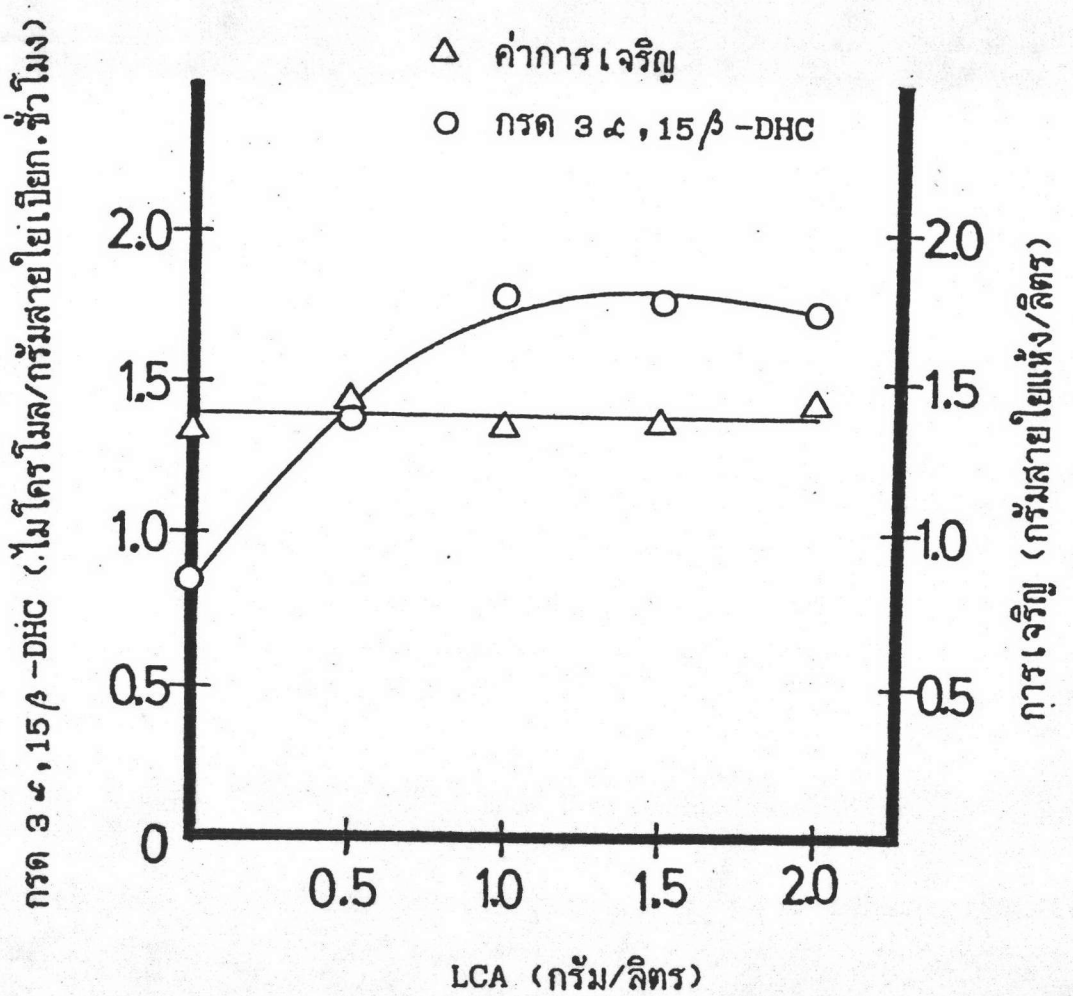
สำหรับการงอกเป็นสายใย (วิธีข้อ 2.3.2) พีเอช 7.0 เมื่อมีและไม่มี LCA ในสภาวะที่กำหนดให้ ณ อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำสายใยมาแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ในสารผสมปฏิกิริยา (วิธีข้อ 2.7.1 และ 2.7.2) นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ (วิธีข้อ 2.7.3) และน้ำหนักสายใยแห้ง (วิธีข้อ 2.8) ดังผลการทดลองในรูปที่ 7 แสดงให้เห็นว่า สายใยที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่มี LCA เพิ่มสูงขึ้น จะมีประสิทธิภาพในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ดีขึ้น และที่ความเข้มข้นของ LCA ในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใยตั้งแต่ 1 กรัมต่อลิตร ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมากเป็น 2 เท่าของเมื่อไม่มี LCA อยู่ในอาหารเหลว (เพิ่มจากประมาณ 0.85 เป็น 1.75 ไมโครโมลต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมง) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ LCA ไปกว่านี้ จะไม่มีผลกระทบต่อการเพิ่มผลผลิตของกรด 3α,15β-DHC แต่อย่างใด ในขณะที่ C.blakesleeana ST-22 มีค่าการเจริญใกล้เคียงกันทั้งเมื่อมีและไม่มี LCA ในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย (ประมาณ 1.4 กรัมสายใยแห้งต่อลิตร)

3.1.3 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญของ C.blakesleeana ST-22 และประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC

เพาะเลี้ยง C.blakesleeana ST-22 ในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย(วิธีข้อ 2.3.2) พีเอช 7.0 ในขวดรูปชมพู่ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 45 °ซ นำสายใยมาแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ (วิธีข้อ 2.7) และน้ำหนักสายใยแห้ง (วิธีข้อ 2.8) พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 °ซ C.blakesleeana ST-22 จะมีค่าการเจริญดีที่สุดคือ 1.35 กรัมสายใยแห้งต่อลิตร และได้สายใยที่มีประสิทธิภาพในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ได้สูงสุดคือ 1.72 ไมโครโมลต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมง ซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซนต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ (Relative activity) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงขึ้นไปถึง 45 °ซ จะไม่พบการเจริญของเชื้อ C.blakesleeana ST-22 เลย ดังแสดงในรูปที่ 8

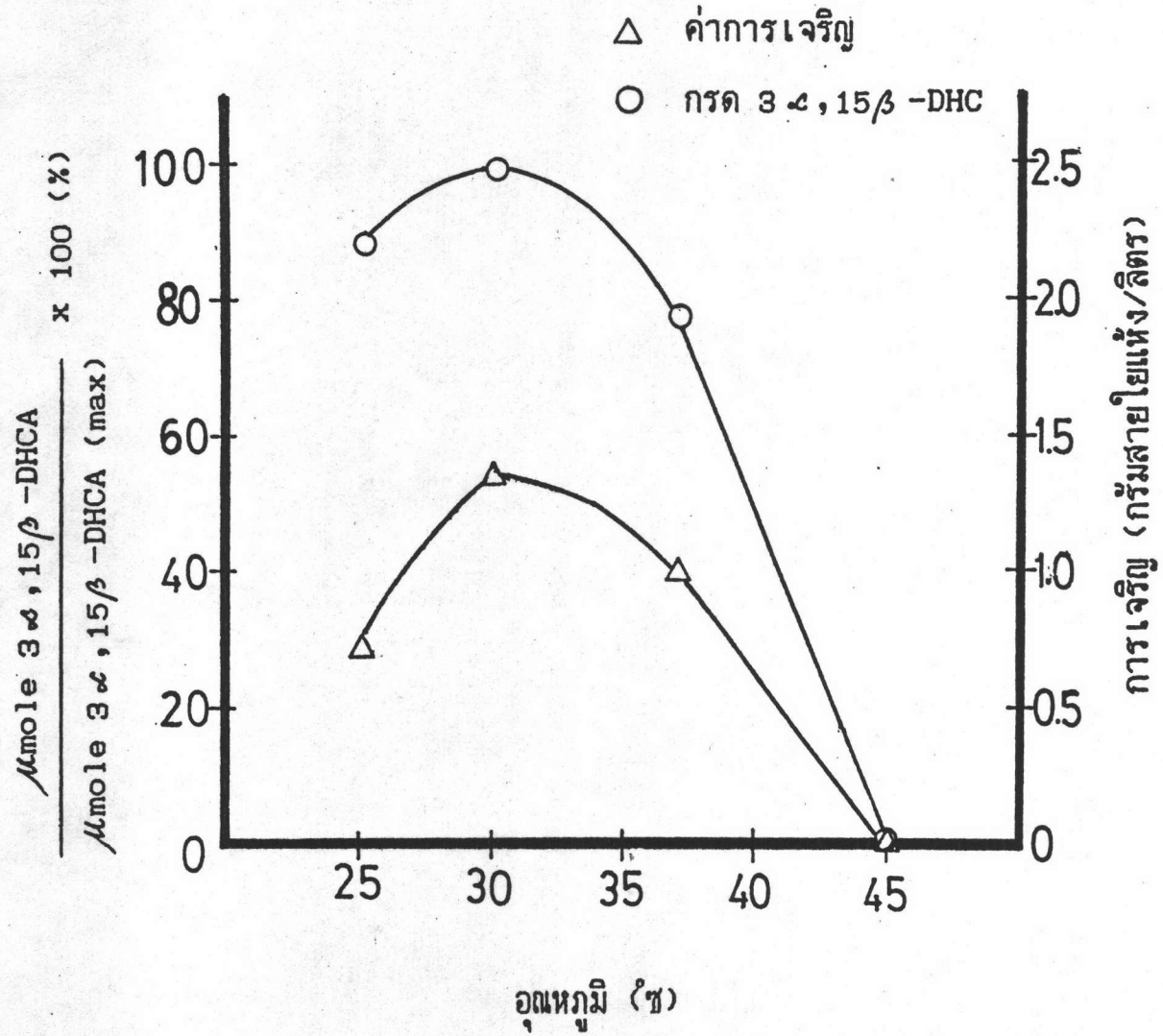
3.1.4 ผลกระทบของ พีเอช ต่อการเจริญและการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของ C.blakesleeana ST-22

เพาะเลี้ยง C.blakesleeana ST-22 ในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็น



รูปที่ 7 ปริมาณกรด 3∝,15β-DHC ที่ได้จาก การแปรรูปกรดลิโทโคลิก โดยสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย (วิธีข้อ 2.3.2) ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อแปรผันความเข้มข้นของกรดลิโทโคลิกแตกต่างกันตั้งแต่ 0.5 ถึง 2.0 กรัมต่อลิตรของอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย ทำการวิเคราะห์การเจริญตามวิธีข้อ 2.8 และปริมาณผลิตภัณฑ์ตามวิธีข้อ 2.7

รูปที่ 8 การเจริญของ C.blakesleeana ST-22 และปริมาณกรด 3-α,15β-DHC ที่ได้จากการแปรรูปกรดลิโทโคลิกโดยสายใยอิสระ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใยที่ พีเอช 7.0 (วิธีข้อ 2.3.2) เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน วัดการเจริญและปริมาณผลิตภัณฑ์ตามวิธีข้อ 2.8 และ 2.7 ตามลำดับ


△ ค่าการเจริญ
○ กรด 3α,15β -DHC
μmole 3α,15β -DHCA / μmole 3α,15β -DHCA (max) x 100 (%)
การเจริญ (กรัมสายใยแห้ง/ลิตร)
100
80
60
40
20
0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
25
30
35
40
45
อุณหภูมิ (°ซ)

สายใย (วิธีข้อ 2.3.2) พีเอช 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 ในขวดรูปชมพู่ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 °ซ แล้วนำสายใยที่ได้ไปทำการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC (วิธีข้อ 2.7.2) นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณกรด 3α,15β-DHC (วิธีข้อ 2.7.3) และน้ำหนักสายใยแห้ง (วิธีข้อ 2.8) ผลการทดลองรูปที่ 9 จะเห็นว่า ผลกระทบของพีเอชต่อการเจริญและการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของ C.blakesleeana ST-22 ไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อแปรเปลี่ยนค่า พีเอช ของอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใยจาก 6.0 ถึง 7.5 โดยที่ พีเอช 6.5 จะให้ปริมาณสายใย 1.4 กรัมสายใยแห้งต่อลิตร และสายใยที่ได้สามารถแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ได้สูงสุด ประมาณ 1.74 ไมโครโมลต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมง ซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซนต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ (Relative activity)

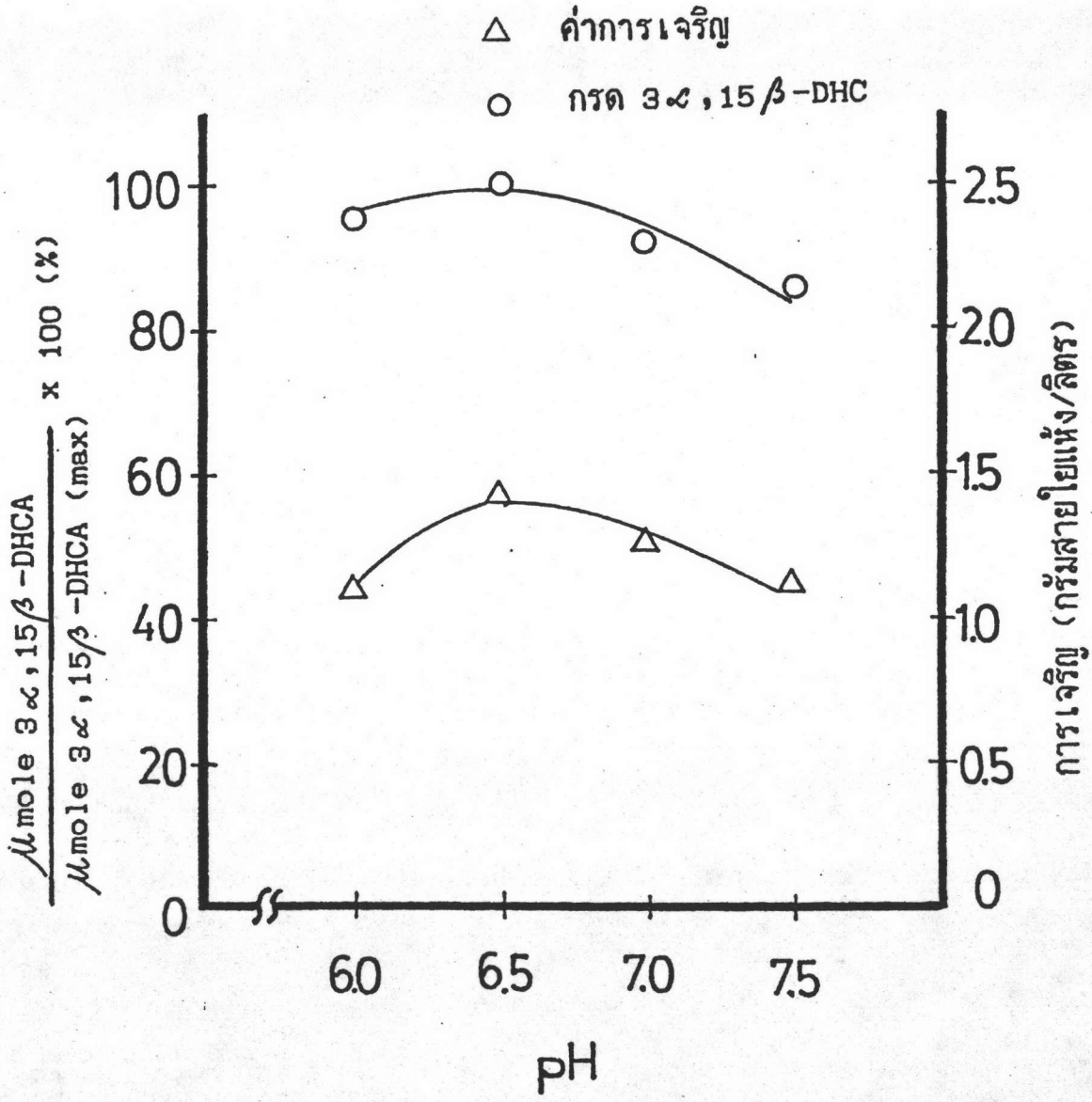
3.2 ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22

ทำการเพาะเลี้ยง C.blakesleeana ST-22 ในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย พีเอช 6.5 (วิธีข้อ 2.3.2) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 °ซ หลังจากนั้นนำสายใยที่ได้ไปเปรียบเทียบความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ในสารผสมปฏิกิริยาโดยใช้ความเข้มข้นของ LCA 1 กรัมต่อลิตร (วิธีข้อ 2.7.2) ที่ช่วงเวลาต่างๆกัน พบว่าการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของ C.blakesleeana ST-22 จะเพิ่มขึ้นโดยแปรผันเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเวลาของการทำปฏิกิริยา ในช่วงเวลานานถึง 27 ชั่วโมง (รูปที่ 10) ขณะเดียวกันปริมาณ LCA ที่เหลืออยู่ในสารผสมปฏิกิริยาจะลดลงโดยแปรผันเป็นสัดส่วนโดยตรงตามเวลาของการทำปฏิกิริยาเช่นกัน

3.3 สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนโดยวิธีหยดจากเข็มฉีดยา

3.3.1 ผลกระทบของความเร็วแท่งแม่เหล็กและระยะทางระหว่างปลายเข็มฉีดยาถึงสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ต่อขนาดและรูปร่างลักษณะของเม็ดเจล

เมื่อใช้สารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนัก



รูปที่ 9 การเจริญของ C.blakesleeana ST-22 ในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย พีเอชต่างๆกัน(วิธีข้อ 2.3.2)ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีนาน 18 ชั่วโมง และปริมาณกรด 3∝,15β-DHC ที่ได้จากการแปรรูปกรดลิโทโคลิกโดยสายใยอิสระ วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์และค่าการเจริญ ดังวิธีทดลองข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ

รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณกรด 3α,15β-DHC ที่ได้จากการแปรรูปกรดลิโทโคลิกโดยสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 และปริมาณกรดลิโทโคลิกที่เหลือในสารผสมปฏิกิริยาที่มีกรดลิโทโคลิก ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร(วิธีข้อ 2.7.1) วัดปริมาณผลิตภัณฑ์และกรดลิโทโคลิกตามวิธีข้อ 2.7.3

กรด 3 ∝ ,15/β -DHC
LCA
กรด 3 ∝ ,15/β -DHC (ไมโครโมล/กรัมสายใยเปียก)
LCA ในสารผสมปฏิกิริยา (×10² ไมโครโมล/ลิตร)
เวลา (ชั่วโมง)
0
10
20
30
40
50
0
4
8
12
16
20
24
5
10
15
20
25
30

ต่อปริมาตร) สำหรับแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako ประเทศญี่ปุ่น (แคปปา-คาร์ราจีแนนมากกว่า 90 เปอร์เซนต์) บริษัท Sigma สหรัฐอเมริกา (แคปปา-คาร์ราจีแนน 80 เปอร์เซนต์ และแลมดา-คาร์ราจีแนน 20 เปอร์เซนต์) และบริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก (แคปปา-คาร์ราจีแนนมากกว่า 90 เปอร์เซนต์) ทำการตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ความเข้มข้น 1.25×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีข้อ 2.5.2.1 โดยหยดสปอร์ผสมคาร์ราจีแนนให้ระยะห่างระหว่างปลายเข็มฉีดยาถึงสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์เท่ากับ 8 เซนติเมตร และแปรเปลี่ยนความเร็วของแท่งแม่เหล็กที่ใช้กวนสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ เท่ากับ 90, 120 และ 150 รอบต่อนาที (เมื่อใช้เครื่องกวนแท่งแม่เหล็กจาก Laboratory Hot Plate PC-101, Corning Glass Works, Corning, N.Y.14830, U.S.A. หมายเลข 0.5, 1.0 และ 1.5 ตามลำดับ) หลังจากที่ได้เม็ดเจลสปอร์ตรึงแล้วสังเกตรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลที่ได้ แล้วนำไปวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเจล พบว่า ความเร็วแท่งแม่เหล็กในการกวนเท่ากับ 120 รอบต่อนาที จะให้เม็ดเจลที่มีลักษณะสัณฐานค่อนข้างกลมมากที่สุด และมีเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเจลทั้งหมดที่ได้อยู่ในช่วงเล็กกว่า และเท่ากับ 4 มิลลิเมตรมากที่สุด เป็นปริมาณ 85, 81 และ 87 เปอร์เซนต์ สำหรับเม็ดเจลจากแคปปา-คาร์ราจีแนนบริษัท Wako, Sigma และ Copenhagen Pectin ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และเมื่อใช้ความเร็วในการกวนเพิ่มขึ้น เม็ดเจลที่ได้จะมีรูปร่างลักษณะไม่แน่นอนมากขึ้น

เมื่อใช้ความเร็วแท่งแม่เหล็กในการกวนเท่ากับ 120 รอบต่อนาที และแปรเปลี่ยนระยะห่างระหว่างปลายเข็มฉีดยาถึงสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์เท่ากับ 6 และ 8 เซนติเมตร พบว่าเมื่อใช้ระยะห่างเท่ากับ 6 เซนติเมตร เม็ดเจลที่ได้จากบริษัท Wako, Sigma และ Copenhagen Pectin มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าและเท่ากับ 4 มิลลิเมตร ปริมาณ 88, 85 และ 90 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และได้เม็ดเจลที่มีลักษณะสัณฐานค่อนข้างกลม ซึ่งมากกว่าเมื่อใช้ระยะห่างเป็น 8 เซนติเมตร (ตารางที่ 4)

ดังนั้นจะเห็นว่า เมื่อใช้ความเร็วแท่งแม่เหล็กในการกวนสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์เท่ากับ 120 รอบต่อนาที และระยะห่างระหว่างปลายเข็มฉีดยาถึงสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์เท่ากับ 6 เซนติเมตร จะให้เม็ดเจลสปอร์ตรึงที่มีลักษณะสัณฐานค่อนข้างกลมมากที่สุด ดังรูปที่ 11 โดยปกติความเร็วของการหยดสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน 10 มิลลิลิตร จะควบคุมโดยหยดจากเข็มฉีดยาภายในระยะเวลาประมาณ 5 นาที

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กกับรูปร่างและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเจล เมื่อตริงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ด้วย 2.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) แคปปา-คาร์ราจีแนนต่างชนิดกัน โดยวิธีหยดจากเข็มฉีดยา (วิธีข้อ 2.5.2.1)

ชนิดของแคปปา-คาร์ราจีแนน	ความเร็วในการกวน* (รอบต่อนาที)	เม็ดเจล	
		เส้นผ่าศูนย์กลาง ≤ 4 มิลลิเมตร (%)	รูปร่าง
บริษัท Wako Pure Chemical Industries Ltd. ประเทศญี่ปุ่น	90	74	รี รูปหยดน้ำ
	120	85	รี รูปหยดน้ำ
	150	83	รี ไม่แน่นอน
บริษัท Sigma Chemicals Ltd. สหรัฐอเมริกา	90	68	รี แบน
	120	81	กลม แบน
	150	79	กลม แบน
บริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก	90	79	รี กลม แบน
	120	87	กลม แบน
	150	87	กลม แบน

* ใช้เครื่องกวนแท่งแม่เหล็กจาก Laboratory Hot Plate PC-101, Corning Glass Works, Corning, N.Y. 14830, U.S.A. และขนาดของแท่งแม่เหล็กยาว 4 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9 เซนติเมตร

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างจากปลายเข็มฉีดยาถึงสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์กับรูปร่างและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเจล เมื่อใช้ความเร็วของแท่งแม่เหล็กในการกวนเท่ากับ 120 รอบต่อนาที ตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ด้วย 2.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนนต่างชนิดกัน โดยวิธีหยดจากเข็มฉีดยา (วิธีข้อ 2.5.2.1)

ชนิดของแคปปา-คาร์ราจีแนน	ระยะห่างจากปลายเข็มฉีดยา* ถึงสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ (เซนติเมตร)	เม็ดเจล	
		เส้นผ่าศูนย์กลาง ≤ 4 มิลลิเมตร (%)	รูปร่าง
บริษัท Wako Pure Chemical Industries Ltd. ประเทศญี่ปุ่น	6	88	รีรูปหยดน้ำ
	8	85	รีรูปหยดน้ำใหญ่
บริษัท Sigma Chemicals Ltd. สหรัฐอเมริกา	6	85	กลม แบน
	8	81	รี แบน
บริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก	6	90	กลม แบน
	8	87	กลม แบน

* ใช้หลอดฉีดยาพลาสติกขนาดปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 21G x 1.5 (0.80x38 มิลลิเมตรต่อมิลลิเมตร)

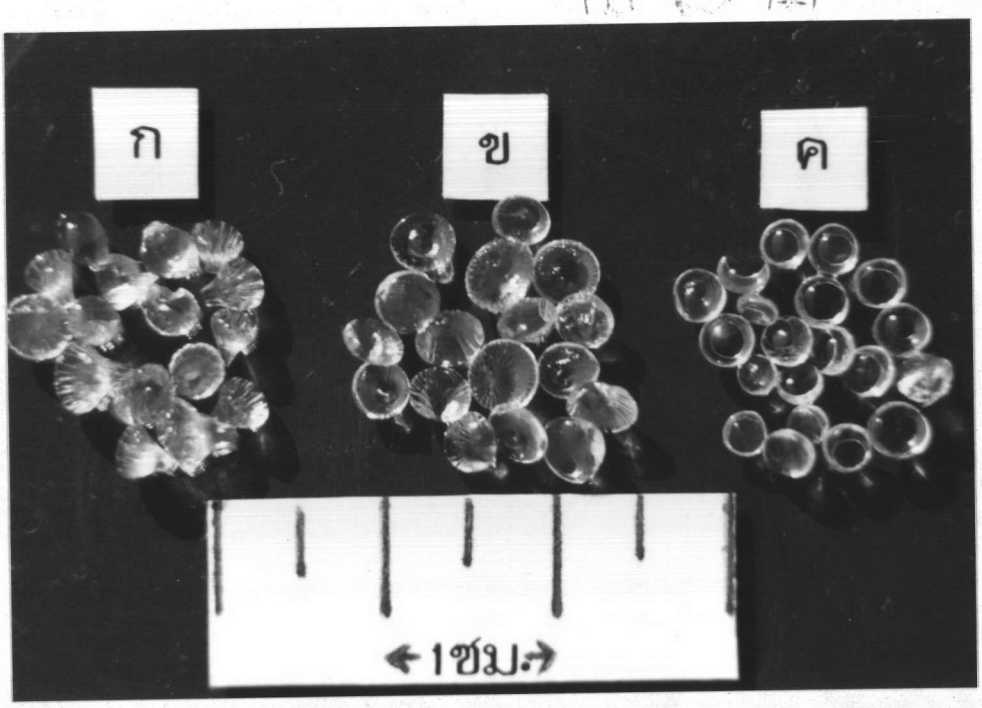
รูปที่ 11 ลักษณะของเม็ดเจลสปอร์ตรึง C.blakesleeana ST-22 ด้วย 2.0 เปอร์เซนต์แคปปา-คาร์ราจีแนน โดยวิธีหยดจากเข็มฉีดยา (วิธีข้อ 2.5.2.1) ใช้ความเร็วของการกวนแท่งแม่เหล็กประมาณ 120 รอบต่อนาที และระยะห่างระหว่างปลายเข็มฉีดยาถึงผิวของสารละลาย0.3โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์เท่ากับ 6 เซนติเมตร

ก. แคปปา-คาร์ราจีแนน จากบริษัท Wako ประเทศญี่ปุ่น

ข. แคปปา-คาร์ราจีแนน จากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

ค. แคปปา-คาร์ราจีแนน จากบริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ



3.3.2 ผลกระทบของความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนในการตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC และความแข็ง(strength)ของเม็ดเจล

เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนชนิดต่างๆ ดังนี้ บริษัท Wako 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) บริษัท Sigma 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) และบริษัท Copenhagen Pectin 1.0, 1.5, 1.8, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ความเข้มข้น 1.25×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยวิธีหยดจากเข็มฉีดยา(วิธีข้อ 2.5.2.1) นำเม็ดเจลสปอร์ตรึงที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย พีเอช 6.5(วิธีข้อ 2.4.3) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วให้แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง (วิธีข้อ 2.7.2) วิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ (วิธีข้อ 2.7.3) และความแข็งของเม็ดเจล (วิธีข้อ 2.6.1) พบว่า สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako จะมีความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ได้สูงที่สุด (ประมาณ 0.19 ไมโครโมลต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมง) เมื่อความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนเท่ากับ 2.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ในขณะที่สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Sigma และบริษัท Copenhagen Pectin มีการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์สูงสุดใกล้เคียงกันเพียงประมาณ 0.135 ไมโครโมลต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมง ที่ความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนนเป็น 2.0-2.5 และ 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ ในแง่ความแข็งของเม็ดเจล ผลการทดลองแสดงว่า เม็ดเจลสปอร์ตรึงที่ได้จากแคปปา-คาร์ราจีแนนทั้ง 3 ชนิดจะมีความแข็งของเม็ดเจลสูงขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนให้มากขึ้น และความแข็งของเม็ดเจลจะลดลงหลังการงอกเป็นสายใยเมื่อเทียบกับเม็ดเจลก่อนงอกสายใยที่ทุกความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามพบว่ามีเม็ดเจลบางส่วนไม่สามารถคงรูปอยู่ได้ (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Wako และ Sigma) เมื่อเพาะเลี้ยงไว้นาน 72 ชั่วโมง (รูปที่ 12)

รูปที่ 12 ผลของความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนนเมื่อนำมาตรึงสปอร์ของ C. blakesleeana ST-22 โดยวิธีหยดจากเข็มฉีดยา (วิธีข้อ 2.5.2.1) ต่อความแข็งของเม็ดเจลสปอร์ตรึงก่อนและหลังการงอกเป็นสายใย (วิธีข้อ 2.6.1) และการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล (วิธีข้อ 2.7)

ก. แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako ประเทศญี่ปุ่น

ข. แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

ค. แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก

รูปที่ 12 ก.

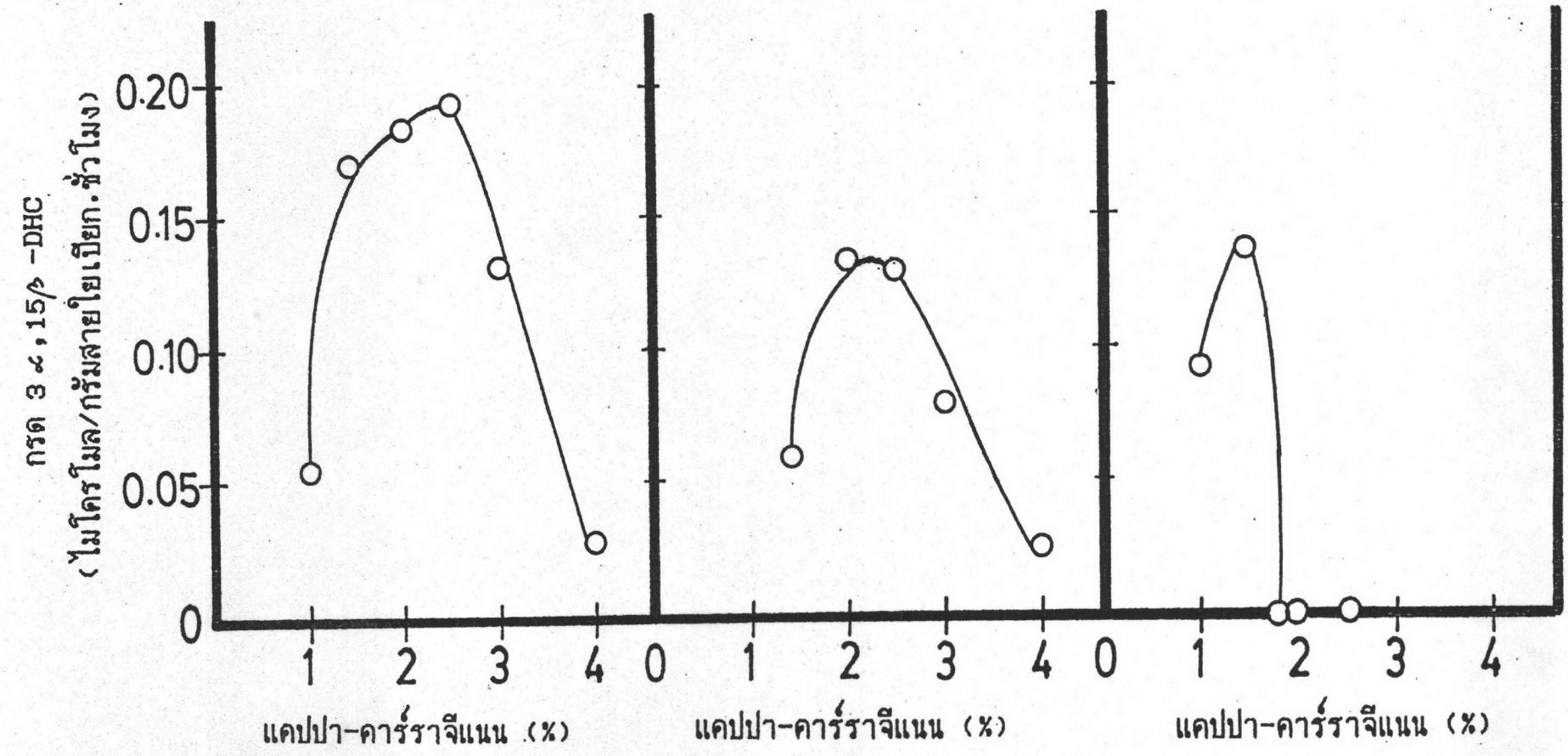
ความเข้มข้นคาร์ราจีแนน (%)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
ความแข็งของเม็ดเจล ก่อนงอกสายใย	+3	+4	+5	+6	+7	+8
ความแข็งของเม็ดเจล หลังงอกสายใย	+1	+2	+3	+3	+4	+5

รูปที่ 12 ข.

1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
+3	+4	+5	+6	+7
+1	+2	+3	+3	+4

รูปที่ 12 ค.

1.0	1.5	1.8	2.0	2.5
+5	+7	+8	+8	+9
+3	+4	+6	+7	+8



3.4 สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนโดยวิธี two phase system

3.4.1 ผลกระทบของความเร็วแท่งแม่เหล็กที่ใช้กวนสารผสมแคปปา-คาร์ราจีแนนกับสปอร์ต่อขนาดและรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

เมื่อใช้สารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน ความเข้มข้น 2.5, 3.0 และ 3.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Sigma และความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin ทำการตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ความเข้มข้น 1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (วิธีข้อ 2.5.2.2) โดยแปรเปลี่ยนความเร็วของแท่งแม่เหล็กที่ใช้กวนสารผสมแคปปา-คาร์ราจีแนนกับสปอร์เป็น 390, 420 และ 450 รอบต่อนาที (เมื่อใช้เครื่องกวนแท่งแม่เหล็กจาก Laboratory Hot Plate PC-101, Corning Glass Works, Corning, N.Y.14830, U.S.A. หมายเลข 5.5, 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ) ใช้แท่งแม่เหล็กยาว 4.0 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9 เซนติเมตร หลังจากที่ได้เม็ดเจลสปอร์ตรึงแล้วสังเกตรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลที่ได้ แล้วนำไปวัดขนาดของเม็ดเจลโดยทำการสุ่มเม็ดเจลขึ้นมา 100 เม็ดทำการแยกขนาดเม็ดเจลเป็น 3 กลุ่มคือ เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร ระหว่าง 1-2 มิลลิเมตร และมากกว่า 2 มิลลิเมตร โดยใช้ตะแกรงไนล่อน จากผลการทดลองตารางที่ 5 จะเห็นว่า ขนาดของเม็ดเจลแคปปา-คาร์ราจีแนนทั้ง 3 ชนิดจะมีแนวโน้มเล็กลง เมื่อใช้ความเร็วในการกวนสูงขึ้น เมื่อพิจารณารูปร่างลักษณะของเม็ดเจล พบว่าเม็ดเจลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 2 มิลลิเมตร จะมีลักษณะเป็นรูปรีมากขึ้น ในขณะที่เม็ดเจลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่าและเท่ากับ 2 มิลลิลิตรจะมีลักษณะเป็นทรงกลมหรือค่อนข้างกลม ดังแสดงไว้ในรูปที่ 13

การเลือกใช้ความเร็วที่เหมาะสมในการกวนสารละลายของแคปปา-คาร์ราจีแนนจะถือเอาความเร็วที่ทำให้ขนาดของเม็ดเจลอยู่ในช่วง 1-2 มิลลิเมตรเป็นหลัก ดังนั้น เมื่อใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako ความเข้มข้น 2.5, 3.0 และ 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะเลือกใช้ความเร็วในการกวนเป็น 420, 420 และ 450 รอบต่อนาที ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Sigma ความเข้มข้น 2.5, 3.0 และ 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะเลือกใช้ความเร็วในการกวน

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กกับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเจล เมื่อตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 โดยวิธี two phase system (วิธีข้อ 2.5.2.2) ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน ชนิดและความเข้มข้นต่างกัน

ชนิดของแคปปา-คาร์ราจีแนน	ความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนน (เปอร์เซนต์)	ความเร็วในการกวน (รอบต่อนาที)	ขนาดของเม็ดเจล (เปอร์เซนต์)		
			< 1 มิลลิเมตร	1 - 2 มิลลิเมตร	> 2 มิลลิเมตร
บริษัท Wako Pure Chemical Industries Ltd. ประเทศญี่ปุ่น	2.5	390	10	69	21
		420	17	72	11
		450	27	71	2
	3.0	390	5	70	25
		420	9	79	12
		450	18	75	7
	3.5	390	4	64	32
		420	9	72	19
		450	9	81	10
บริษัท Sigma Chemicals Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา	2.5	390	6	70	24
		420	10	75	15
		450	17	73	10

ชนิดของแคปปา-คาร์ราจีแนน	ความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนน (เปอร์เซนต์)	ความเร็วในการกวน (รอบต่อนาที)	ขนาดของเม็ดเจล (เปอร์เซนต์)		
			< 1 มิลลิเมตร	1 - 2 มิลลิเมตร	> 2 มิลลิเมตร
บริษัท Sigma Chemicals Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา	3.0	390	5	71	24
		420	6	78	16
		450	15	73	12
	3.5	390	4	68	28
		420	8	72	20
		450	14	79	7
บริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก	1.0	390	8	67	25
		420	10	75	15
		450	17	72	11
	1.5	390	5	60	35
		420	8	69	23
		450	11	78	11
	2.0	390	2	59	39
		420	7	65	28
		450	10	72	18

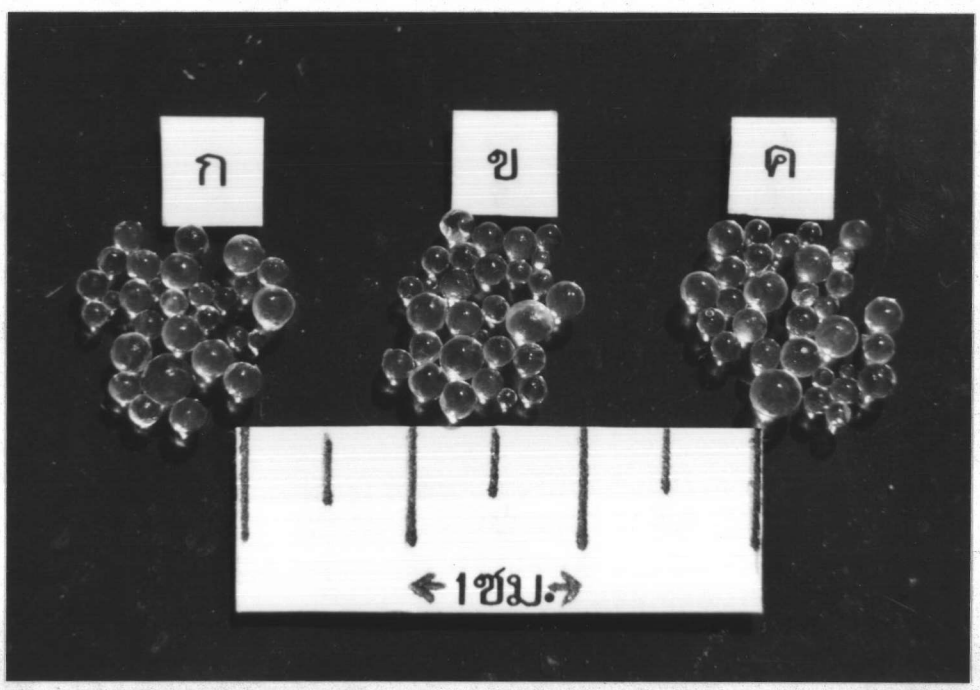
รูปที่ 13 ลักษณะของเม็ดเจลสปอร์ตรึง C.blakesleeana ST-22 ด้วย 2.0 เปอร์เซนต์แคปปา-คาร์ราจีแนน โดยวิธี two phase system (วิธีข้อ 2.5.2.2)

ก. 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร)แคปปา-คาร์ราจีแนน จากบริษัท Wako ประเทศญี่ปุ่น

ข. 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร)แคปปา-คาร์ราจีแนน จากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

ค. 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร)แคปปา-คาร์ราจีแนน จากบริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ



420, 420 และ 450 รอบต่อนาที ตามลำดับ ส่วนแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin ความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) จะเลือกใช้ความเร็วในการกวนเป็น 420, 450 และ 450 รอบต่อนาที ตามลำดับ

ลักษณะของเม็ดเจลสปอร์ตริง C.blakesleeana ST-22 ก่อนและหลังการงอกเป็นสายใย แสดงในรูปที่ 14

3.4.2 ผลกระทบของนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต ต่อการตริงสปอร์ของ C.blakesleeana ST-22 แบบ two phase system

เนื่องจากนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต ที่ใช้เป็นสารร่วมในการตริงสปอร์ตามวิธีข้อ 2.5.2.2 มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ จึงจำเป็นต้องศึกษาผลกระทบของนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตตบางประการ ดังนี้

3.4.2.1 ผลกระทบของนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตตต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,5β-DHC โดยสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22

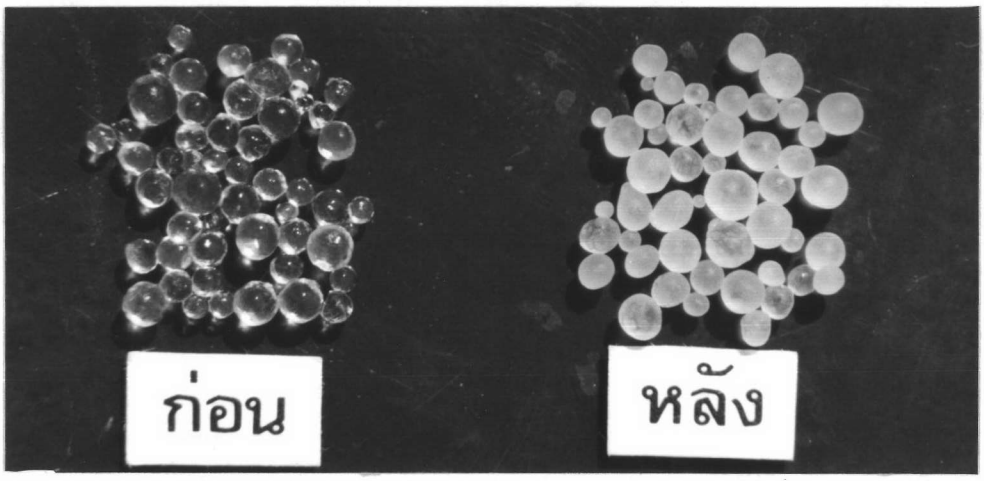
ผสมสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ความเข้มข้น 1.25×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร กับนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต 2 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 1, 2, 3, 5 และ 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกเอาส่วนของนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตตออก ล้างส่วนสปอร์ด้วย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร 3 ครั้ง นำสปอร์ที่ล้างแล้วไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง (วิธีข้อ 2.4.3) แล้วนำสายใยที่ได้มาแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ใช้เวลานาน 24 ชั่วโมง (วิธีข้อ 2.7) พบว่า นอร์มอล-บิวทิลอะซีเตตไม่มีผลกระทบต่อการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ในช่วง 1-2 นาทีแรกที่สัมผัสกับสปอร์อิสระ แต่หลังจากนั้นจะมีผลยับยั้งการแปรรูปบ้างเล็กน้อย สายใยที่ได้สามารถแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ได้ประมาณ 93 เปอร์เซนต์ (Relative activity) ซึ่งการตริงสปอร์ตามวิธีข้อ 2.5.2.2 นี้ เวลาที่นอร์มอล-บิวทิลอะซีเตตสัมผัสกับสปอร์จะนานไม่เกิน 2 นาที ดังนั้นจึงถือได้ว่า การตริงสปอร์โดยวิธี two phase system จะไม่ได้รับผลกระทบจากนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต ดังแสดงในรูปที่ 15

รูปที่ 14 ลักษณะของเม็ดเจลสปอร์ตริง C.blakesleeana ST-22 โดยวิธี two phase system (วิธีข้อ 2.5.2.2) ก่อนงอกเป็นสายใย และงอกเป็นสายใยแล้ว ของสปอร์ตริงในแคปปา-คาร์ราจีแนนชนิดต่างๆ

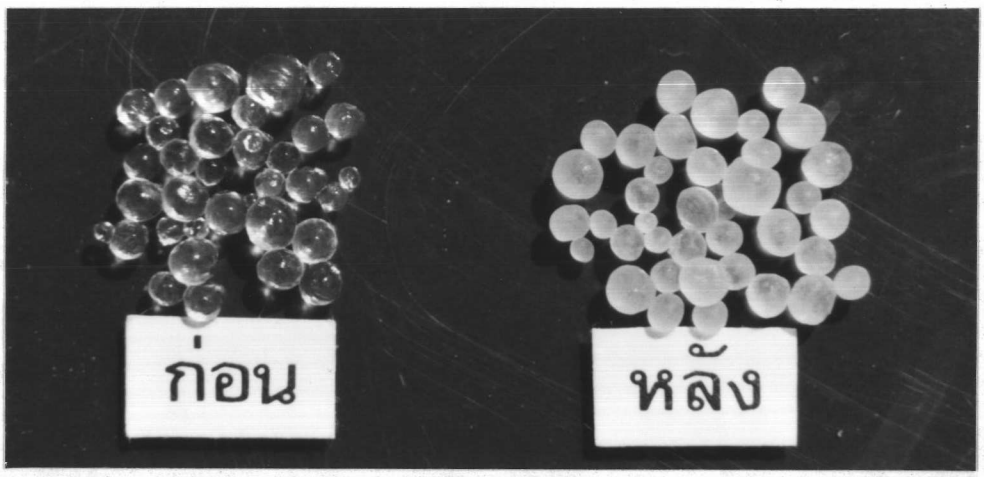
ก. 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร)แคปปา-คาร์ราจีแนน จากบริษัท Wako ประเทศญี่ปุ่น

ข. 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร)แคปปา-คาร์ราจีแนน จากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

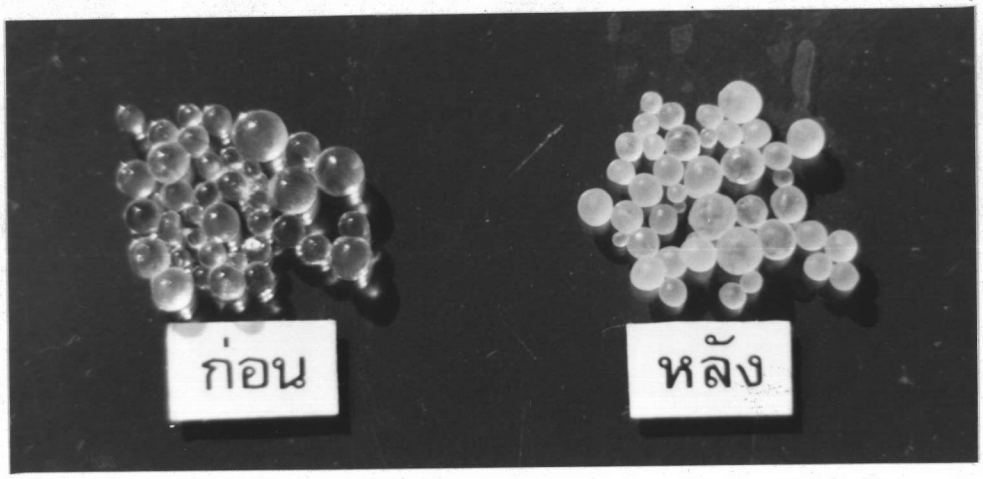
ค. 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร)แคปปา-คาร์ราจีแนน จากบริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก



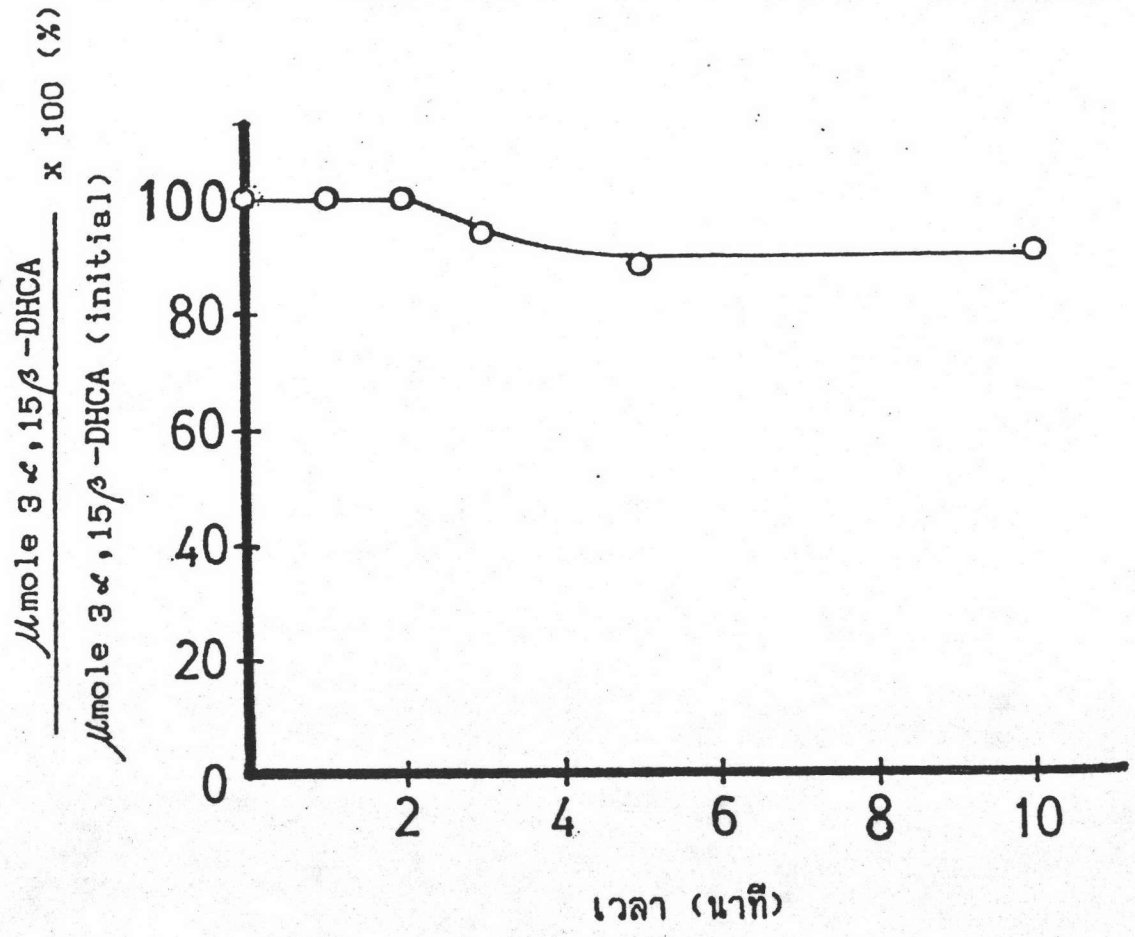
รูปที่ 14 ก



รูปที่ 14 ข



รูปที่ 14 ค



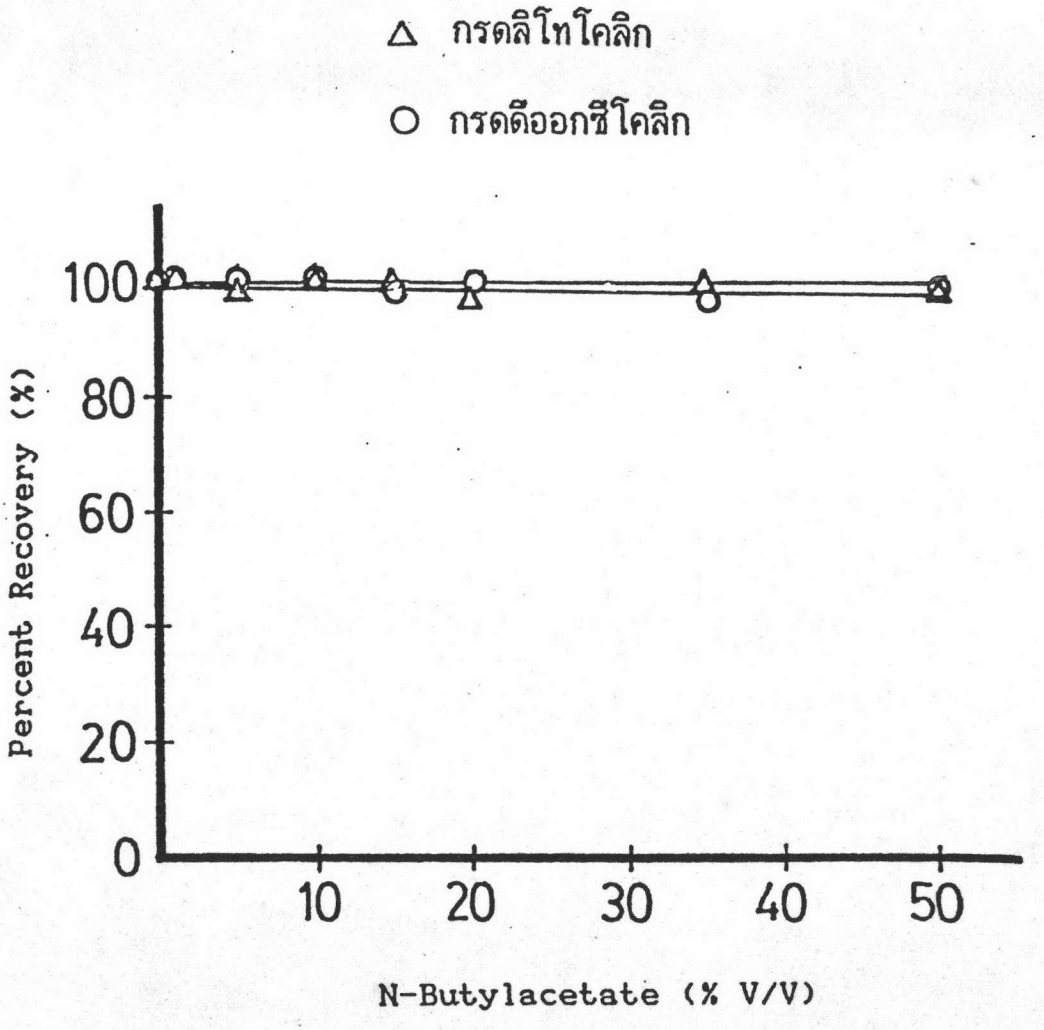
รูปที่ 15 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิก เป็นกรด 3∝,15β-DHC ของสายใยอิสระ ที่สปอร์ C.blakesleeana ST-22 สัมผัสกับนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต ในช่วงเวลาต่างๆกัน ดังรายละเอียดในข้อ 3.4.2.1

3.4.2.2 ผลกระทบของนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต ต่อวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดลิโทโคลิก และกรดดีออกซีโคลิก ในปฏิกิริยาการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC ด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี

เติมนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตตความเข้มข้น 1, 5, 10, 15, 20, 35 และ 50 เปอร์เซนต์(ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในสารผสมปฏิกิริยาที่เตรียมได้ในข้อ 2.7.1 0.5 มิลลิลิตร ทำให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 1 มิลลิลิตร โดยเติม 0.1 โมลาร์ ทริส-กรดไฮโดรคลอริก พีเอช 8.4 แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณ LCA และ DCA (วิธีข้อ 2.7.3) จากผลการทดลองรูปที่ 16 พบว่า เปอร์เซนต์ recovery ของ LCA และ DCA ที่วัดได้มีค่าอยู่ในช่วง 96 ถึง 100 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต ตั้งแต่ 1-50 เปอร์เซนต์(ปริมาตรต่อปริมาตร) เมื่อคำนึงถึงปริมาณนอร์มอล-บิวทิวอะซีเตตที่เหลืออยู่ในวิธีการตรึงสปอร์แบบ two phase system หลังจากล้างเม็ดเจลด้วย 0.3 โมลาร์ โพแตสเซียมคลอไรด์ถึง 3 ครั้ง น่าจะมีค่าน้อยกว่าความเข้มข้นสูงสุด (50 เปอร์เซนต์ ปริมาตรต่อปริมาตร) ของนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตตที่ใช้ในการทดลองนี้มาก

3.4.3 ผลกระทบของความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนนที่ใช้ตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ต่อความแข็ง และการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล

เตรียมสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน (วิธีข้อ 2.5.1) ให้มีความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนแต่ละชนิดดังนี้ แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และจากบริษัท Sigma 2.5, 3.0 และ 3.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) และแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin ความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) นำมาตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ความเข้มข้น 1.25×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร (วิธีข้อ 2.5.2.2) เม็ดเจลสปอร์ตรึงที่ได้นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (วิธีข้อ 2.4.3) แล้วนำมาแปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง (วิธีข้อ 2.7.2) วิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ (วิธีข้อ 2.7.3) และวัดความแข็งของเม็ดเจลสปอร์ตรึง (วิธีข้อ 2.6.1) จากผลการทดลองรูปที่ 17 พบว่าเม็ดเจลที่ได้หลังจากงอกเป็นสายใยแล้ว 72 ชั่วโมง มีความแข็งน้อยกว่าเม็ดเจลก่อนที่จะนำมางอกเป็นสายใย และยังพบเม็ดเจลบางส่วนแตกหลังจากงอกเป็นสายใยไปแล้วนาน 72



รูปที่ 16 ปริมาณกรดลิโทโคลิกและกรดดีออกซีโคลิก ที่วิเคราะห์ได้ในสารผสมปฏิกิริยา(วิธีข้อ 2.7) เมื่อมีนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตตความเข้มข้นแตกต่างกัน ตั้งแต่ 0-50 เปอร์เซนต์ ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี ดังรายละเอียดในผลการทดลองข้อ 2.4.2.2

รูปที่ 17 ประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยจากสปอร์ตรึงตามวิธีข้อ 2.5.2(วิธีข้อ 2.7) และความแข็งของเม็ดเจลก่อนและหลังการงอกสายใย(วิธีข้อ 2.6.1) เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนแต่ละชนิดที่ใช้เป็นสารตรึงสปอร์ (1.5-3.5 เปอร์เซนต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยวิธี two phase system (วิธีข้อ 2.5.2.2)

ก. แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako ประเทศญี่ปุ่น

ข. แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

ค. แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก

รูปที่ 17 ก

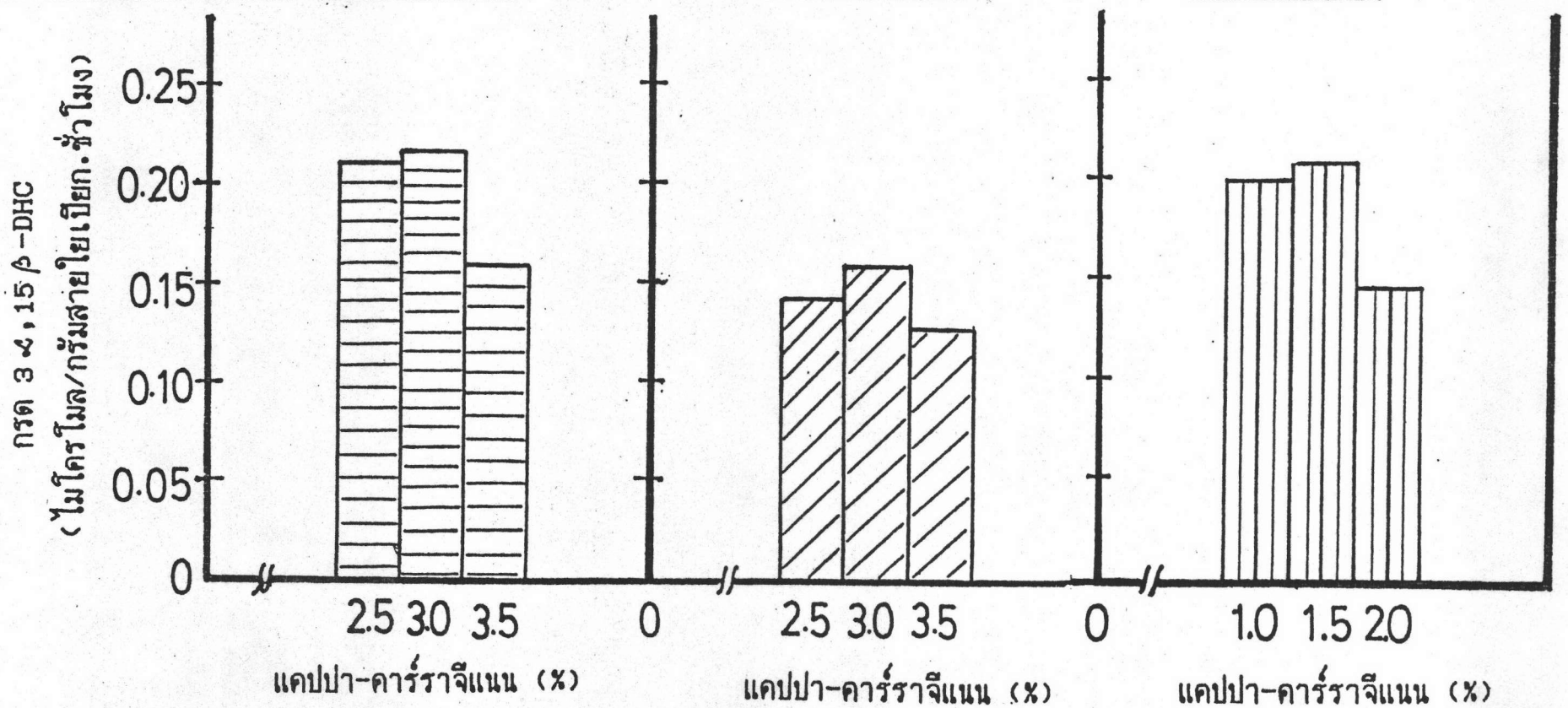
ความเข้มข้นคาร์ราจีแนน (%)	2.5	3.0	3.5
ความแข็งของเม็ดเจล ก่อนงอกสายใย	+6	+7	+8
ความแข็งของเม็ดเจล หลังงอกสายใย	+3	+4	+5

รูปที่ 17 ข

2.5	3.0	3.5
+5	+6	+7
+3	+3	+4

รูปที่ 17 ค

1.0	1.5	2.0
+5	+7	+8
+3	+4	+7



ชั่วโมง ทุกชนิดและทุกความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนน นอกจากแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อพิจารณาการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ พบว่าสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako และ Sigma สามารถแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนเท่ากันคือ 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) (0.21 และ 0.16 ไมโครโมลของกรด 3α,15β-DHC ต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมง ตามลำดับ) ในขณะที่สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Copenhagen Pectin จะให้ค่าของผลิตภัณฑ์สูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นเพียง 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยให้ปริมาณกรด 3α,15β-DHC สูงสุด เท่ากับ 0.21 ไมโครโมลต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมง

จากปริมาณการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC และความแข็งของเม็ดเจลที่ได้ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนแต่ละชนิดในการทดลองต่อๆไปดังนี้ แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Sigma ใช้ 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin ใช้เพียง 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.4.4 ผลกระทบของโพแตสเซียมคลอไรด์ต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC

เนื่องจากบางส่วนของเม็ดเจลที่ได้จากการตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 (วิธีข้อ 2.5.2.2) ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนทั้ง 3 ชนิด จะเปลี่ยนรูปไปในขณะที่มีการงอกเป็นสายใย และแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC จึงได้ทดลองเติมโพแตสเซียมคลอไรด์ลงในสารผสมปฏิกิริยา (วิธีข้อ 2.7.1) ดังที่ Chibata, I. และ Tosa, T. (1979) ได้รายงานว่า โพแตสเซียมคลอไรด์มีผลช่วยเสริมการแข็งตัวของเม็ดเจลที่ใช้คาร์ราจีแนนในการตรึงรูป

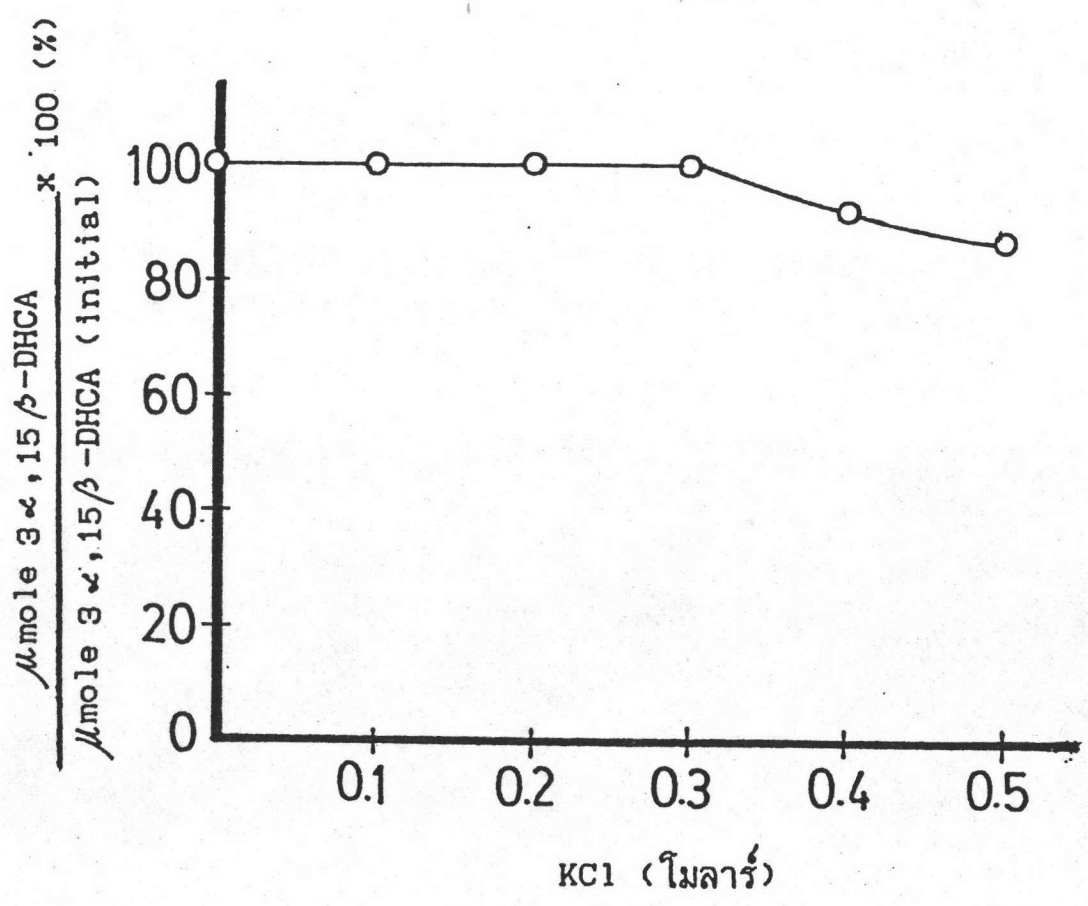
3.4.4.1 ผลของความเข้มข้นโพแตสเซียมคลอไรด์ต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระ C.blakesleeana ST-22

เมื่อเพาะเลี้ยง C.blakesleeana ST-22 ความเข้มข้น 1.25×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย พีเอช 6.5 (วิธีข้อ 2.4.3) อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ โดยมีโพแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5

โมลาร์ ในสารผสมปฏิกิริยา (วิธีข้อ 2.7.1) นาน 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์หาปริมาณกรด 3α,15β-DHC (วิธีข้อ 2.7.2 และ 2.7.3) พบว่า ในช่วงความเข้มข้นของโพแตสเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.1 ถึง 0.3 โมลาร์ ไม่มีผลต่อความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระ C.blakesleeana ST-22 เลย ในขณะที่ความเข้มข้นโพแตสเซียมคลอไรด์สูงกว่านี้ จะทำให้การแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ลดลงไปบ้างเล็กน้อย คือที่ 0.5 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์จะทำให้ผลิตภัณฑ์กรด 3α,15β-DHC ลดลงไป เหลือประมาณ 90 เปอร์เซนต์ ของปริมาณเมื่อไม่มีผลกระทบของโพแตสเซียมคลอไรด์ (รูปที่ 18)

3.4.4.2 ผลของความเข้มข้นโพแตสเซียมคลอไรด์ ต่อความแข็งของเม็ดเจล และการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล

เตรียมแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Sigma ชนิดละ 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) และแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ความเข้มข้น 1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีข้อ 2.5.2.2 แล้วนำมางอกเป็นสายใย (วิธีข้อ 2.4.3) นาน 72 ชั่วโมง นำสายใยที่ได้จากสปอร์ตรึงมาแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC โดยมีโพแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 โมลาร์ในสารผสมปฏิกิริยา (วิธีข้อ 2.7.2) วิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ (วิธีข้อ 2.7.3) และวัดความแข็งของเม็ดเจล (วิธีข้อ 2.6.1) จากผลการทดลองรูปที่ 19 พบว่า เมื่อเสริมด้วยโพแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 โมลาร์ในสารผสมปฏิกิริยา เม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 3 ชนิดที่งอกสายใยแล้ว มีความแข็งสูงกว่าเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลเมื่อไม่มีโพแตสเซียมคลอไรด์ในสารผสมปฏิกิริยา แต่ยังพบว่ามีเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลที่งอกสายใยแล้วจากบริษัท Sigma บางส่วนแตกเล็กน้อย ในขณะที่ไม่พบในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลอีก 2 ชนิดที่เหลือ เมื่อพิจารณาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปได้ จะเห็นว่า เมื่อมีโพแตสเซียมคลอไรด์ในสารผสมปฏิกิริยา สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 3 ชนิด จะมีการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC มากขึ้น ตามความเข้มข้นของโพแตสเซียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้นโพแตสเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.3 โมลาร์ จะให้การแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC สูงเป็น 2 เท่าของเมื่อไม่มีโพแตสเซียมคลอไรด์ในสารผสมปฏิกิริยา ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทุกชนิด ดังนั้นในการทดลองต่อๆไปนี้



รูปที่ 18 ผลกระทบของความเข้มข้นโพแตสเซียมคลอไรด์ ต่อความสามารถในการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3∝,15β-DHCโดยสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22

รูปที่ 19 ผลกระทบของความเข้มข้นโพแตสเซียมคลอไรด์ ต่อความแข็งของเม็ดเจล(วิธีข้อ 2.6.1)และการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC(วิธีข้อ 2.7.3) ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลแต่ละชนิด

ก. 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako ประเทศญี่ปุ่น

ข. 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

ค. 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก

รูปที่ 19 ก

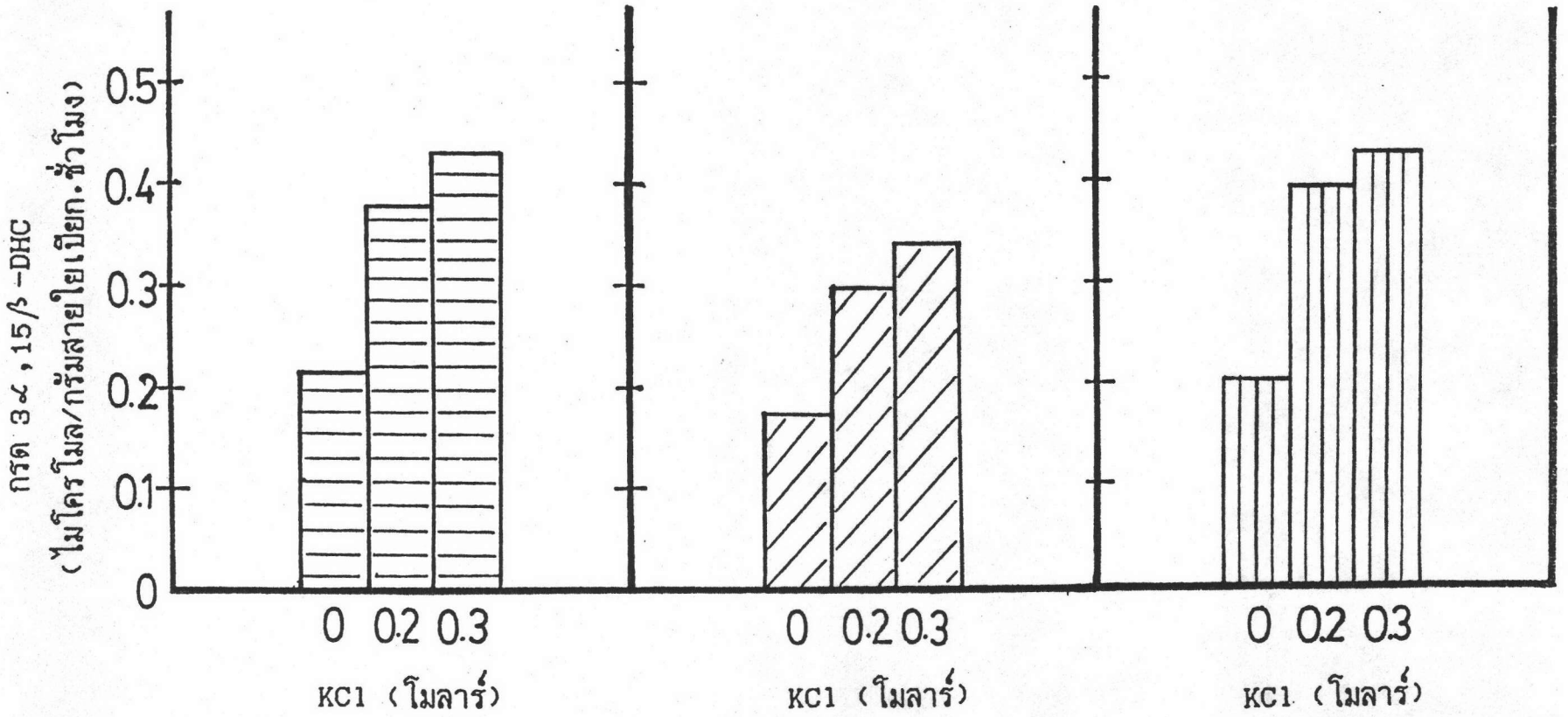
ความเข้มข้นของKC1 (โมลาร์)	0	0.2	0.3
ความแข็งของเม็ดเจล (ค่าเปรียบเทียบ)	+4	+6	+7

รูปที่ 19 ข

0	0.2	0.3
+3	+5	+6

รูปที่ 19 ค

0	0.2	0.3
+4	+6	+7



จะใช้สารผสมปฏิกิริยาที่มี 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ละลายอยู่ด้วยเสมอ

3.4.5 ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระและสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลของ C.blakesleeana ST-22 ในช่วงระยะการเจริญแตกต่างกัน

เนื่องจากวิธีการเตรียมสปอร์แบบกักขังสปอร์ มีผลทำให้สปอร์ในเม็ดเจลมีโอกาสสัมผัสกับออกซิเจนในสารละลายได้น้อยกว่าสปอร์อิสระ ซึ่งจะมีผลต่อการงอกเป็นสายใยในเม็ดเจล ดังนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณออกซิเจนโดยเปลี่ยนรูปร่างของภาชนะที่ใช้จากขวดรูปชมพู่ธรรมดา(erlenmeyer flask) เป็นขวดรูปชมพู่ก้นบุบ(baffed flask, ขวดซึ่งได้รับการออกแบบพิเศษ เพื่อให้มีปริมาณกาซออกซิเจนละลายในสารละลายที่ใช้บรรจุในขวดได้มากกว่าขวดรูปชมพู่ธรรมดา) (Aiba และคณะ, 1973) และเพิ่มความเร็วในการเขย่า(วิธีข้อ 2.4.3) จาก 250 รอบต่อนาที เป็น 300 รอบต่อนาที

นำเม็ดเจลสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน (วิธีข้อ 2.5.2.2) มางอกเป็นสายใยในอาหารเหลว พีเอช 6.5(วิธีข้อ 2.4.3) ในสภาวะการเจริญต่างกัน ดังนี้

ก. ขวดรูปชมพู่ธรรมดา เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที

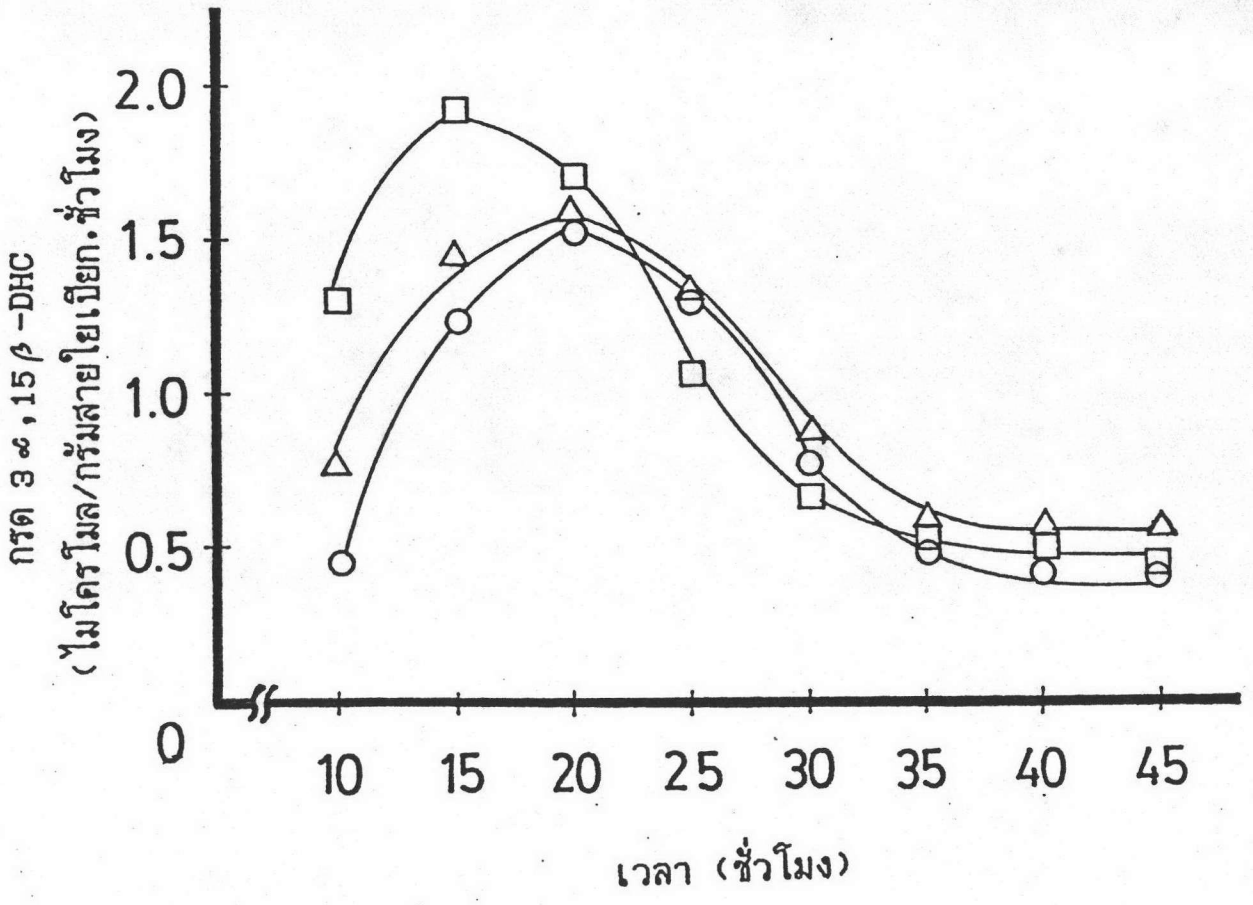
ข. ขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ค. ขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลาต่างๆกัน แล้วนำมาแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ในสารผสมปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 34 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้(วิธีข้อ 2.7) ชั่งน้ำหนักเปียกของเม็ดเจลสปอร์ตรึงที่งอกสายใยแล้ว ก่อนและหลังการทำปฏิกิริยาการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC (รายงานเป็นเปอร์เซนต์น้ำหนักเปียกหลังการทำปฏิกิริยาต่อน้ำหนักเปียกก่อนการทำปฏิกิริยา)

จากผลการทดลองรูปที่ 20, 21, 22 และ 23 แสดงให้เห็นว่า เมื่อสภาวะการเจริญของสปอร์อิสระและสปอร์ตรึงอยู่ในขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที สายใยที่ได้จะมีการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสปอร์ที่เขย่าในขวดรูปชมพู่ธรรมดา และขวดรูปชมพู่ก้นบุบ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่สภาวะการเจริญในขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที สายใยอิสระสามารถแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ได้สูงสุด ภายในเวลา 15 ชั่งโมง ในขณะที่สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako และ Sigma จะต้องใช้เวลานานกว่า

○ ขวดรูปชมพู่ธรรมดา เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที
△ ขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที
□ ขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที



รูปที่ 20 ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3∝,15β-DHC ของสายใยอิสระ ที่สภาวะของการงอกสายใยในขวดรูปชมพู่และความเร็วของการเขย่า 250 และ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ ในช่วงเวลาต่างๆ (วิธีข้อ 2.4.3) และแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3∝,15β-DHC (วิธีข้อ 2.7.2)

รูปที่ 21, 22 และ 23 ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลที่สภาวะของการงอกเป็นสายใยต่างกัน อุณหภูมิ 30 °ซ ในช่วงเวลาต่างๆ(วิธีข้อ 2.4.3) แปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นผลิตภัณฑ์(วิธีข้อ 2.7.2) และเปรียบเทียบน้ำหนักเปียกของเม็ดเจลสปอร์ตรึงที่งอกสายใยแล้วหลังการทำปฏิกิริยา กับก่อนทำปฏิกิริยา โดยคิดน้ำหนักเม็ดเจลก่อนทำปฏิกิริยาเป็น 100 เปอร์เซนต์

รูปที่ 21 เม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako

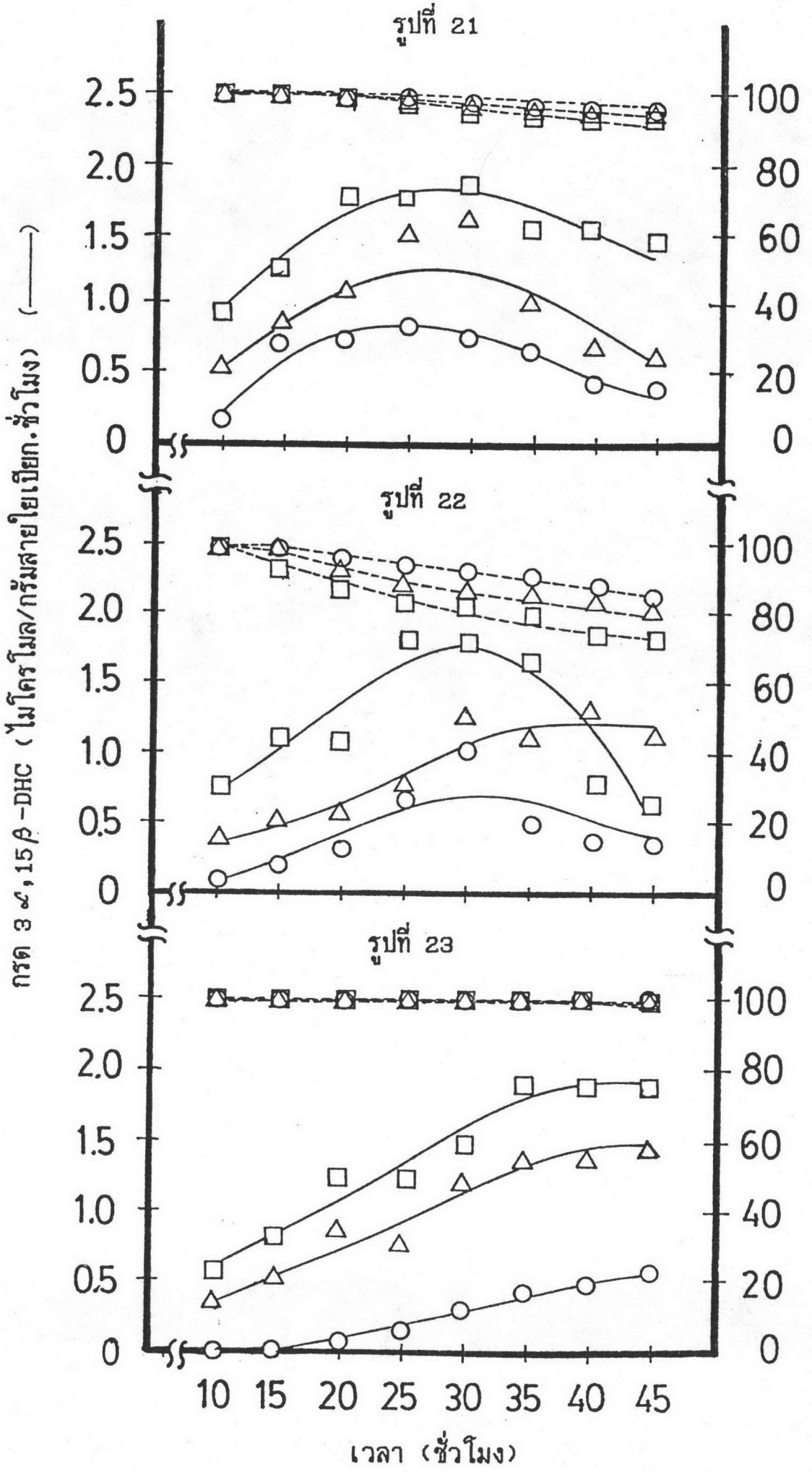
รูปที่ 22 เม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Sigma

รูปที่ 23 เม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Copenhagen Pectin

○ ขวดรูปชมพู่ธรรมดา เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที

△ ขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที

□ ขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที


รูปที่ 21
รูปที่ 22
รูปที่ 23
กรด 3α,15β-DHC (ไมโครโมล/กรัมสายใยเยื่อก.ชั่วโมง) (——)
น้ำหนักเม็ดเจลสปอร์ตรึงหลังทำปฏิกิริยา / น้ำหนักเม็ดเจลสปอร์ตรึงก่อนทำปฏิกิริยา x 100 (%) (----)
เวลา (ชั่วโมง)
0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
20
40
60
80
100
10 15 20 25 30 35 40 45

คือ ประมาณ 20-30 ชั่วโมง และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhagen Pectin จะใช้เวลานานถึง 35-45 ชั่วโมง โดยที่ประสิทธิภาพสูงสุดของการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC จากทั้งสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 3 ชนิด มีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 1.9 ไมโครโมลต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมง

เมื่อศึกษาติดตามการสูญเสียน้ำหนักเปียกของเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล (รวมสายใย) แต่ละชนิดก่อนและหลังการทำปฏิกิริยา พบว่าเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Copenhagen Pectin ไม่มีการสูญเสียน้ำหนักของเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล (รวมสายใย)เลย ถึงแม้ว่าจะใช้เวลาในการงอกเป็นสายใยนานถึง 40 ชั่วโมง ทั้งสภาวะที่เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ธรรมดาและขวดรูปชมพู่ก้นบุบ ที่เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที หรือแม้กระทั่งเพิ่มความเร็วในการเขย่าจนถึง 300 รอบต่อนาที (รูปที่ 23) ในขณะที่เม็ดเจลที่ได้จากแคปปา-คาร์ราจีแนนบริษัท Wako บางครั้งจะมีการสูญเสียน้ำหนักของเม็ดเจลไปบ้างแต่ก็เล็กน้อยมาก (รูปที่ 21) ส่วนเม็ดเจลจากแคปปา-คาร์ราจีแนนบริษัท Sigma นั้นจะมีการสูญเสียน้ำหนักของเม็ดเจลอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเวลาผ่านไปเพียง 20 ชั่วโมงของสภาวะการเจริญในขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 250 และ 300 รอบต่อนาที และภายในเวลา 30 ชั่วโมงเมื่อเขย่าในขวดรูปชมพู่ธรรมดา (รูปที่ 22) ดังนั้นจึงไม่เลือกใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Sigma เป็นสารตรึงสปอร์อีกต่อไป

ในการทดลองต่อไปนี้จึงเลือกสภาวะการงอกของสปอร์เป็นสายใยคงที่เหมือนกันทั้งสปอร์อิสระ และสปอร์ตรึงในแคปปา-คาร์ราจีแนนทั้งสองชนิด โดยเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ก้นบุบเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที แต่ใช้เวลานาน 15 ชั่วโมงสำหรับสปอร์อิสระ 20 ชั่วโมงสำหรับสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และ 40 ชั่วโมงสำหรับสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin

3.4.6 <u>ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการงอกเป็นสายใยจากสปอร์อิสระ และสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ของ C.blakesleeana ST-22</u>

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ phase contrast (รูปที่ 24) แสดงให้เห็นถึงลักษณะการงอกเป็นสายใยจากสปอร์ของ <u>C.blakesleeana</u> ST-22 เมื่อใช้สปอร์อิสระและสปอร์ตรึงในแคปปา-คาร์ราจีแนน ต้องใช้เวลาในการงอกสายใยแตกต่างกัน โดยที่สปอร์อิสระเมื่องอกสายใยเป็นเวลา 15 ชั่วโมง (รูปที่ 24 ก.4) จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่แปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC สูงสุด ซึ่งในกลุ่มสายใยจาก

รูปที่ 24 การงอกสายใยของสปอร์อิสระ และสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ของ C.blakesleeana ST-22 ในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใยซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่ช่วงเวลาของการเจริญแตกต่างกัน ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon UFX-II และ Nikon FX-35A โดยใช้ Phase contrast

ก. แสดงการงอกของสายใยจากสปอร์อิสระ

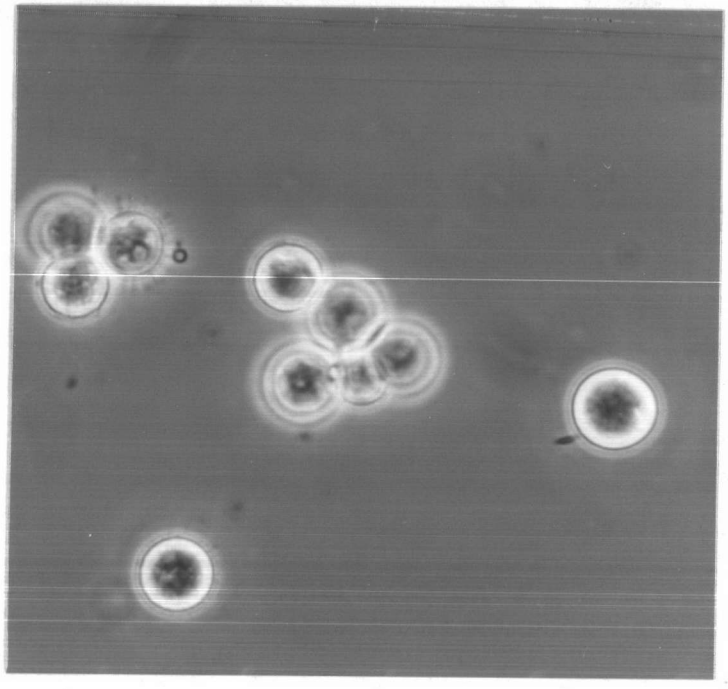
ก.1 สปอร์อิสระ

ก.2 สายใยที่งอกจากสปอร์ อายุ 3 ชั่วโมง

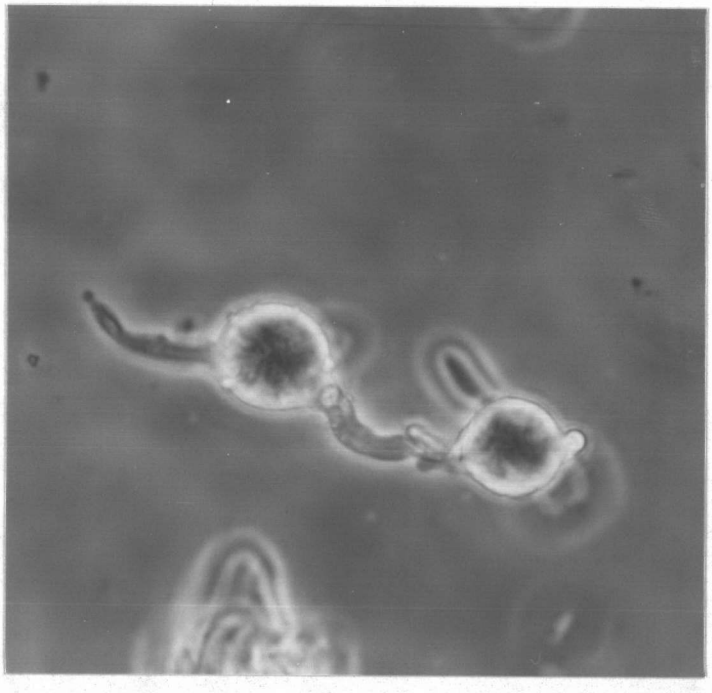
ก.3 สายใยที่งอกจากสปอร์ อายุ 6 ชั่วโมง

ก.4 กลุ่มสายใยที่งอกจากสปอร์ อายุ 15 ชั่วโมง (ซึ่งให้แอคติวิตีสูงที่สุด)

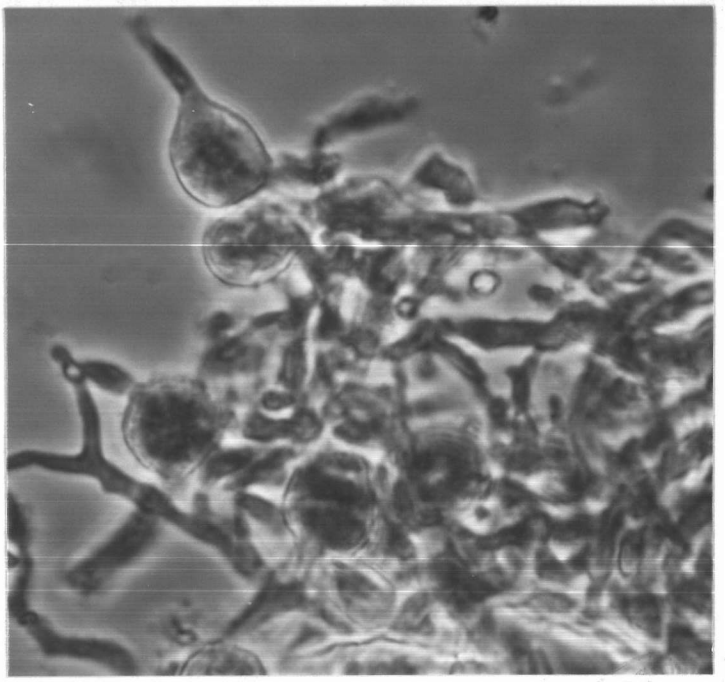
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย (วิธีข้อ 2.4.3) เป็นเวลาต่างๆกัน กำลังขยาย 40x5



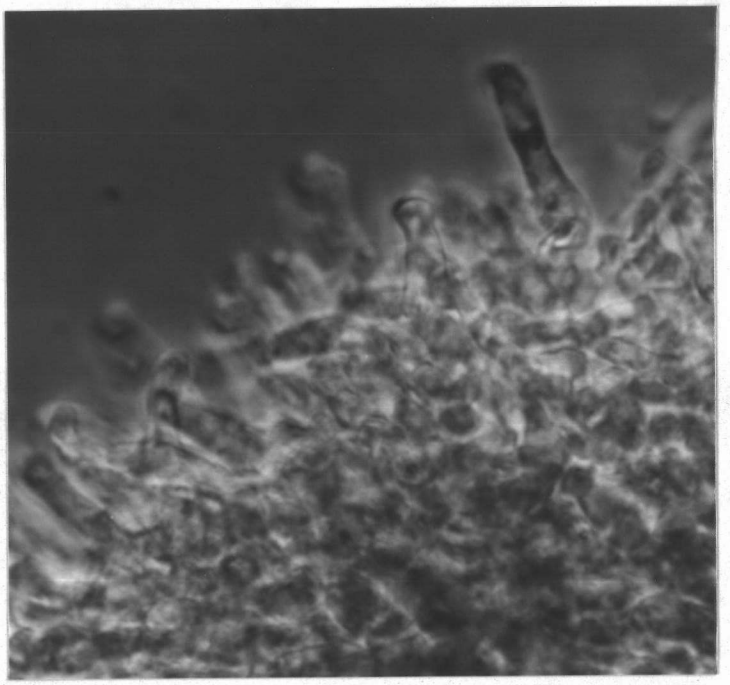
รูปที่ 24 ก.1



รูปที่ 24 ก.2



รูปที่ 24 ก.3



รูปที่ 24 ก.4

รูปที่ 24 (ต่อ)

ข. แสดงการงอกของสายใยจากสปอร์อิสระเป็นกลุ่มสายใย (pellet)

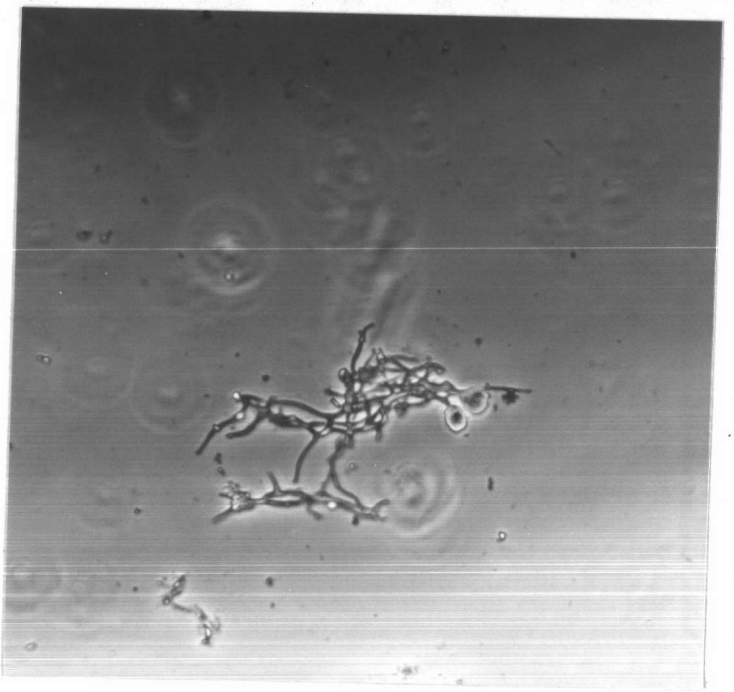
ข.1 กลุ่มสายใยที่งอกจากสปอร์ อายุ 6 ชั่วโมง

ข.2 กลุ่มสายใยที่งอกจากสปอร์ อายุ 12 ชั่วโมง

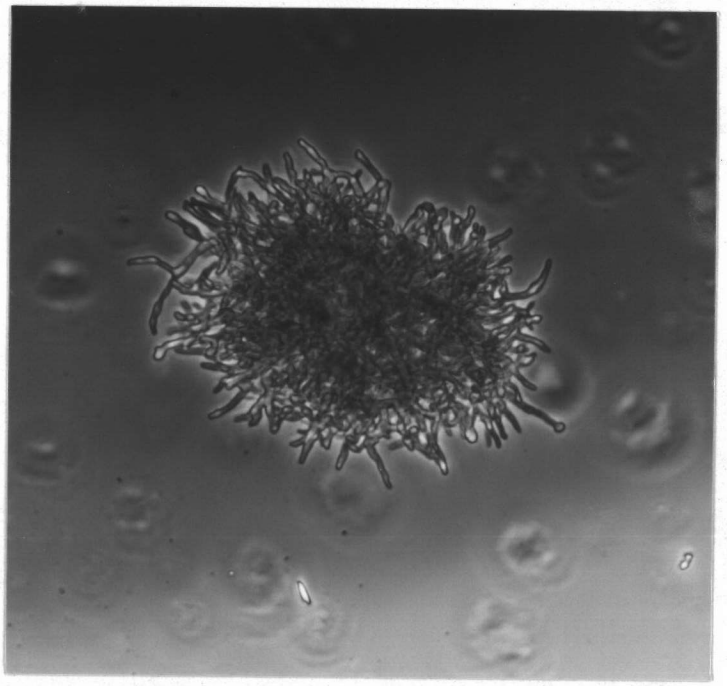
ข.3 กลุ่มสายใยที่งอกจากสปอร์ อายุ 15 ชั่วโมง

ข.4 กลุ่มสายใยที่งอกจากสปอร์ อายุ 48 ชั่วโมง

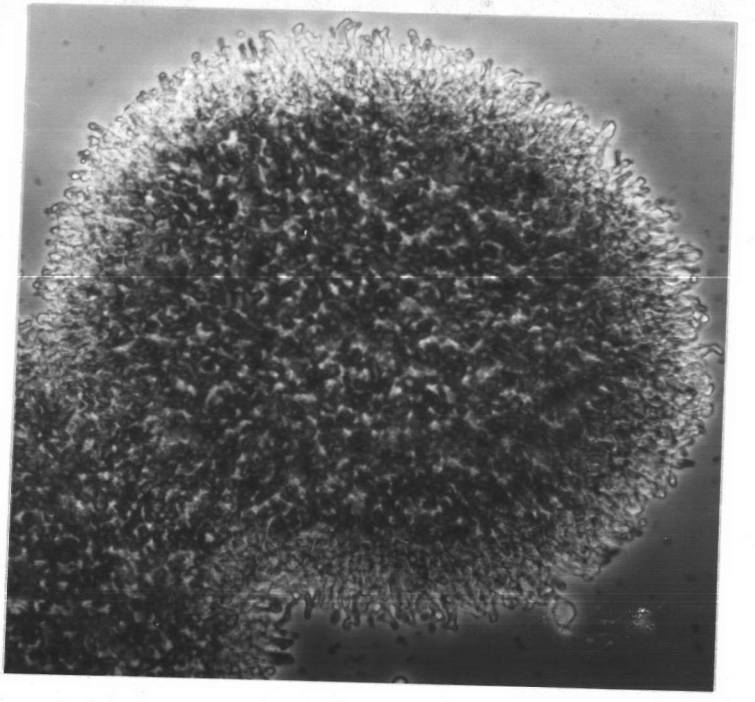
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย(วิธีข้อ 2.4.3) เป็นเวลาต่างๆกัน กำลังขยาย 20x5



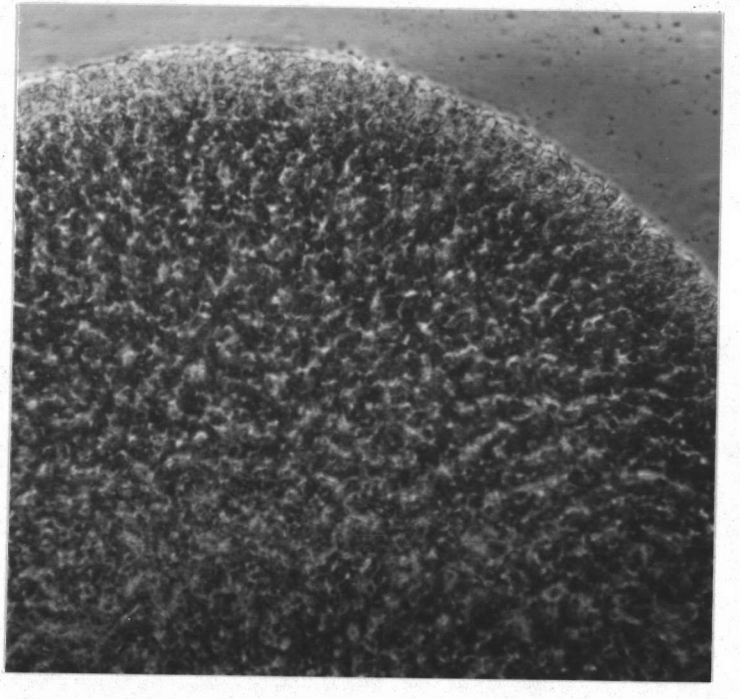
รูปที่ 24 ข.1



รูปที่ 24 ข.2



รูปที่ 24 ข.3



รูปที่ 24 ข.4

รูปที่ 24 (ต่อ)

ค. แสดงการงอกสายใยของสปอร์ที่ถูกตรึงในแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล บริษัท Copenhagen Pectin

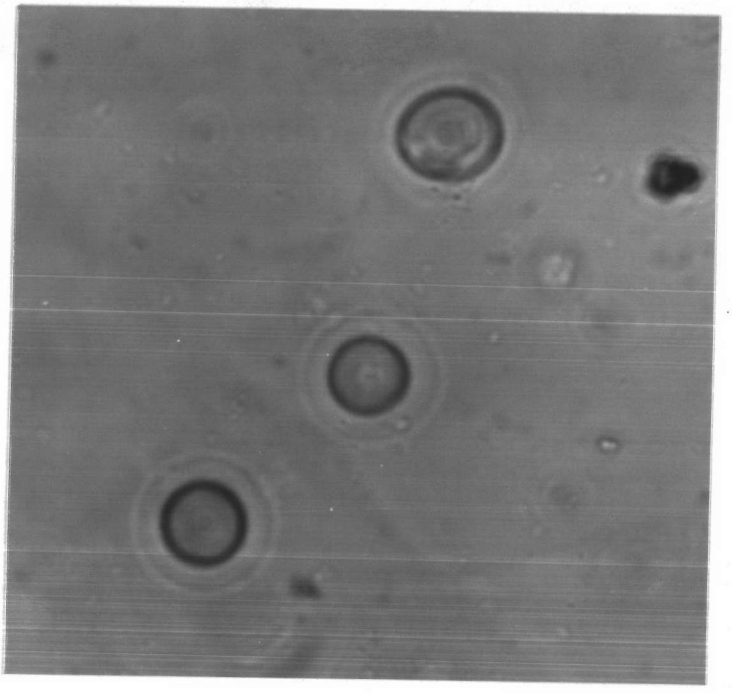
ค.1 สปอร์ภายในเม็ดเจล

ค.2 สปอร์ที่งอกสายใย อายุ 10 ชั่วโมง

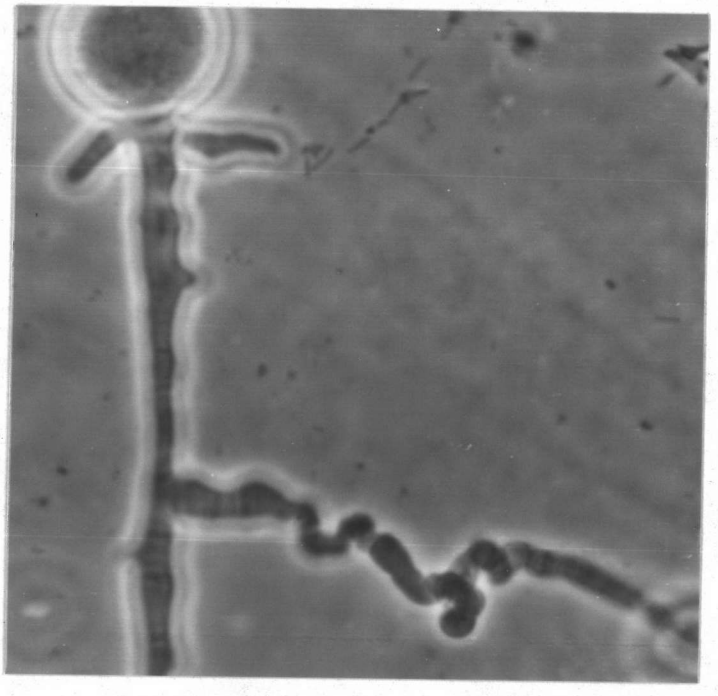
ค.3 สายใยภายในเม็ดเจล อายุ 20 ชั่วโมง

ค.4 สายใยภายในเม็ดเจล อายุ 40 ชั่วโมง (ซึ่งให้แอคติวิตีสูงที่สุด)

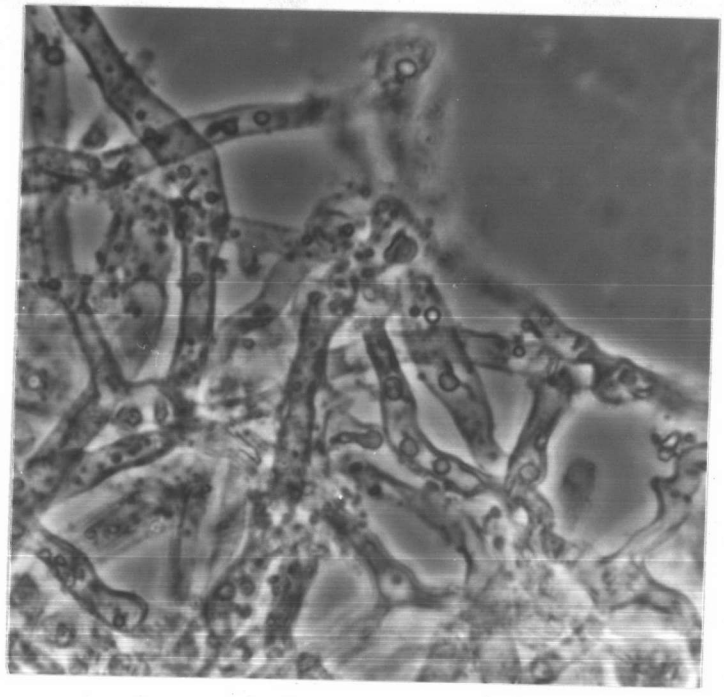
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย(วิธีข้อ 2.4.3) เป็นเวลาต่างๆกัน กำลังขยาย 40x5



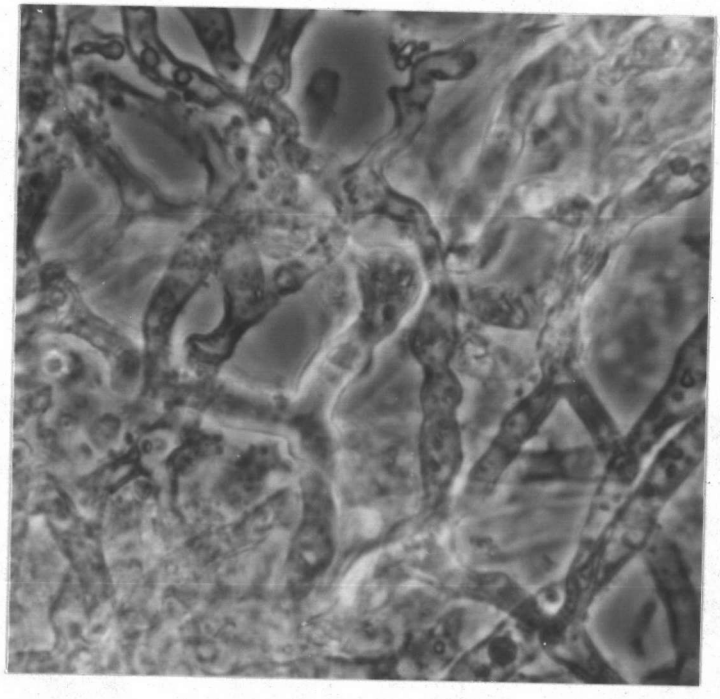
รูปที่ 24 ค.1



รูปที่ 24 ค.2



รูปที่ 24 ค.3



รูปที่ 24 ค.4

รูปที่ 24 (ต่อ)

ง. แสดงการงอกสายใยของสปอร์ที่ถูกตรึงในแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล บริษัท Copenhagen Pectin

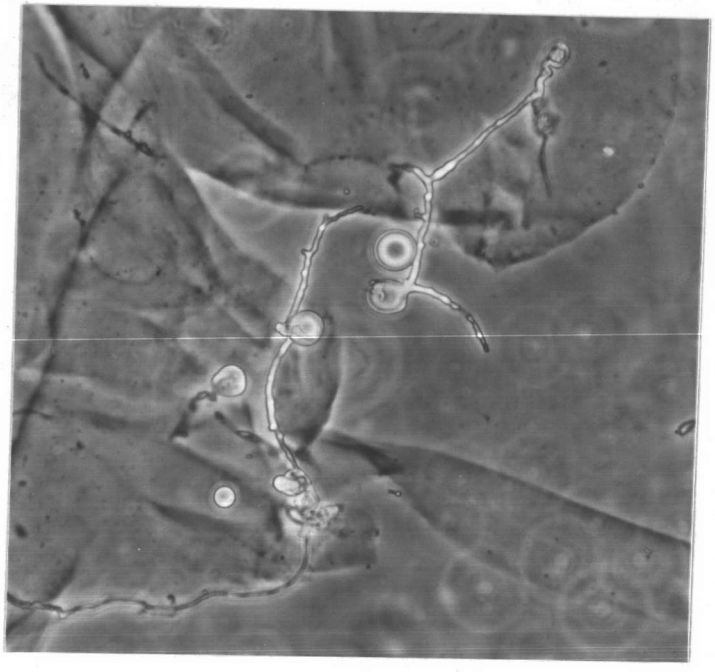
ง.1 สปอร์ที่งอกสายใย อายุ 10 ชั่วโมง

ง.2 สายใยภายในเม็ดเจล อายุ 20 ชั่วโมง

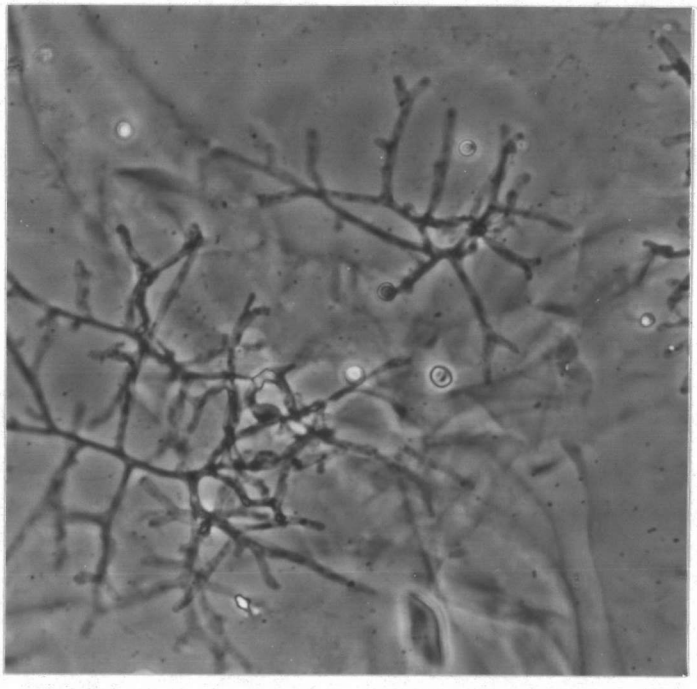
ง.3 สายใยภายในเม็ดเจล อายุ 40 ชั่วโมง

ง.4 สายใยภายในเม็ดเจล อายุ 55 ชั่วโมง

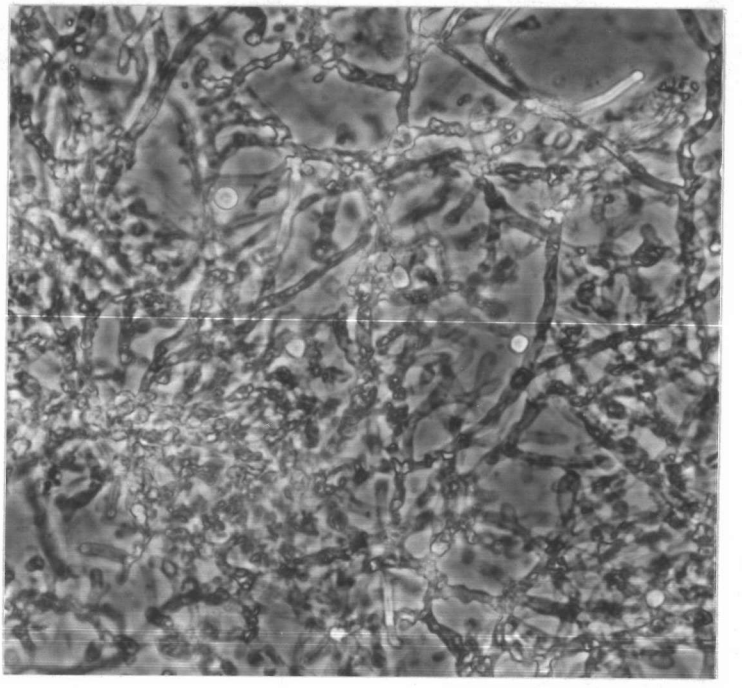
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย(วิธีข้อ 2.4.3) เป็นเวลาต่างๆกัน กำลังขยาย 20x5



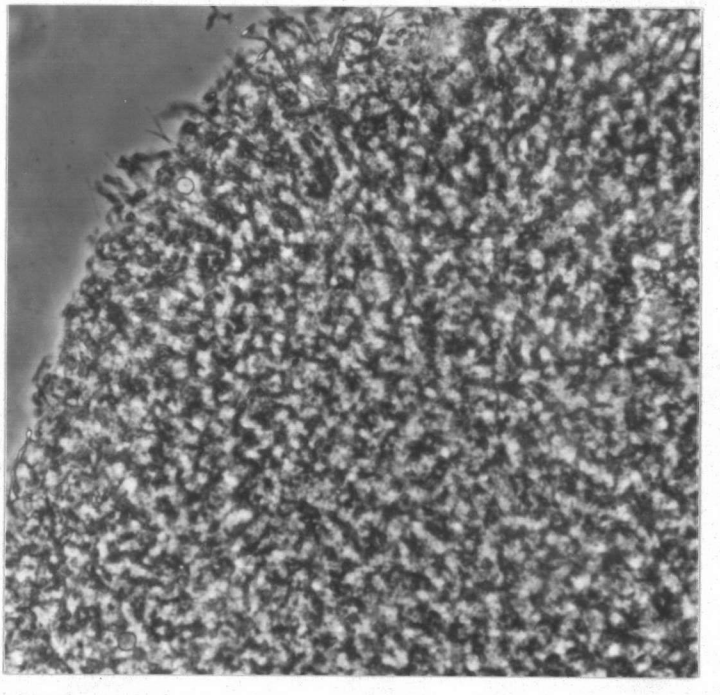
รูปที่ 24 ง.1



รูปที่ 24 ง.2



รูปที่ 24 ง.3



รูปที่ 24 ง.4

สปอร์อิสระที่เวลา 15 ชั่วโมงของการงอกเป็นสายใยนี้ จะไม่เห็นสปอร์และส่วนของสปอร์ที่กำลังงอกเป็นสายใย(germ tube)เหลืออยู่เลยเมื่อเทียบกับที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง (รูปที่ 24 ก.1 และ ก.2) และจะให้กลุ่มสายใยที่เวลา 15 ชั่วโมงขนาดโตกว่าสายใยที่งอกเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (รูปที่ 24 ข.3 และ ข.2) แต่เล็กกว่ากลุ่มสายใยที่ใช้เวลางอก 48 ชั่วโมง (รูปที่ 24 ข.4) ขนาดของกลุ่มสายใยที่ได้ในเวลา 15 ชั่วโมงของการงอกสายใยนี้คงจะมีพื้นที่ผิวพอเหมาะกับปริมาณสารตั้งต้น LCA และกาซออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารผสมปฏิกิริยาที่จะผ่านเข้าสู่สายใย หรือเป็นเวลาที่เอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC มีแอคติวิตีสูงที่สุด จึงให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด ส่วนสายใยที่ได้ในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhagen Pectin จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผลิตกรด 3α,15β-DHC สูงที่สุด เมื่อเวลาของการงอกสายใยเป็น 40 ชั่วโมง (รูปที่ 24 ค.4) ซึ่งจะพบการเริ่มงอกเป็นสายใยของสปอร์ให้เห็นเด่นชัดที่เวลา 10 ชั่วโมง (รูปที่ 24 ค.2) ซึ่งช้ากว่าสปอร์อิสระถึง 7 ชั่วโมง และที่เวลาของการงอกสายใยเท่ากับ 20 และ 40 ชั่วโมง (รูปที่ 24 ค.3 และ ค.4) จะไม่เห็นความแตกต่างของลักษณะโครงสร้างของสายใย C.blakesleeana ST-22 เลย แต่ทั้งนี้สามารถบอกความแตกต่างของปริมาณสายใยได้โดยที่เวลา 20 ชั่วโมง (รูปที่ 24 ง.2) จะมีปริมาณสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลน้อยกว่าที่เวลา 40 ชั่วโมง (รูปที่ 24 ง.3) และเมื่อเพิ่มเวลาของการงอกเป็นสายใยมากขึ้นเป็น 55 ชั่วโมง (รูปที่ 24 ง.4) จะเห็นว่ามีปริมาณสายใยเพิ่มขึ้นกว่าเมื่อเวลาของการงอกสายใยเป็น 40 ชั่วโมง

3.4.7 ผลของความหนาแน่นของเม็ดเจลสปอร์ตรึงที่งอกสายใยแล้วต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC

ตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ความเข้มข้น 1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรด้วยสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนความเข้มข้น 3.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ของบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin (วิธีข้อ 2.5.2.2) นำสปอร์อิสระและเม็ดเจลสปอร์ตรึงมางอกเป็นสายใยในอาหารเหลว พีเอช 6.5 (วิธี 2.3.2) ในขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15, 20 และ 40 ชั่วโมง ตามลำดับ (วิธีข้อ 2.4.3) นำเม็ดเจลที่งอกสายใยแล้วหนัก 1, 2, 4 และ 5 กรัม (น้ำหนักสายใย 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.25 กรัม ตามลำดับ) และสายใยอิสระหนัก 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.25 กรัม มาแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ในสารผสมปฏิกิริยา 20 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 34 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา

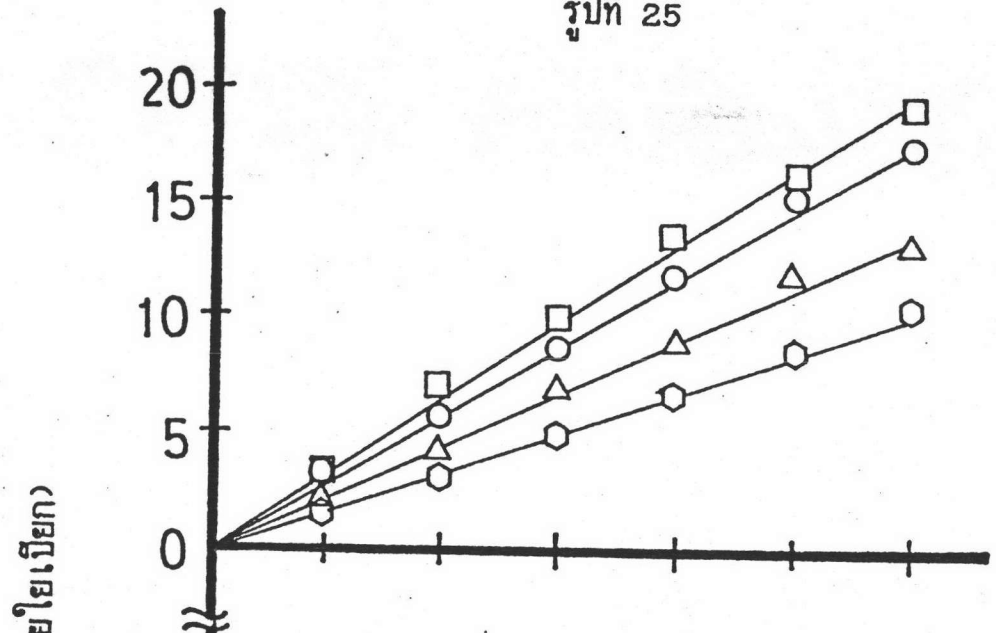
ต่างๆกัน และวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ พบว่าสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako และ Copenhagen Pectin จะมีอัตราการแปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC สูงสุดประมาณ 0.766 ไมโครโมลต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมง เมื่อใช้น้ำหนักเม็ดเจล(รวมสายใย) เท่ากับ 2 กรัม (รูปที่ 26 และ 27) และสายใยอิสระจะแปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC สูงสุดได้ใกล้เคียงกับสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล เมื่อใช้น้ำหนักของสายใยเท่ากัน (รูปที่ 25) เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราการแปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC จะลดต่ำลง เมื่อใช้น้ำหนักของเม็ดเจล(รวมสายใย)สูงขึ้นมากกว่า 2 กรัม อย่างไรก็ตามผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์จะแปรผันตามเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตลอดช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ว่าจะใช้น้ำหนักของเม็ดเจล(รวมสายใย) 1, 2, 4 และ 5 กรัม เมื่อใช้สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด หรือใช้สายใยอิสระที่มีน้ำหนักสายใยเท่ากัน

3.4.8 ผลกระทบของความเข้มข้นของสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ต่อการแปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC ของสายใยอิสระและสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล

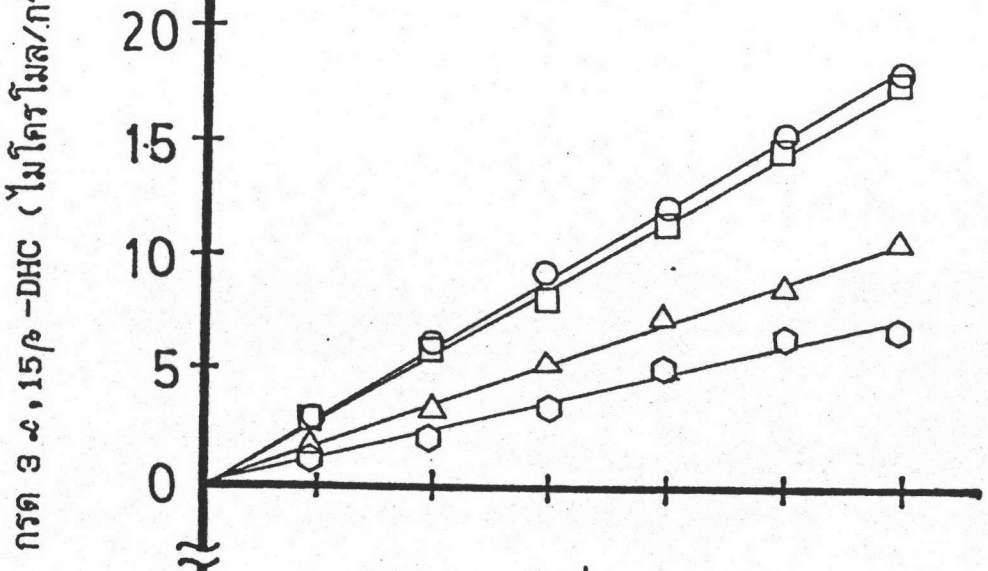
เตรียมสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน (วิธีข้อ 2.5.1) โดยใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin ความเข้มข้น 3.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ นำมาตริงสปอร์ตามวิธีข้อ 2.5.2.2 โดยแปรค่าความเข้มข้นของสปอร์ C.blakesleeana ST-22 เป็น 0.75×10^5, 1.25×10^5, 2.50×10^5 และ 5.00×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตรนอร์มอลซาลีน นำเม็ดเจลสปอร์ตริงที่งอกสายใยแล้ว (วิธีข้อ 2.4.3) 2 กรัม (น้ำหนักสายใยประมาณ 0.07, 0.10, 0.16 และ 0.20 กรัมตามลำดับ) และสายใยอิสระปริมาณสายใยเท่ากันคือ ประมาณ 0.07, 0.10, 0.16 และ 0.20 กรัม มาแปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC ในสารผสมปฏิกิริยา 20 มิลลิลิตร และความเข้มข้นของกรดลิโทโคลิกเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เป็นเวลาต่างๆกัน วิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ (วิธีข้อ 2.7) และวัดความแข็งของเม็ดเจล (วิธีข้อ 2.6.2) พบว่า สายใยอิสระและสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin จะมีอัตราการแปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC สูงสุดเท่ากับ 0.521, 0.521 และ 0.583 ไมโครโมลต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมงตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นของสปอร์เท่ากันคือ 1.25×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร การแปรรูป LCA เป็น

รูปที่ 25, 26 และ 27 ประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิก เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC โดยสายใยอิสระ (รูปที่ 25) สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Wako(รูปที่ 26) สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhagen Pectin(รูปที่ 27) เมื่อน้ำหนักของสายใยเท่ากับ 0.05 (□), 0.10 (○), 0.20 (△) และ 0.25 (⬡) กรัม หรือเท่ากับน้ำหนักของเม็ดเจล(รวมสายใย) 1, 2, 4 และ 5 กรัม ตามลำดับ ในสารผสมปฏิกิริยาที่มี 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ 20 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 34 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลาต่างๆกัน(วิธีข้อ 2.7.2)

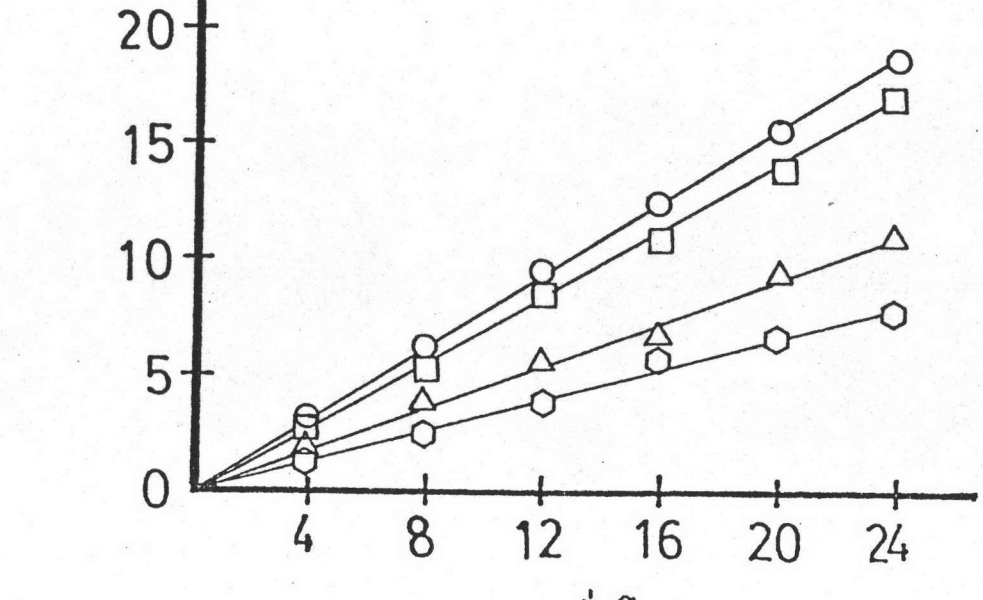
รูปที่ 25



รูปที่ 26



รูปที่ 27



กรด 3 ค, 15ค -DHC (ไมโครโมล/กรัมสายใยเปียก)

เวลา (ชั่วโมง)

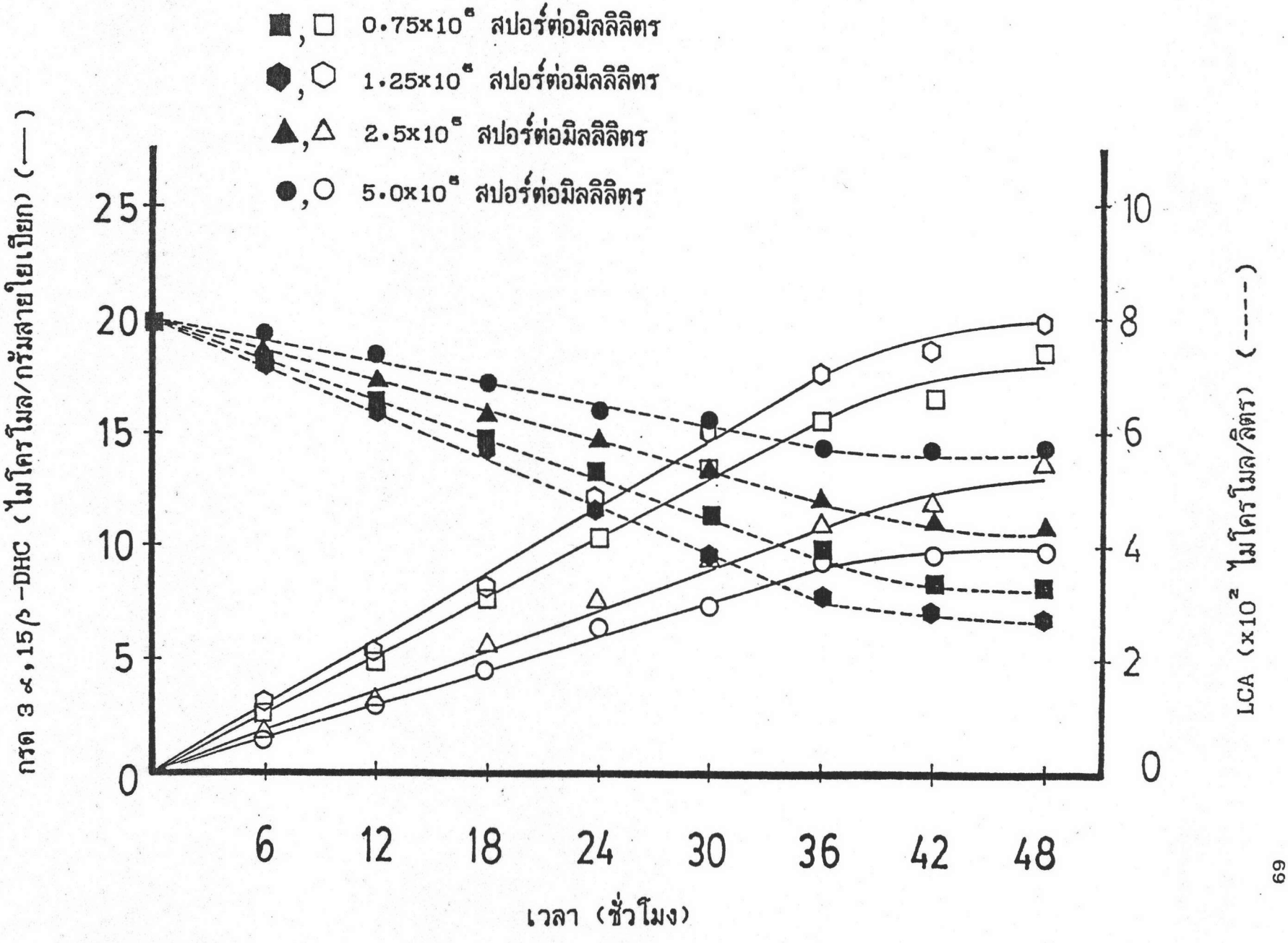
ผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของสปอร์เพิ่มขึ้น และความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล ที่ทุกความเข้มข้นของสปอร์ จะแปรผันเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเวลาของการแปรรูปในช่วงระยะเวลาไม่เกิน 36 ชั่วโมง ในขณะที่การลดลงของสารตั้งต้น LCA ก็จะแปรผันตามอัตราการเพิ่มของกรด 3α,15β-DHC (รูปที่ 28, 29 และ 30) เมื่อพิจารณาความแข็งของเม็ดเจลสปอร์ตริงซึ่งงอกสายใยแล้ว พบว่า ที่ความเข้มข้นของสปอร์เพิ่มมากขึ้น ความแข็งของเม็ดเจลจะลดลงไม่ว่าจะเป็นเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัทใดก็ตาม (รูปที่ 29 และ 30)

3.5 ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ต่อความแข็งและการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α, 15β-DHC โดยสายใยของ C.blakesleeana ST-22 ที่ตรึงในแคปปา-คาร์ราจีแนน

เตรียมสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน โดยใช้คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin ความเข้มข้น 3.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ นำมาตรึงสปอร์โดยใช้ความเข้มข้นสปอร์ 1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (วิธีข้อ 2.5.2.2) นำเม็ดเจลที่ได้ก่อนและหลังการงอกเป็นสายใยตัวอย่างละ 2 กรัม เติมลงใน 20 มิลลิลิตรของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 โมลาร์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 20 °ซ ความเร็ว 50 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเม็ดเจลด้วย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ 3 ครั้งๆละ 100 มิลลิลิตร วัดความแข็งของเม็ดเจลที่ตรึงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (วิธีข้อ 2.6.2) วิเคราะห์ความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล (วิธีข้อ 2.7) ผลการทดลองพบว่า ความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC โดยเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลที่เสริมด้วย 0.05 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์ก่อนและหลังนำไปงอกสายใยแล้วจะลดลงอย่างรวดเร็ว เหลือเพียง 20 และ 4 เปอร์เซนต์ของความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์เมื่อไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ สำหรับแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako 25 และ 10 เปอร์เซนต์สำหรับแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin การแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์จะลดลงอีกเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ให้มากขึ้นไปกว่านี้

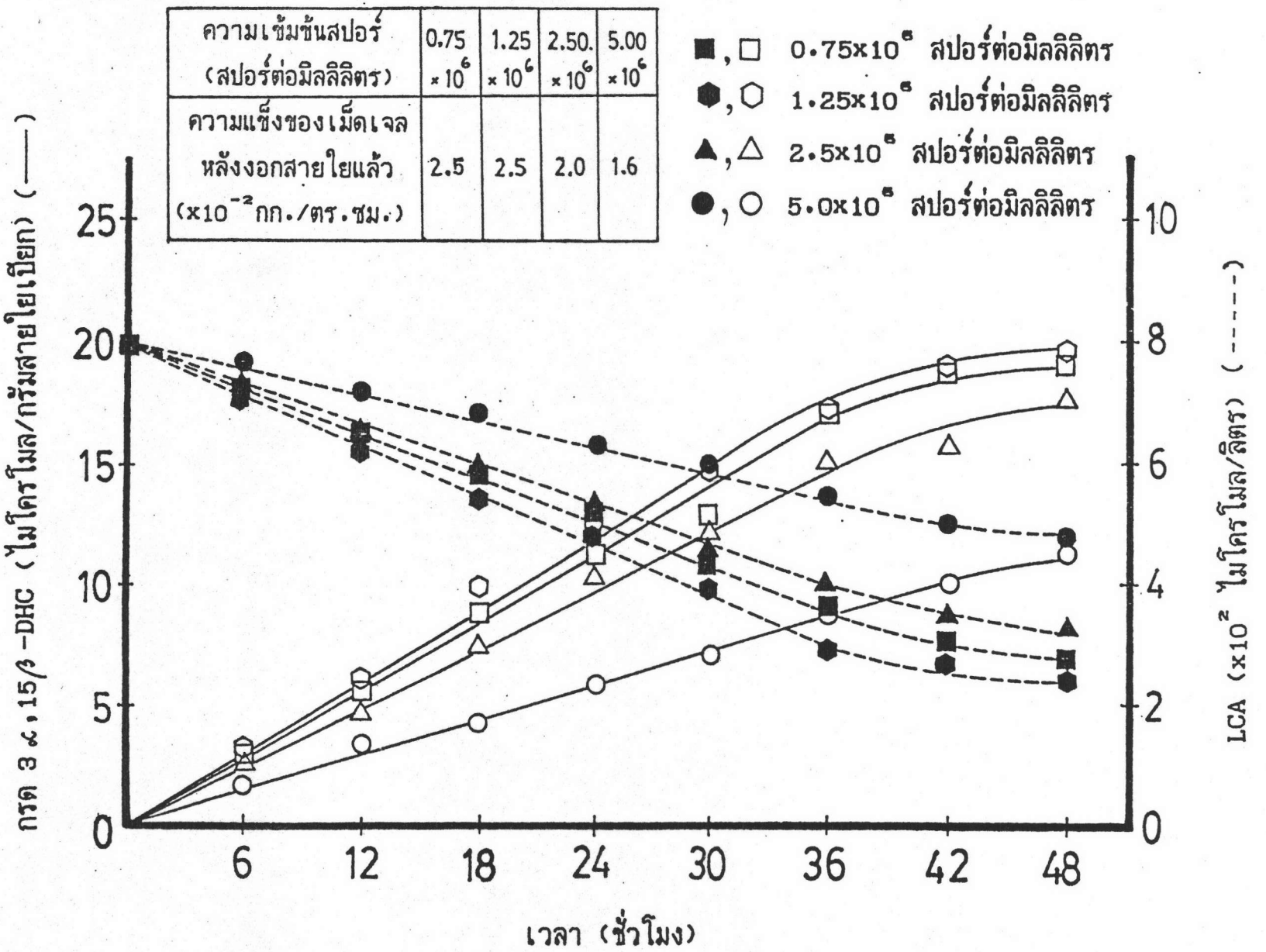
เมื่อพิจารณาความแข็งของเม็ดเจล จะเห็นว่าเมื่อเสริมกลูตารัลดีไฮด์ก่อนนำเม็ดเจลสปอร์ตรึงไปทำการงอกเป็นสายใยจะมีความแข็งคงที่ ทุกความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์

รูปที่ 28 ผลกระทบของความเข้มข้นสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ปริมาณ 0.75×10^5, 1.25×10^5, 2.5×10^5 และ 5.0×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยอิสระ เมื่อใช้ความเข้มข้นกรดลิโทโคลิก 3 กรัมต่อลิตร ในสารผสมปฏิกิริยา 20 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณกรด 3α,15β-DHC ที่ได้ และปริมาณกรดลิโทโคลิกที่เหลือ (วิธีข้อ 2.7)

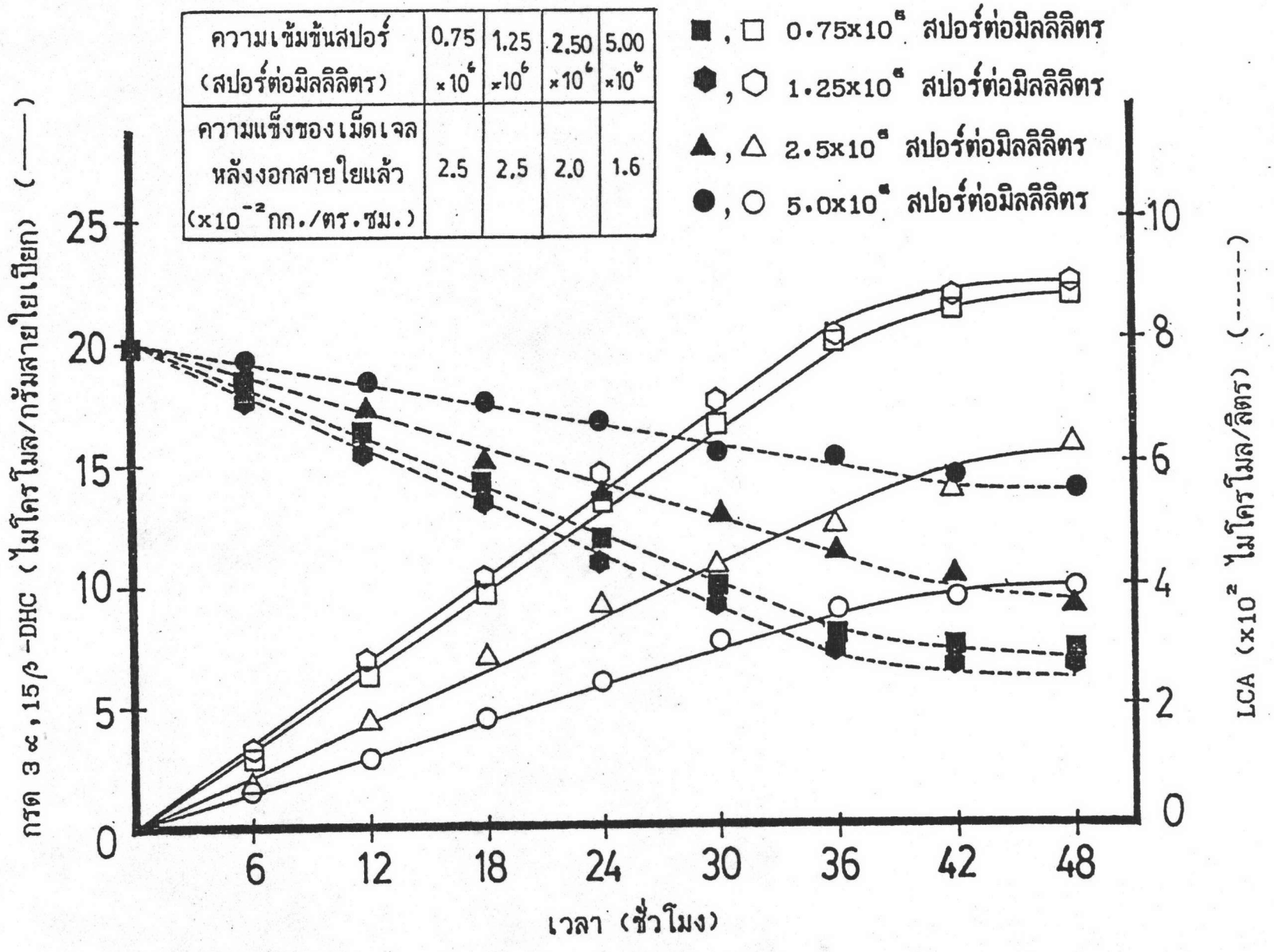

■, □ 0.75x10⁶ สปอร์ต่อมิลลิลิตร
⬢, ⬡ 1.25x10⁶ สปอร์ต่อมิลลิลิตร
▲, △ 2.5x10⁶ สปอร์ต่อมิลลิลิตร
●, ○ 5.0x10⁶ สปอร์ต่อมิลลิลิตร
กรด 3∝,15β-DHC (ไมโครโมล/กรัมสายใยเปียก) (——)
LCA (x10² ไมโครโมล/ลิตร) (----)
0
5
10
15
20
25
0
2
4
6
8
10
6
12
18
24
30
36
42
48
เวลา (ชั่วโมง)

รูปที่ 29 ผลกระทบของความเข้มข้นสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ปริมาณ 0.75×10^5, 1.25×10^5, 2.5×10^5 และ 5.0×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ต่อความแข็งของเม็ดเจล และการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako เมื่อใช้ความเข้มข้นกรดลิโทโคลิก 3 กรัมต่อลิตร ในสารผสมปฏิกิริยา 20 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณกรด 3α,15β-DHC ที่ได้และปริมาณกรดลิโทโคลิกที่เหลือ (วิธีข้อ 2.7)

ความเข้มข้นสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	0.75 $\times 10^6$	1.25 $\times 10^6$	2.50. $\times 10^6$	5.00 $\times 10^6$
ความแข็งของเม็ดเจล หลังงอกสายใยแล้ว ($\times 10^{-2}$ กก./ตร.ซม.)	2.5	2.5	2.0	1.6



รูปที่ 30 ผลกระทบของความเข้มข้นสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ปริมาณ 0.75×10^5, 1.25×10^5, 2.5×10^5 และ 5.0×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ต่อความแข็งของเม็ดเจล และการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด $3\alpha, 15\beta$-DHC โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Copenhagen Pectin เมื่อใช้ความเข้มข้นกรดลิโทโคลิก 3 กรัมต่อลิตรในสารผสมปฏิกิริยา 20 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณกรด$3\alpha, 15\beta$-DHC ที่ได้ และปริมาณกรดลิโทโคลิกที่เหลือ (วิธีข้อ 2.7)


ความเข้มข้นสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)
0.75 ×10^5
1.25 ×10^6
2.50 ×10^6
5.00 ×10^6
ความแข็งของเม็ดเจล หลังงอกสายใยแล้ว (×10^-2 กก./ตร.ซม.)
2.5
2.5
2.0
1.6
■ , □ 0.75x10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร
● , ○ 1.25x10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร
▲ , △ 2.5x10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร
● , ○ 5.0x10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร
กรด 3α,15β-DHC (ไมโครโมล/กรัมสายใยเปียก) (——)
LCA (×10^2 ไมโครโมล/ลิตร) (- - - -)
0
5
10
15
20
25
0
2
4
6
8
10
6
12
18
24
30
36
42
48
เวลา (ชั่วโมง)

สำหรับเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด และมีค่าไม่แตกต่างไปจากเม็ดเจลที่ไม่ได้เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ในขณะที่เม็ดเจลที่เสริมกลูตารัลดีไฮด์ทุกความเข้มข้นหลังการงอกเป็นสายใยแล้วจะมีความแข็งลดลง และพบเม็ดเจลบางส่วนไม่สามารถคงรูปเดิมได้ทั้งเม็ด แคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectn (รูปที่ 31)

3.6 ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนต่อความแข็งและการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล

นำ C.blakesleeana ST-22 ความเข้มข้น 1.25×10^{5} สปอร์มิลลิลิตร มาตรึงสปอร์ตามวิธีข้อ 2.5.2.2 เมื่อใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และ Copenhagen Pectin ความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ นำเม็ดเจลสปอร์ตรึงที่ได้ชนิดละ 2 กรัม เติมลงใน 20 มิลลิลิตรกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 20 °ซ ความเร็ว 50 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แล้วเติมเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 โมลาร์ ตามลำดับ เขย่าที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างเม็ดเจลที่ได้ด้วย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ 3 ครั้งๆ ละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำเม็ดเจลสปอร์ตรึงนี้ไปงอกสายใย (วิธีข้อ 2.4.3) วัดการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC(วิธีข้อ 2.7) และความแข็งของเม็ดเจลก่อนนำไปงอกสายใย (วิธีข้อ 2.6.2) จากผลการทดลองรูปที่ 32 พบว่า ความแข็งของเม็ดเจลสปอร์ตรึงเมื่อเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน มีค่าสูงกว่าเม็ดเจลเมื่อเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์เพียงอย่างเดียว แต่ไม่สามารถตรวจพบการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC เลย ทั้งโดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako หรือบริษัท Copenhagen Pectin ที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนทุกๆความเข้มข้น

ลักษณะของเม็ดเจลสปอร์ตรึงเมื่อเสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซา-เมทธิลลีนไดอามีน แสดงในรูปที่ 33

3.7 เปรียบเทียบคุณสมบัติในการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHCของสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล

เตรียมสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และ Copenhagen

รูปที่ 31 ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC และความแข็งของเม็ดเจล เมื่อเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0-0.25 โมลาร์) ก่อนนำเม็ดเจลสปอร์ตริงมางอกเป็นสายใย และหลังงอกเป็นสายใยแล้ว วิเคราะห์ปริมาณกรด 3α,15β-DHC ที่ได้(วิธีข้อ 2.7) และวัดความแข็งของเม็ดเจล(วิธีข้อ 2.6.2)

ก. 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako

ข. 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin

○ เม็ดเจลสปอร์ตริงแคปปา-คาร์ราจีแนนก่อนงอกสายใย

△ เม็ดเจลสปอร์ตริงแคปปา-คาร์ราจีแนนหลังงอกสายใย

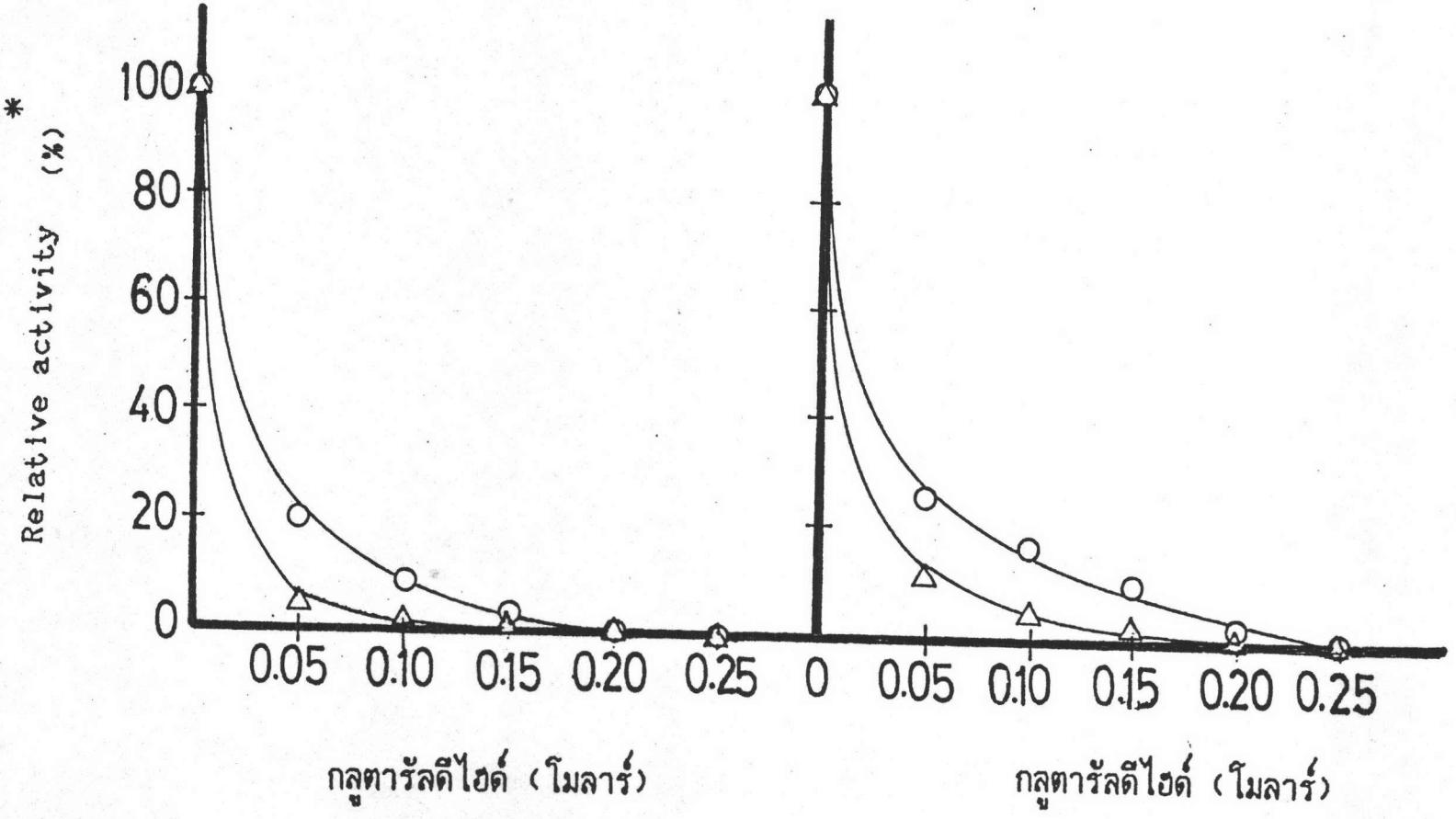
$$*\text{Relative activity} = \frac{\mu\text{mole } 3\alpha,15\beta\text{-DHCA (เสริมกลูตารัลดีไฮด์)}}{\mu\text{mole } 3\alpha,15\beta\text{-DHCA (ไม่เสริมกลูตารัลดีไฮด์)}} \times 100\ (\%)$$

รูปที่ 31 ก

ความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ (โมลาร์)						
ความแข็งของเม็ดเจล ($\times 10^{-2}$ กก./ตร.ซม.)	ก่อนงอกสายใย	0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
	หลังงอกสายใย	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
		2.5	2.5	2.0	2.0	1.6	1.6

รูปที่ 31 ข

0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
2.5	2.5	2.0	2.0	1.6	1.6



รูปที่ 32 ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์(0.05 โมลาร์) กับเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ความเข้มข้นต่างๆ(0-0.2 โมลาร์) ต่อความแข็งของเม็ดเจล(วิธีข้อ 2.6.2) และการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC (วิธีข้อ 2.7) ของสายใยในเม็ดเจล เมื่อใช้ C.blakesleeana ST-22 ตรึงด้วย 3.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และ 1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin

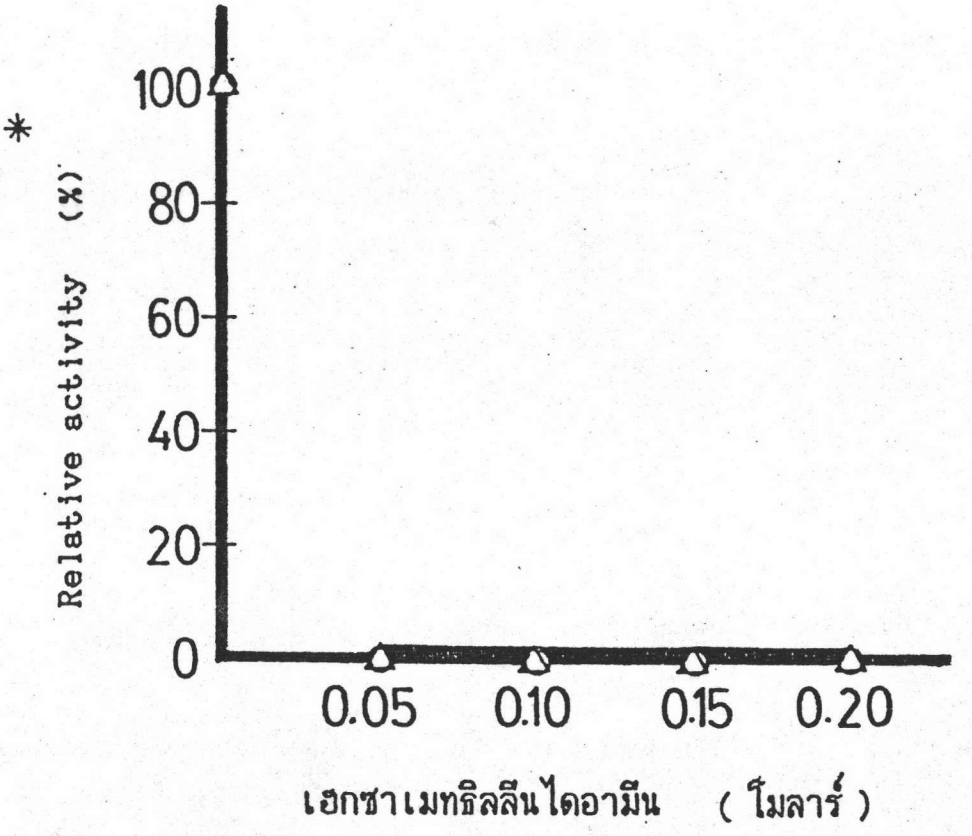
$$\text{* Relative activity} = \frac{\mu\text{mole } 3\alpha,15\beta\text{-DHCA}}{\text{เมื่อมีกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน}} \times 100\ (\%)$$

$$\frac{\mu\text{mole } 3\alpha,15\beta\text{-DHCA}}{\text{เมื่อมีกลูตารัลดีไฮด์อย่างเดียว}}$$

○ สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Wako

△ สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhagen Pectin

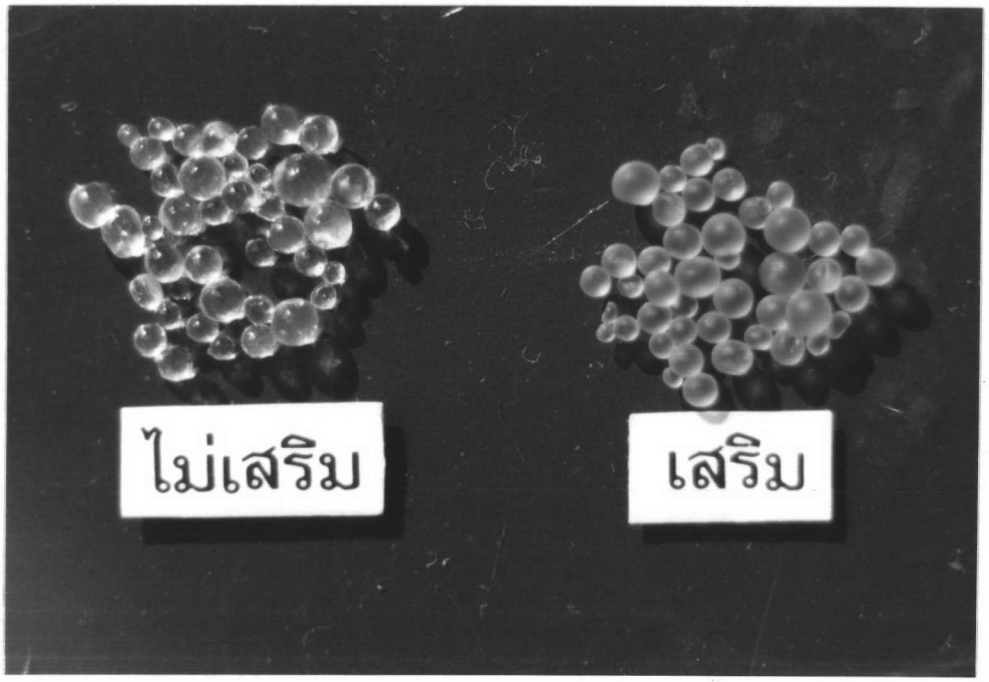
ความเข้มข้นเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (โมลาร์)		0	0.05	0.10	0.15	0.20
ความแข็งของเม็ดเจลก่อนงอกเป็นสายใย ($x10^{-2}$ กก./ซม.)	คาร์ราจีแนน บริษัท Wako	2.8	3.5	4.1	4.5	4.5
	คาร์ราจีแนน บริษัท Copenhagen Pectin	2.8	3.5	4.1	4.5	4.5



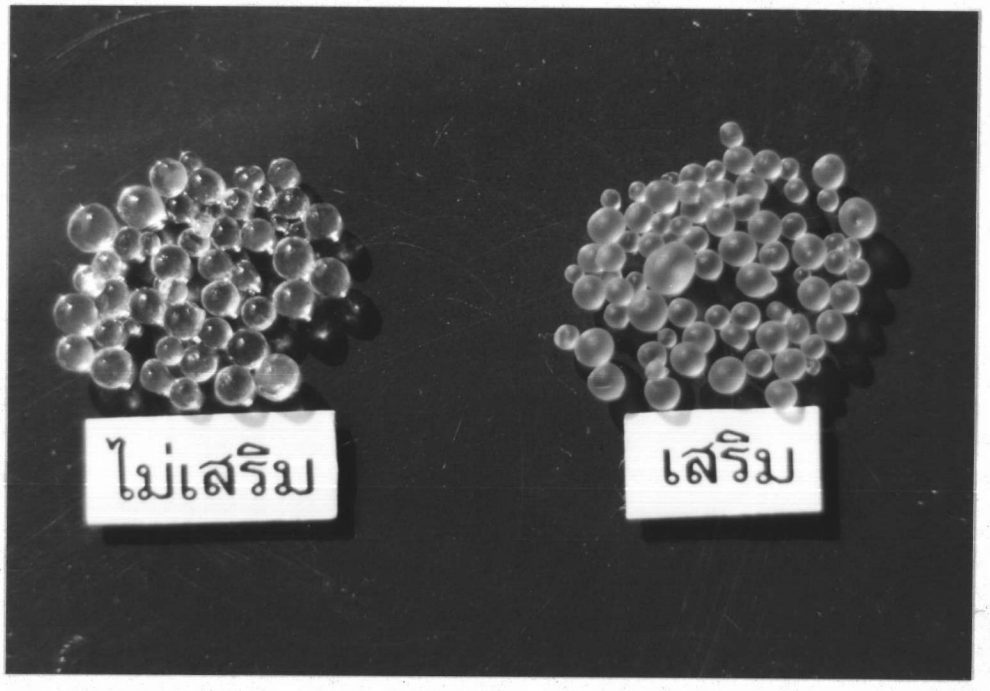
รูปที่ 33 เปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนที่เสริมและไม่เสริมด้วย 0.05 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์ และ 0.05 โมลาร์เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ก่อนนำเม็ดเจลสปอร์ตรึงไปงอกสายใย

ก. เม็ดเจลสปอร์ตรึงด้วย 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) แคปปา-คาร์ราจีแนน จากบริษัท Wako

ข. เม็ดเจลสปอร์ตรึงด้วย 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) แคปปา-คาร์ราจีแนน จากบริษัท Copenhagen Pectin



รูปที่ 33 ก.



รูปที่ 33 ข.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Pectin ความเข้มข้นเป็น 3.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ (วิธีข้อ 2.5.2.2) โดยใช้ความเข้มข้นสปอร์ C.blakesleeana ST-22 1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำสปอร์อิสระและเม็ดเจลสปอร์ตริงแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin มาเจริญในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 °ซ ในขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 15, 20 และ 40 ชั่วโมง ตามลำดับ ใช้เม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลที่งอกสายใยแล้วชนิดละ 2 กรัม (น้ำหนักสายใยประมาณ 0.10 กรัม) และสายใยอิสระปริมาณสายใยเท่ากัน (0.10 กรัม) มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

3.7.1 พีเอช ที่เหมาะสม (optimum pH) ในปฏิกิริยาการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC

เมื่อตรวจวัดการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด เปรียบเทียบกับสายใยอิสระ โดยใช้ LCA เป็นสารตั้งต้นความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวกที่ 4) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า พีเอช ต่างๆกันระหว่าง 4.0 ถึง 9.5 (พีเอช 4.0-6.5 ใช้สารละลาย 0.1 โมลาร์อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0-8.5 ใช้สารละลาย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0-9.5 ใช้สารละลาย 0.1 โมลาร์ทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์) อุณหภูมิ 34 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง (วิธีข้อ 2.7.2) และวัดปริมาณกรด 3α,15β-DHC (วิธีข้อ 2.7.3) พบว่าเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช ประมาณ 8.5 ในขณะที่เอนไซม์ในสายใยของเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin สามารถเร่งปฏิกิริยาแปรรูป LCA ได้ดีในช่วงพีเอช ประมาณ 8.0-8.5 และ 8.5-9.0 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 34

3.7.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ในปฏิกิริยาการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC

เมื่อทำการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิดเปรียบเทียบกับสายใยอิสระ โดยใช้ LCA เป็นสารตั้งต้น ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตรในสารผสมปฏิกิริยา (วิธีข้อ 2.7.1) ที่ช่วงอุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาต่างๆกันตั้งแต่ 25-55 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์

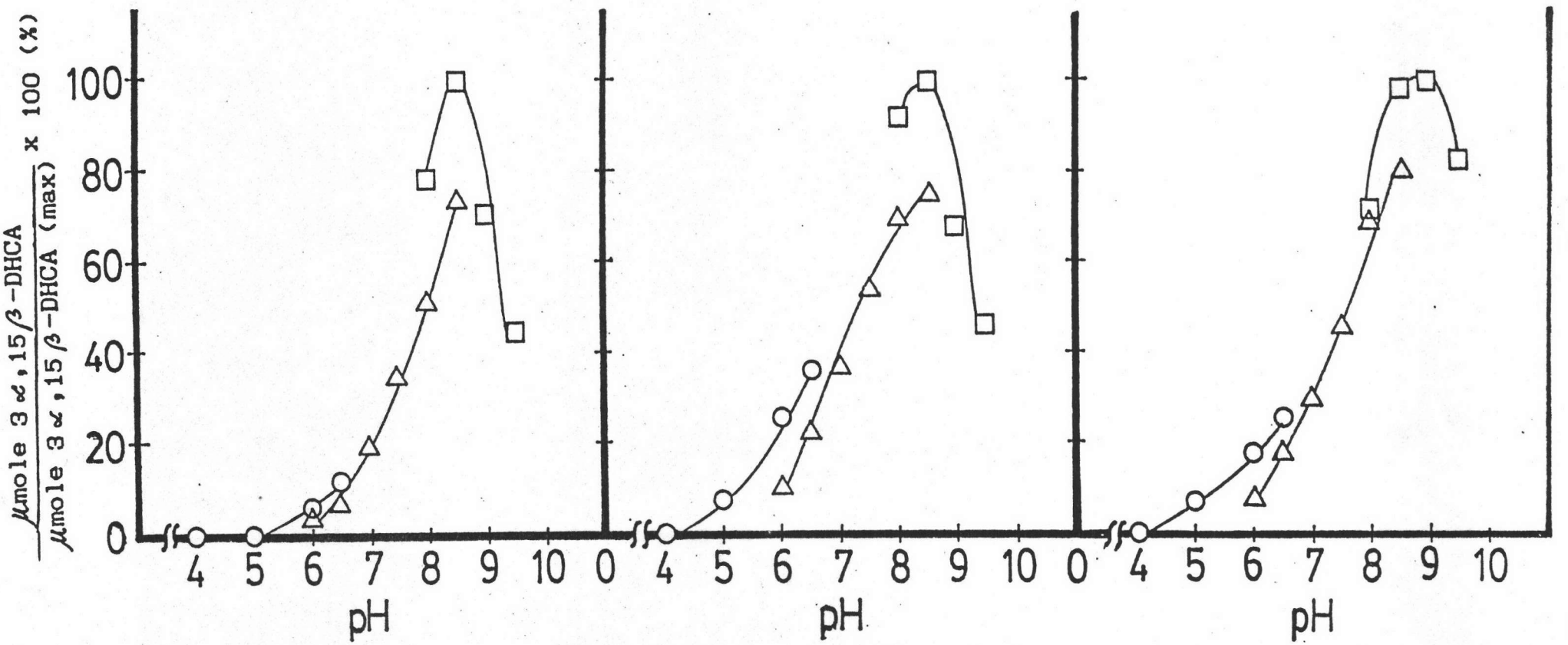
รูปที่ 34 การแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β -DHC ในสารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช ต่างๆคือ พีเอช 4.0-6.5 (อะซีเตตบัฟเฟอร์, ○) พีเอช 6.0-8.5 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, △) พีเอช 8.0-9.5 (ทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์, □) ที่อุณหภูมิ 34 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วิธีข้อ 2.7) โดย

ก. สายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22

ข. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako

ค. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Copenhgen Pectin

รูปที่ 34 ก



รูปที่ 34 ข

รูปที่ 34 ค

หาปริมาณผลิตภัณฑ์(วิธีข้อ 2.7) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 35 พบว่า เอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระและสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิดสามารถเร่งปฏิกิริยาการแปรรูป LCA ได้ดีในช่วงอุณหภูมิใกล้เคียงกันคือ ประมาณ 34-38 °ซ

3.7.3 ผลกระทบของ พีเอช ต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่แปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC (pH stability)

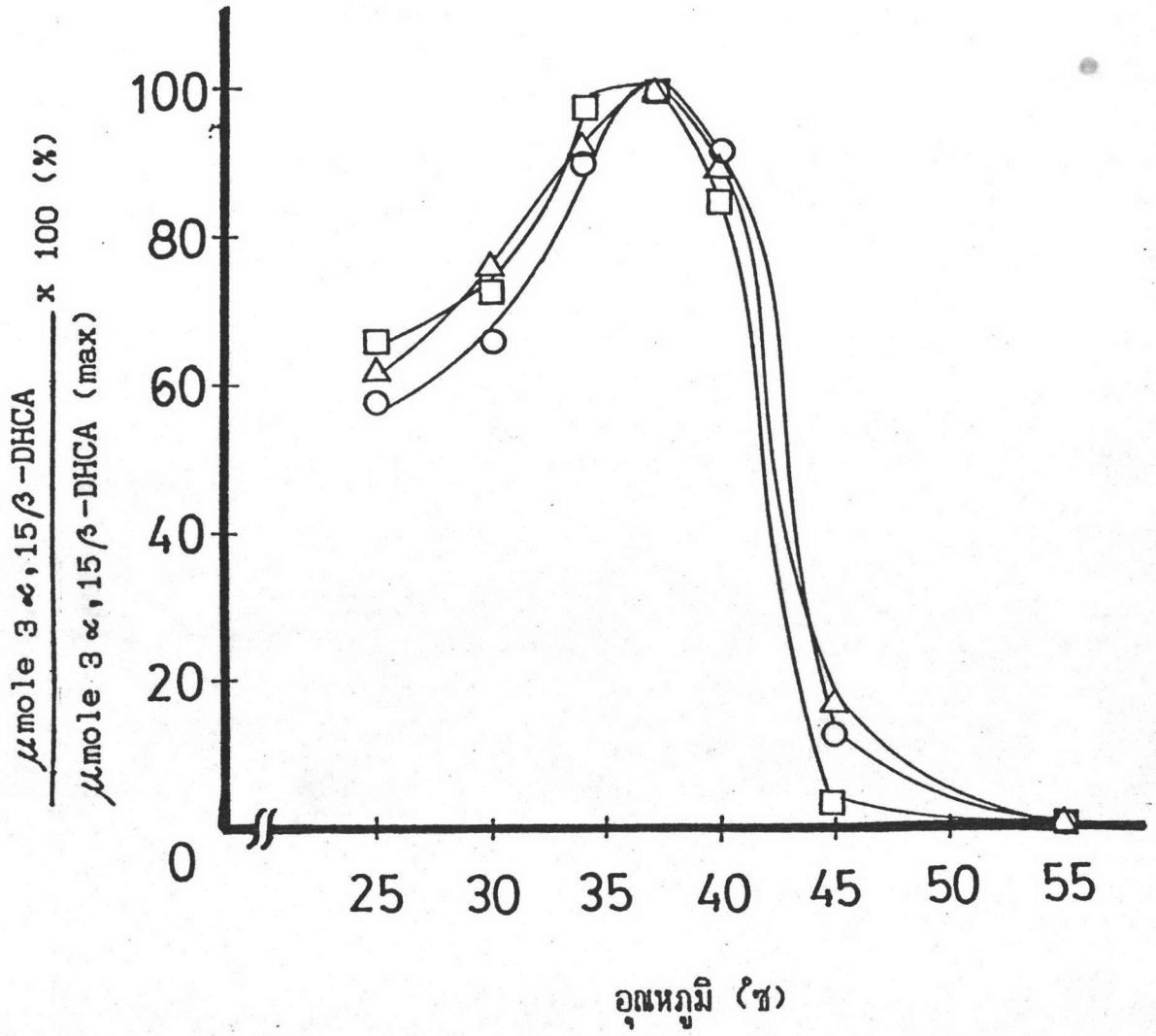
นำสายใยจากสปอร์อิสระของ C.blakesleeana ST-22 และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด มาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า พีเอช แตกต่างกันตั้งแต่ 4.0-9.5 (พีเอช 4.0-6.5 ใช้สารละลาย 0.1 โมลาร์อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0-8.5 ใช้สารละลาย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และพีเอช 8.0-9.5 ใช้สารละลาย 0.1 โมลาร์ทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์) ให้อัตราส่วนของสายใยอิสระและเม็ดเจล (รวมสายใย) ต่อบัฟเฟอร์เป็น 1:5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC และวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ (วิธีข้อ 2.7) พบว่าเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ที่ได้จากสายใยอิสระจะมีความเสถียรต่อ พีเอช 8.0-8.5 ได้ดี ส่วนเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin จะมีความเสถียรต่อ พีเอช เมื่อแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง พีเอช ที่ต่ำกว่า คือ 6.5-7.5 และ 6.5-8.0 ตามลำดับ ดังรูปที่ 36

3.7.4 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่แปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC (thermal stability)

3.7.4.1 เมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดที่มี 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์

นำสายใยจากสปอร์ C.blakesleeana ST-22 อิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด มาแช่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ และสารละลาย 0.1 โมลาร์ทริส-กรดไฮโดรคลอริก พีเอช 8.4 ผสม 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4, 30, 34, 50 และ 60 °ซ เป็นเวลานานต่างๆกัน (0-24 ชั่วโมง) จากนั้นทำการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC และวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ (วิธีข้อ 2.7) พบว่าแอคติวิตี

□ สายใยอิสระ
○ สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Wako
△ สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhagen Pectin



รูปที่ 35 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิ ต่อปฏิกิริยาการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3∝,15β-DHC โดยสายใยของ C.blakesleeana ST-22 เมื่ออยู่ในสารละลายทริส-กรดไฮโดรคลอริกพีเอช 8.4 ความเข้มข้นกรดลิโทโคลิก 2 กรัมต่อลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีนาน 24 ชั่วโมง (วิธีข้อ 2.7)

รูปที่ 36 ผลของ พีเอช ต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่แปรรูปกรดลิโทโคลิก เป็นกรด กรด 3α,15β-DHC เมื่อใช้

ก. สายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22

ข. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Wako

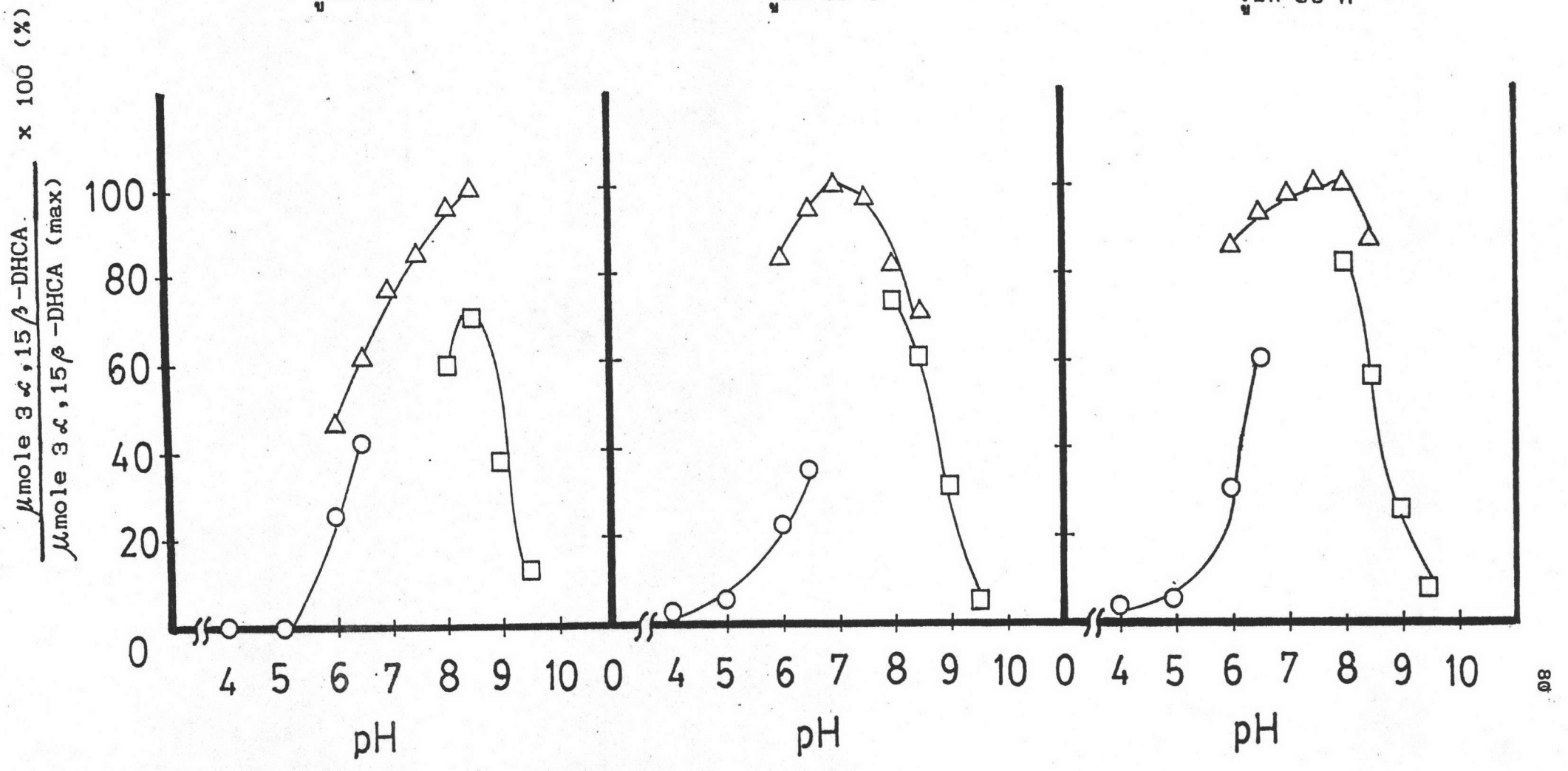
ค. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhagen Pectin

แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช ต่างๆกันคือ พีเอช 4.0-6.5 (อะซีเตตบัฟเฟอร์, ○) พีเอช 6.0-8.5 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, △) พีเอช 8.0-9.5 (ทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์, □) เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °ซ แล้วนำมาแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นผลิตภัณฑ์ (วิธีข้อ 2.7)

รูปที่ 36 ก

รูปที่ 36 ข

รูปที่ 36 ค



ของเอนไซม์ที่สามารถแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด จะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 4 °ซ ได้ดีที่สุดคือเกือบไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีไปเลยในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ว่าจะอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดใดก็ตาม เอนไซม์ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 30, 34 และ 40 °ซ ได้ดีกว่าสายใยอิสระ ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ และสารละลาย 0.1 โมลาร์ทริส-กรดไฮโดรคลอริก พีเอช 8.4 ที่ผสม 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์อย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็น 50 และ 60 °ซ ความเสถียรของเอนไซม์ในสายใยอิสระและสายใยในเม็ดเจลจะไม่มีค่าแตกต่างกันอย่างชัดเจนนัก (รูปที่ 37 และ 38)

3.7.4.2 เมื่ออยู่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ทริส-กรดไฮโดรคลอริก พีเอช 8.4 ผสม 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ ที่มีและไม่มีกรดลิโทโคลิก

นำสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด มาแช่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ทริส-กรดไฮโดรคลอริก พีเอช 8.4 ที่มี 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ และในสารละลายดังกล่าวเมื่อมี LCA ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร (สารผสมปฏิกิริยา วิธีข้อ 2.7.1) ที่อุณหภูมิ 4, 34 และ 40 °ซ เป็นเวลานานต่างๆกัน จากนั้นนำมาแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ตามวิธีข้อ 2.7 จากผลการทดลองรูปที่ 39 พบว่า เอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ในสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin เมื่ออยู่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ทริส-กรดไฮโดรคลอริกผสม 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ ที่มีและไม่มี LCA อยู่ด้วย ที่อุณหภูมิต่างๆนั้น มีความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ของสายใยในเม็ดเจลก็ให้แนวโน้มว่า จะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ในสายใยอิสระ ในสารละลายที่มี LCA อยู่ด้วย

3.7.5 ผลกระทบของความเข้มข้นกรดลิโทโคลิกต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC

วัดปริมาณกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด เปรียบเทียบกับสายใยอิสระ โดยแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น คือ LCA ตั้งแต่ 0.1 ถึง 5.0 กรัมต่อลิตรของสารผสมปฏิกิริยา เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที

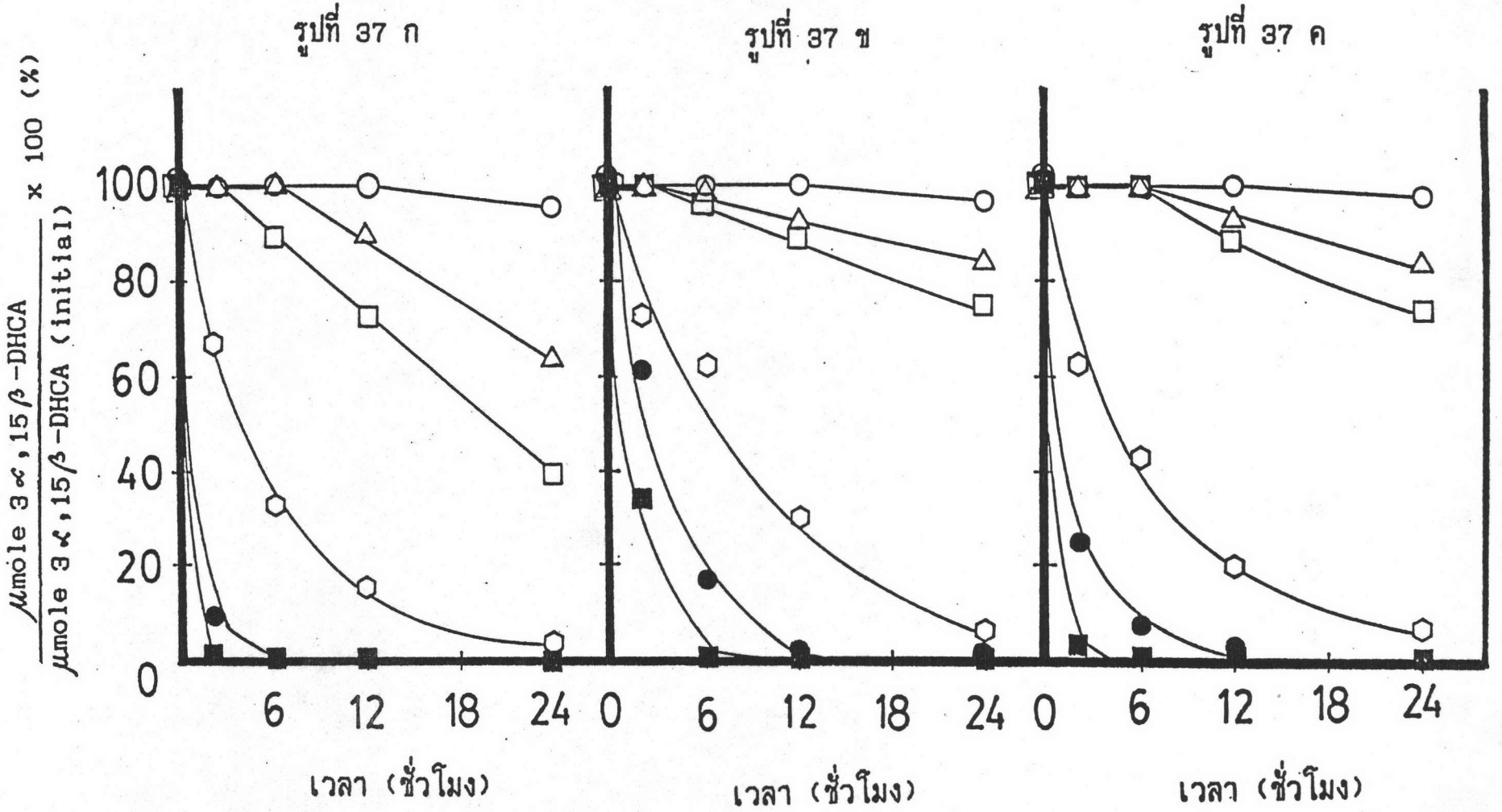
รูปที่ 37 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิ 4 °ซ (○), 30 °ซ (△), 34 °ซ (□), 40 °ซ (⬡), 50 °ซ (●) และ 60 °ซ (■) ต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของ

ก. สายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22

ข. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako

ค. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Copenhagen Pectin

เมื่อแช่ในสารละลาย 0.1โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ที่มี 0.3โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ เป็นเวลาต่างๆกัน


รูปที่ 37 ก
รูปที่ 37 ข
รูปที่ 37 ค
μmole 3∝,15β-DHCA / μmole 3∝,15β-DHCA (initial) x 100 (%)
100
80
60
40
20
0
0
6
12
18
24
เวลา (ชั่วโมง)

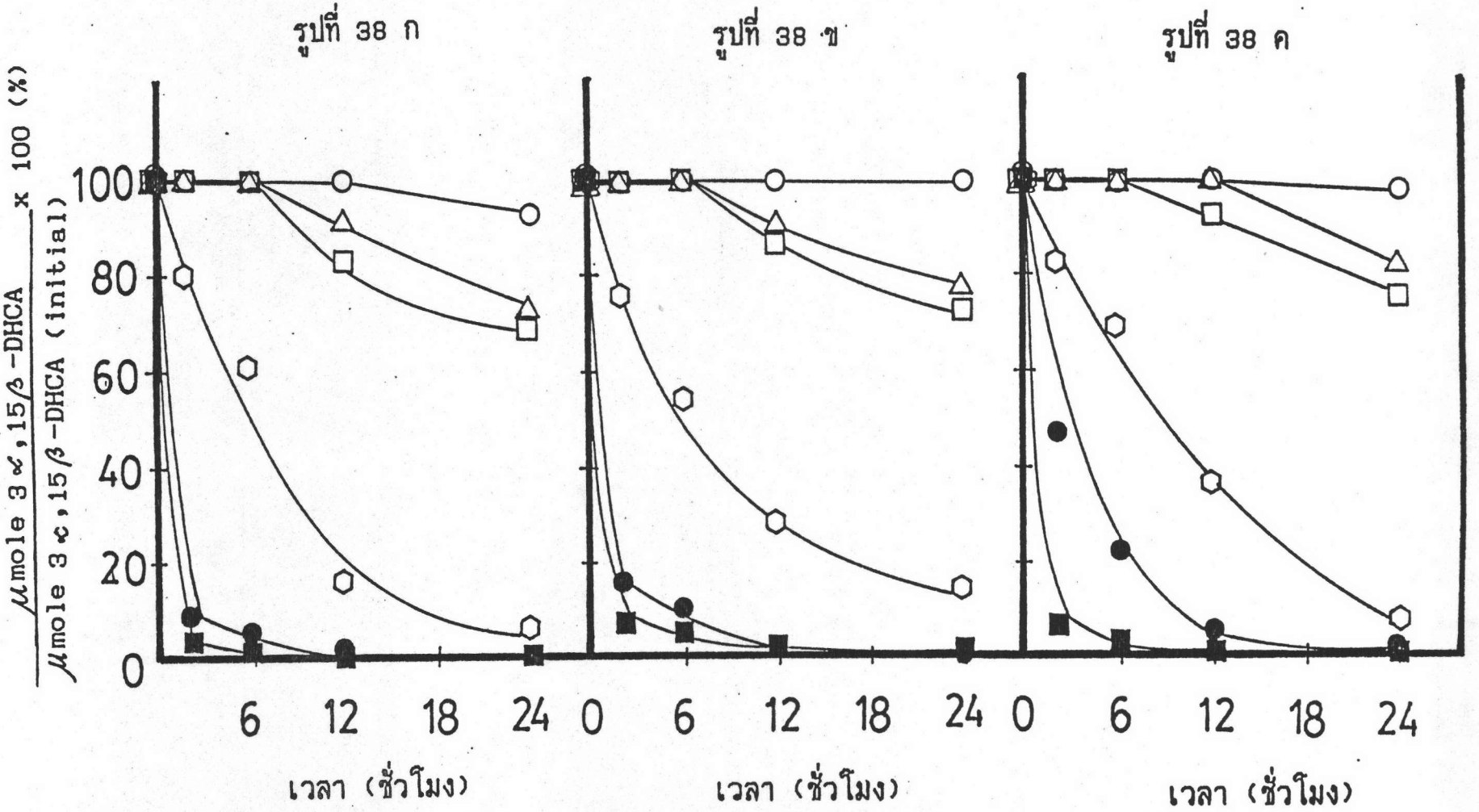
รูปที่ 38 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิ 4 °ซ (○), 30 °ซ (△), 34 °ซ (□), 40 °ซ (⬡), 50 °ซ (●) และ 60 °ซ (■) ต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3 α,15 β-DHC ของ

ก. สายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22

ข. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako

ค. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Copenhagen Pectin

เมื่อแช่ในสารละลาย 0.1โมลาร์ทริส-กรดไฮโดรคลอริกพีเอช 8.4 ที่มี 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ เป็นเวลาต่างๆกัน


รูปที่ 38 ก
รูปที่ 38 ข
รูปที่ 38 ค
μmole 3α,15β-DHCA / μmole 3α,15β-DHCA (initial) x 100 (%)
100
80
60
40
20
0
6
12
18
24
เวลา (ชั่วโมง)

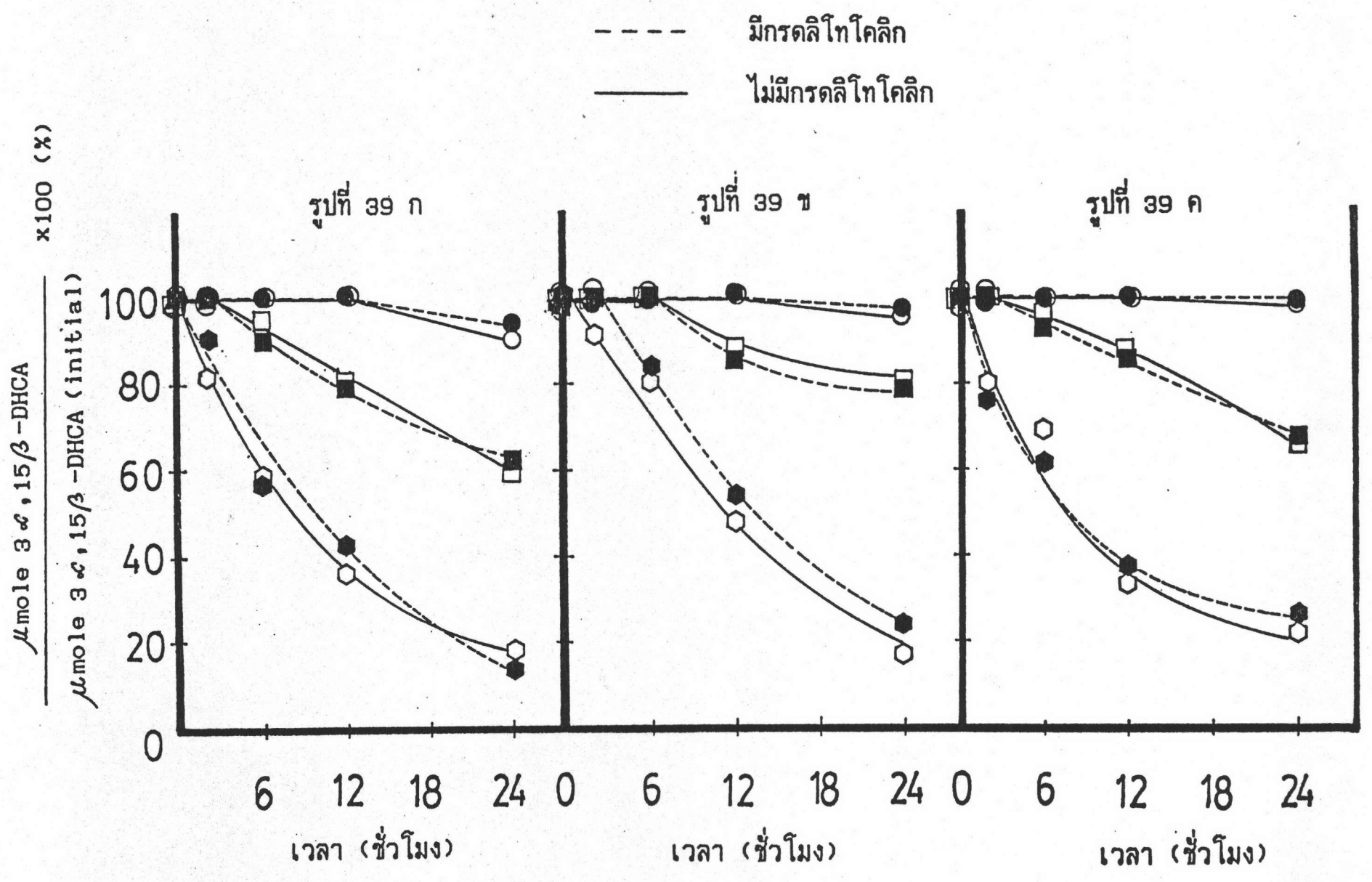
รูปที่ 39 ผลกระทบของกรดลิโทโคลิกต่อความเสถียรของเอนไซม์ ในปฏิกิริยาการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของ

ก. สายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22

ข. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Wako

ค. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhagen Pectin

เมื่อแช่อยู่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ทริส-กรดไฮโดรคลอริก พีเอช 8.4 ผสม 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4 °ซ(○), 34 °ซ(□)และ 40 °ซ(⬡) และในสารผสมปฏิกิริยา(วิธีข้อ 2.7.1) ผสม 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4 °ซ(●), 34 °ซ(■), และ 40 °ซ (⬢) เป็นเวลาต่างๆกัน


มีกรดลิโทโคลิก
ไม่มีกรดลิโทโคลิก
รูปที่ 39 ก
รูปที่ 39 ข
รูปที่ 39 ค
μmole 3α,15β-DHCA / μmole 3α,15β-DHCA (initial) x100 (%)
100
80
60
40
20
0
6
12
18
24
เวลา (ชั่วโมง)

ที่อุณหภูมิ 34 °ซ นาน 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ (วิธีข้อ 2.7) พบว่าเมื่อนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของ LCA ต่อส่วนกลับของแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC จากสายใยอิสระ เปรียบเทียบกับสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด โดย Line-weaver Burk Plot มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 40 ซึ่งเมื่อคำนวณค่า K_m ของเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC จากสายใยอิสระ สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin ไม่แตกต่างกันมากนัก มีค่าเท่ากับ 2.0, 1.54 และ 1.67 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

3.8 สภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาสปอร์อิสระของ C.blakesleeana ST-22

นำสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ความเข้มข้น 1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่กระจายในนอร์มอลซาลีน (วิธีข้อ 2.4.3) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นระยะเวลานานต่างๆกัน (98 วัน) มางอกเป็นสายใย (วิธีข้อ 2.4.3) แล้วทำการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC(วิธีข้อ 2.7.2) และวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้(วิธีข้อ 2.7.3) พบว่าเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใย C.blakesleeana ST-22 เมื่อเก็บสปอร์ในนอร์มอลซาลีน อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลานาน 70 วัน ไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เลย หลังจากนั้นจึงเริ่มสูญเสียความสามารถในการงอกและการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์กรด 3α,15β-DHC ไปบ้าง และจะยังคงมีประสิทธิภาพของการงอกและการแปรรูปถึง 60 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บไว้ในสภาวะนี้นานถึง 98 วัน (รูปที่ 41)

3.9 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล

ตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ความเข้มข้น 1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin ความเข้มข้น 3.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ (วิธีข้อ 2.5.2.2) นำเม็ดเจลสปอร์ตรึงที่ได้มางอกสายใย (วิธีข้อ 2.4.3) แล้วนำมาแช่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 สารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ และสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และอุณหภูมิห้อง (25-32 °ซ) นำสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-

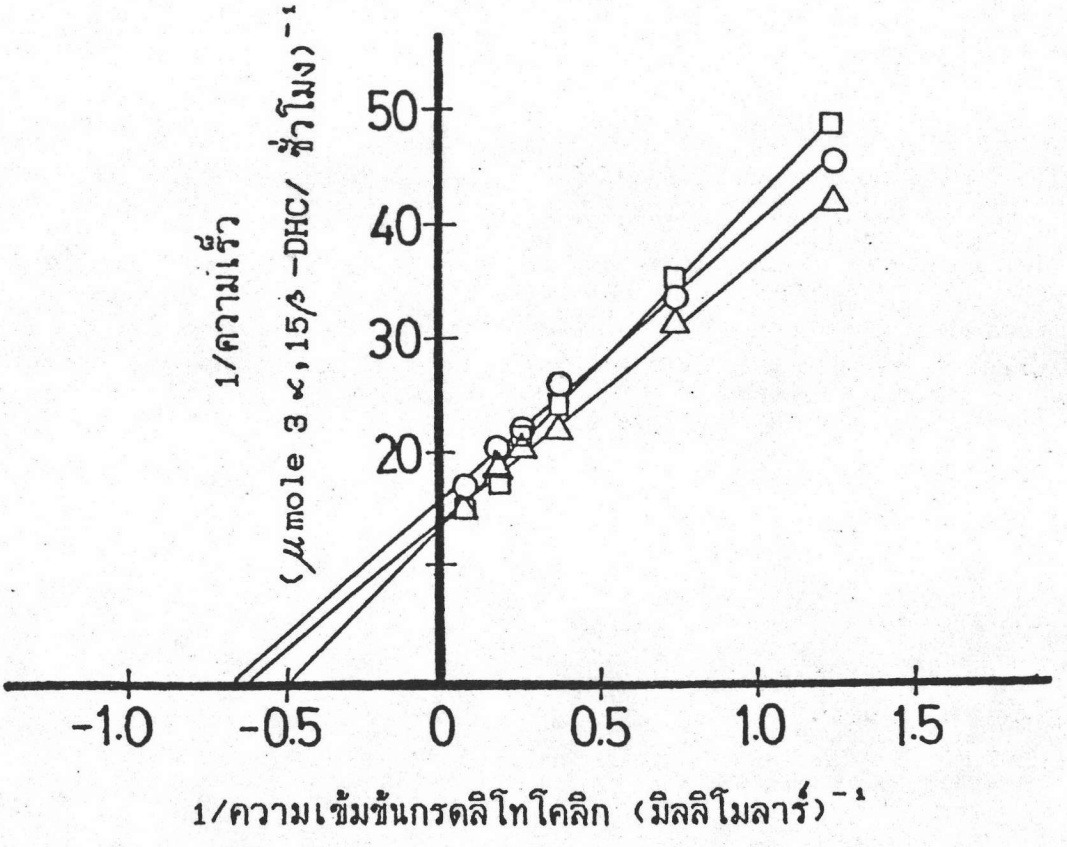
รูปที่ 40 Lineweaver-Burk Plot ของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3 α ,15β -DHC โดยสายใยของ C.blakesleeana ST-22 ในสารผสมปฏิกิริยา 20 มิลลิลิตร ที่มี 0.3 โมลาร์ โพแตสเซียมคลอไรด์ อุณหภูมิ 34 °ซ โดยใช้ปริมาณกรดลิโทโคลิกแตกต่างกัน ตั้งแต่ 0.8-13.5 มิลลิโมลาร์ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง

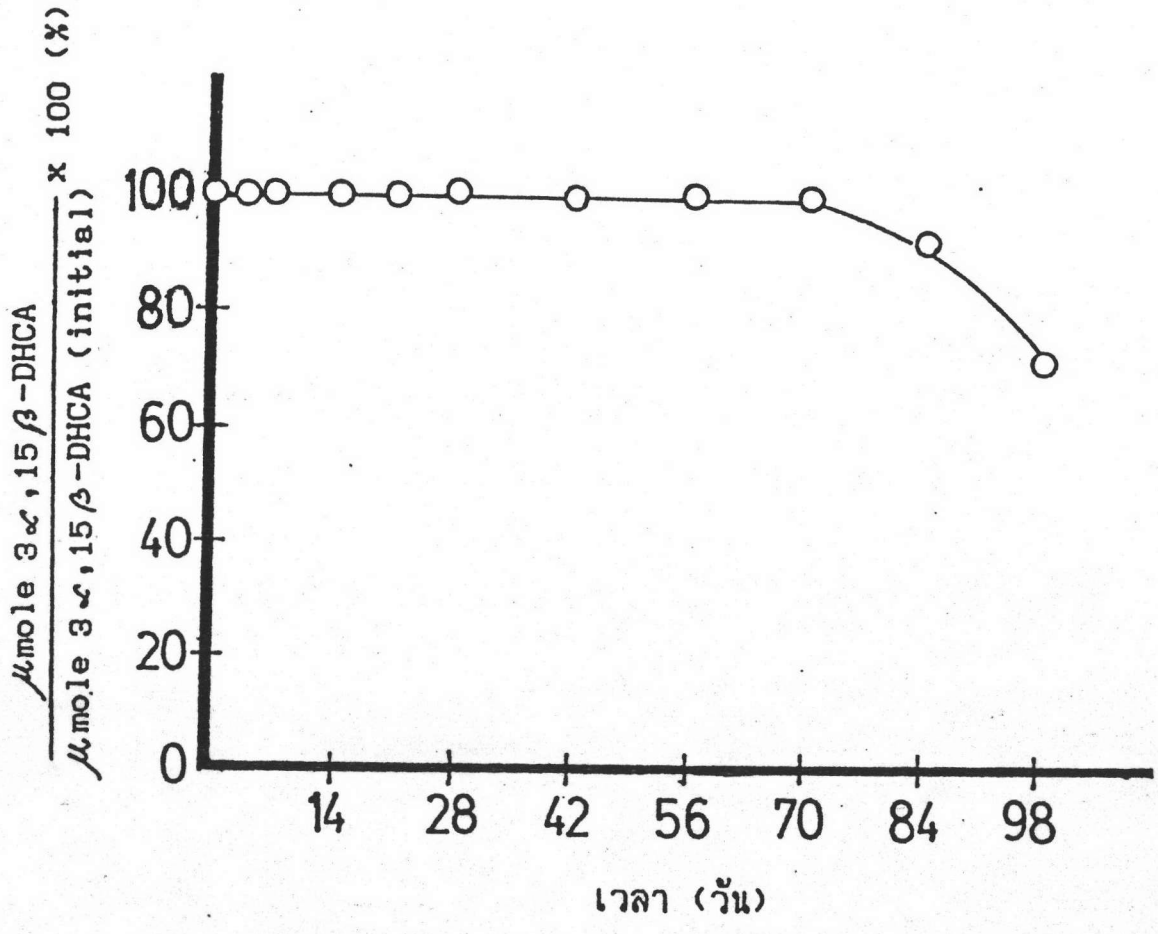
□ สายใยอิสระ

○ สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Wako

△ สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhagen Pectin

	K_m (มิลลิโมลาร์)	V_{max} (ไมโครโมลต่อชั่วโมง)
สายใยอิสระ	2.00	0.074
สายใยในเม็ดคาร์ราจีแนนเจล บริษัท Wako	1.54	0.066
สายใยในเม็ดคาร์ราจีแนนเจล บริษัท Copenhagen Pectin	1.67	0.071





รูปที่ 41 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3∝,15β-DHC โดยสายใยของ C.blakesleeana ST-22 เมื่อเก็บรักษาสปอร์อิสระในสารละลายนอร์มอลซาลีน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นระยะเวลาต่างๆกัน

คาร์ราจีแนนเจลไปทำการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC (วิธีข้อ 2.7) พบว่าเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระและสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวได้ดีที่สุด เมื่ออยู่ในสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ในสายใยของเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด จะเห็นได้ว่าเปอร์เซนต์การแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC มีค่าใกล้เคียงกัน และมีความเสถียรสูงกว่าเอนไซม์ในสายใยอิสระ ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในช่วงเวลาเดียวกันอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ความเสถียรของเอนไซม์เมื่อเก็บรักษาไว้ในสารละลายทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิห้อง (25-32 °ซ) จะไม่ให้ความแตกต่างของความเสถียรมากนัก อย่างไรก็ตามการมีสารละลายบัฟเฟอร์อยู่ด้วยจะให้ค่าความเสถียรของเอนไซม์ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ หรือ อุณหภูมิห้องสูงกว่าเมื่อเก็บรักษาไว้ใน 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 42)

3.10 <u>การศึกษาความเป็นไปได้ของการนำสายใยของ C.blakesleeana ST-22 ตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนมาใช้แปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ซ้ำหลายๆครั้ง</u>

เตรียมสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนตามวิธีข้อ 2.5.2.2 โดยใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และ Copenhagen Pectin ความเข้มข้น 3.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ และสปอร์อิสระความเข้มข้น 1.25×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มางอกเป็นสายใย (วิธีข้อ 2.4.3) นำสายใยในเม็ดเจลและสายใยอิสระมาแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC (วิธีข้อ 2.7.2) หลังจากนั้นล้างสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล และสายใยอิสระที่ใช้นี้ด้วย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แล้วนำมาแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC อีกในสภาวะเช่นเดิม ทำเช่นนี้เป็นจำนวนทั้งหมด 10 ครั้ง วิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ (วิธีข้อ 2.7.3) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 43 จะเห็นได้ว่าความสามารถของเอนไซม์ในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC จะค่อยๆลดลงในแต่ละครั้งที่นำสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลมาใช้ใหม่ และการลดความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิดจะมีค่าใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามเปอร์เซนต์

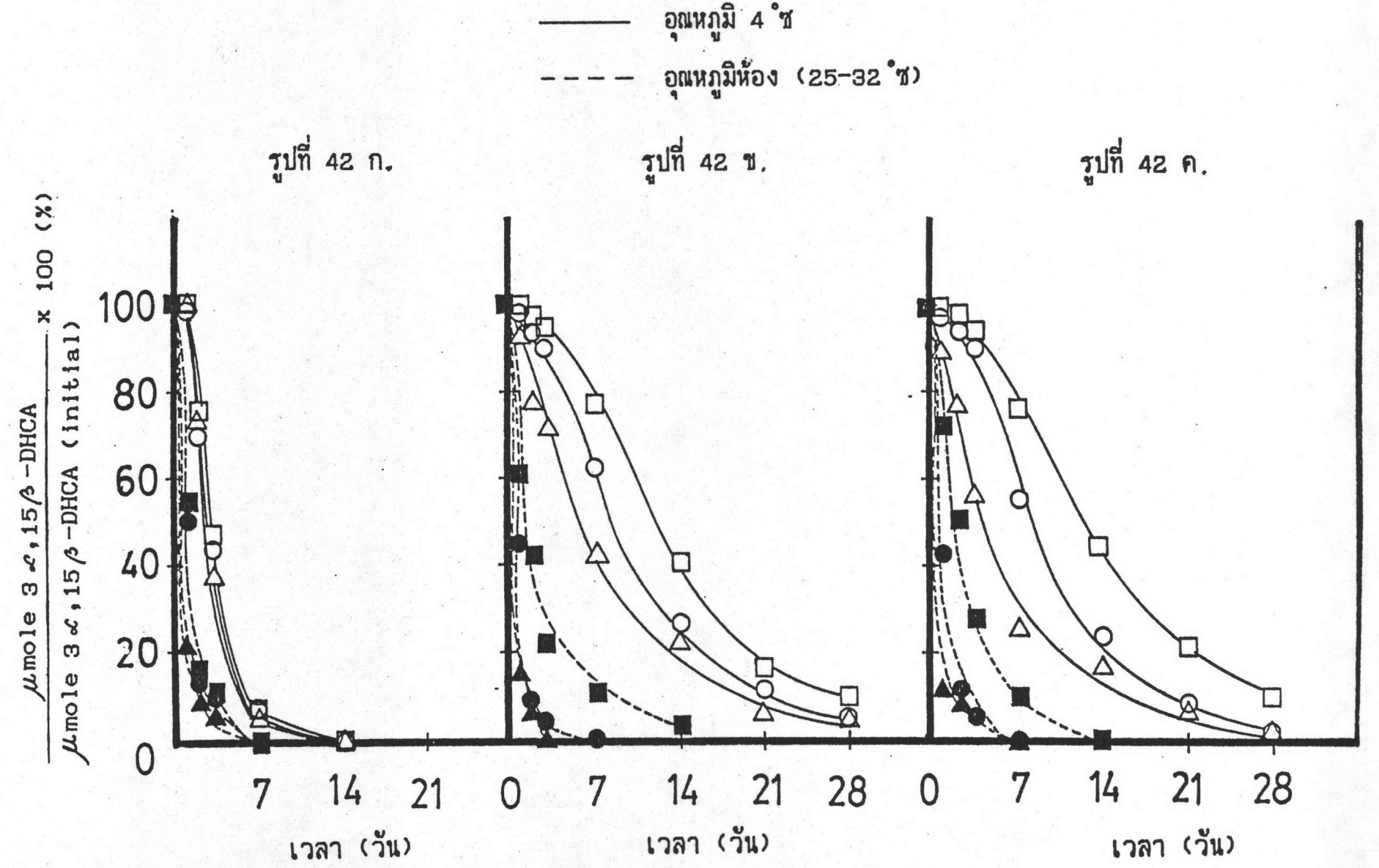
รูปที่ 42 เปรียบเทียบความเสถียรของการแปรรูปกรดลิโทโคลิก เป็นกรด 3α,15β-DHC ที่ได้จาก

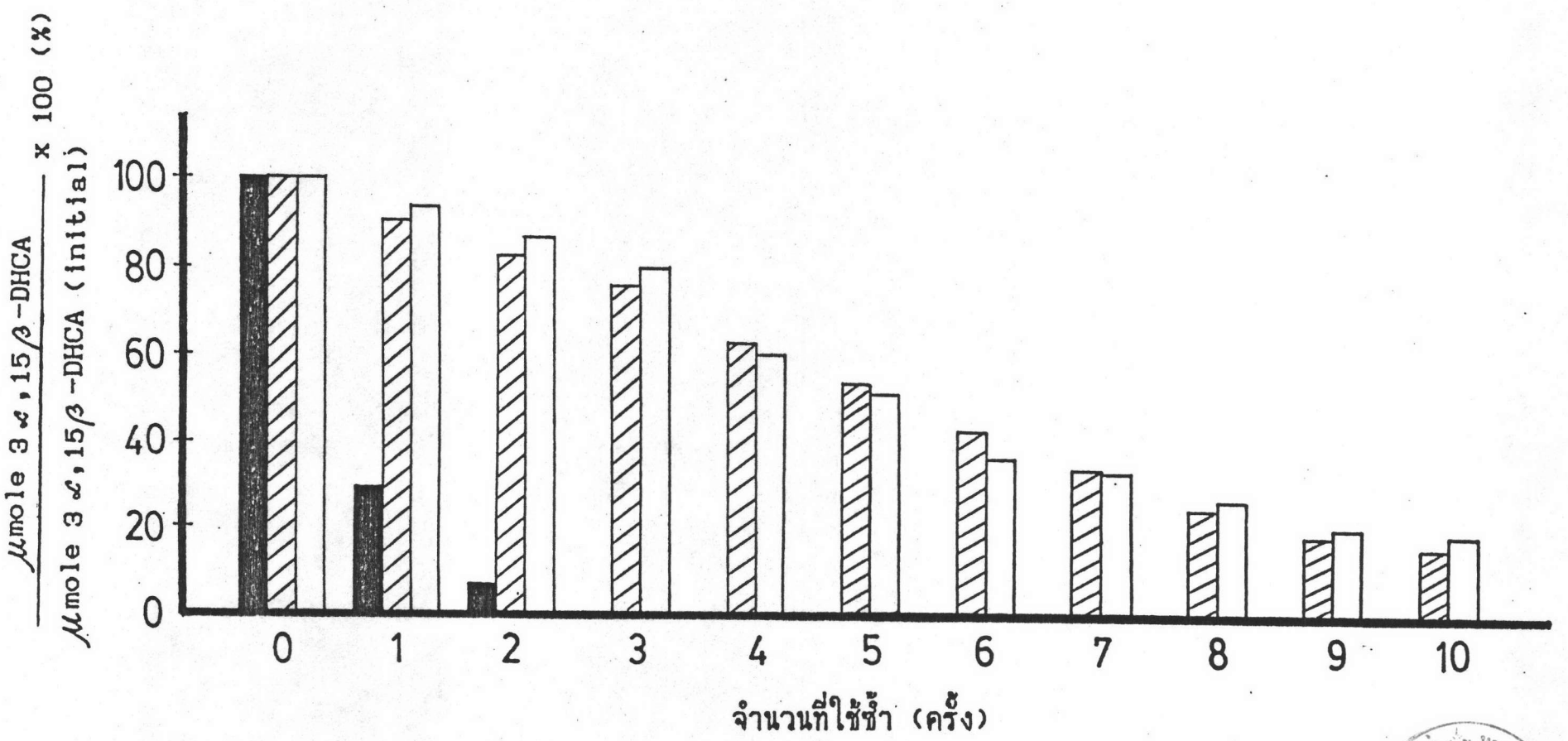
ก. สายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22

ข. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Wako

ค. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhagen Pectin

เมื่อเก็บรักษาไว้ในสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ อุณหภูมิ 4 °ซ (○) 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ อุณหภูมิห้อง (●) 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 °ซ (△) 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 อุณหภูมิห้อง (▲) 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ผสม 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4 °ซ (□) และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ผสม 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ อุณหภูมิห้อง (■) ในช่วงเวลาต่างๆกัน


อุณหภูมิ 4 °ซ
อุณหภูมิห้อง (25-32 °ซ)
รูปที่ 42 ก.
รูปที่ 42 ข.
รูปที่ 42 ค.
μmole 3α,15β-DHCA / μmole 3α,15β-DHCA (initial) x 100 (%)
100
80
60
40
20
0
7
14
21
0
7
14
21
28
0
7
14
21
28
เวลา (วัน)
เวลา (วัน)
เวลา (วัน)



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 43 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3∝,15β-DHC โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako (▨) และบริษัท Copenhagen Pectin (□) เทียบกับสายใยอิสระ (■) เมื่อนำมาใช้แปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นผลิตภัณฑ์ซ้ำใหม่ในสารผสมปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องกัน 10 ครั้ง (วิธีข้อ 2.7.1)

การแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้งสองชนิด จะมีค่าสูงกว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในสายใยอิสระถึง 3 เท่า ในการใช้ซ้ำครั้งที่ 1 และ 16 เท่าในการใช้ซ้ำครั้งที่ 2 และไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ในสายใยอิสระเลยเมื่อใช้แปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ซ้ำเป็นครั้งที่ 3 ในขณะที่สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้งสองชนิดสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ใหม่หลายครั้ง(อย่างน้อย 10 ครั้ง)อย่างต่อเนื่อง โดยที่ยังคงเหลือแอคติวิตีในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ประมาณ 20 เปอร์เซนต์

3.11 <u>การศึกษาศักยภาพของการนำกลับมาใช้ซ้ำของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลเมื่อกระตุ้นด้วยสารอาหาร</u>

เตรียมสปอร์ตริงแคปปา-คาร์ราจีแนนตามวิธีข้อ 2.5.2.2 ใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin ความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ นำมางอกสายใย(วิธีข้อ 2.4.3) แล้วให้แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC (วิธีข้อ 2.7.2) หลังจากนั้นล้างเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลซึ่งงอกสายใยแล้วด้วย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร 3 ครั้ง นำมาแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ซ้ำในสภาวะเช่นเดิมอีก 2 ครั้ง แล้วจึงนำสายใยในเม็ดเจลและใช้แปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์แล้ว 3 ครั้งนี้ มาเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย (วิธีข้อ 2.3.2) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำมาแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC อีก (วิธีข้อ 2.7.2) ทำเช่นนี้ 5 ครั้ง พบว่า อาหารสูตรที่ใช้นี้สามารถกระตุ้นแอคติวิตีของสายใยในเม็ดเจลให้กลับมีแอคติวิตีในการทำงานเพิ่มขึ้นได้ 2 ครั้ง (ในการใช้แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ครั้งที่ 4 และ 5) หลังจากนั้นสารอาหารดังกล่าวจะไม่มีผลในการกระตุ้นแอคติวิตีของสายใยในเม็ดเจลอีก ทำให้การแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด ที่กระตุ้นและไม่ได้กระตุ้นด้วยอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใยมีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 44) เป็นการยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่า ค่าความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจะมีความคงตัวสูงกว่าสายใยอิสระ และยิ่งหากได้รับการกระตุ้นด้วยสารอาหารที่เหมาะสมแล้ว จะสามารถนำสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลกลับมาใช้ได้นานกว่า 8 ครั้ง โดยที่ยังมีแอคติวิตีเหลือกว่า 30 เปอร์เซนต์

รูปที่ 44 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการแปรรูปกรดลิโทโคลิก เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล เมื่อใช้ซ้ำกันอย่างต่อเนื่อง โดยมีอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใยเป็นสารกระตุ้น ดังรายละเอียดข้อ 3.11

ก. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Wako

ข. สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhagen Pectin

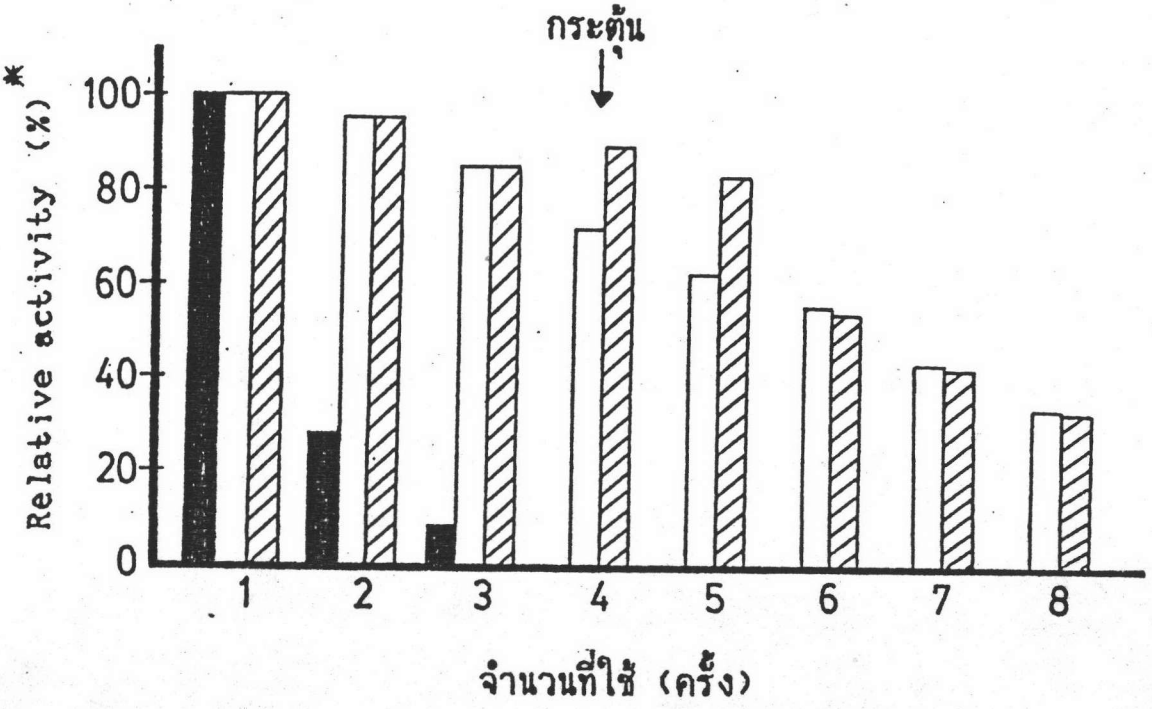
$$\text{*Relative activity} = \frac{\mu\text{mole } 3\alpha,15\beta\text{-DHCA}}{\mu\text{mole } 3\alpha,15\beta\text{-DHCA (initial)}} \times 100\ (\%)$$

■ สายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22

□ ไม่กระตุ้นด้วยสารอาหารสำหรับสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล

▨ กระตุ้นด้วยสารอาหารสำหรับสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล

รูปที่ 44 ก



รูปที่ 44 ข