บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated centrifuge) Kubota KR-20000T บริษัท Kubota, Japan

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้

Psycrotherm incubator shaker model G-27 New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., U.S.A.

Psycrotherm incubator shaker type KF-4 No.86129 Infors AG Rittergasse 27 CH-4103 Bottmingen, Swiss

Incubator shaker model G-25 New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., U.S.A.

Aquartherm water bath shaker model G-86 New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., U.S.A.

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

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) model HA-26 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Laboratory Hot Plate PC-101 Corning Glass Works, Corning, N.Y.14830, U.S.A.

เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสูญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) พร้อมอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) Eyela-SB-35 บริษัท Tokyo Rikakikai

Co. Ltd., Japan

เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Sonicator) Sonicator model W.375 Heat Systems Ultrasonics, Inc., U.S.A.

เครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography) Hitachi 163 บริษัท Hitachi Ltd., Tokyo, Japan

เครื่องเขย่า (Vortex) Vortex-Genie No.16824 Scientific Industries, Inc. Bohemia, N.Y.11716, U.S.A.

กล้องจุลทรรศน์ Nikon UFX-II และกล้องถ่ายรูป Nikon FX-35A, Nikon, Inc., Instrument Division Garden City, N.Y., U.S.A.

2.1.2 <u>สารเคมี</u>

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. เด็กซ์ตริน (Dextrin)	Nakarai Chemicals Ltd., Japan
2. แอสพาราจีน (Asparagine)	Nakarai Chemicals Ltd., Japan
3. ทวีน 80 (Tween 80)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
4. กรดลิโทโคลิก (Lithocholic acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
5. แคปปา-คาร์ราจีแนน (Kappa-carrageenan)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan Sigma Chemicals Co., U.S.A. Genugel type X-3441, Copenhagen Pectin, Denmark
6. นอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต (N-Butylacetate)	B.D.H. Chemicals Ltd., England

013914

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
7. กรดดีออกซีโคลิก (Deoxycholic acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
8. สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde; 25%aqueous)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
9. เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (Hexamethylenediamine)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
10. เฮกซาฟลูออโรไอโซโพรพานอล (1,1,1,3,3,3,-Hexafluoro-2-propanol)	E. Merck Damstadt, Germany
11. กรดไตรฟลูออโรอะซีติก แอนไฮดรายด์ (Trifluoroacetic acid anhydride)	E. Merck Damstadt, Germany
12. อะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile)	E. Merck Damstadt, Germany

สารเคมีอื่นๆที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemicals Co., สหรัฐอเมริกา บริษัท B.D.H. ประเทศอังกฤษ บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ เป็นต้น

2.2 <u>เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

เชื้อรา <u>Cunninghamella blakesleeana</u> ST-22 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ส่งศรี กุลปรีชา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นสายพันธุ์ซึ่งสามารถผลิตสารที่ใช้ละลายนิ่วโคเลสเตอรอลได้ (Kulpreecha และคณะ, 1984)

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อรา Cunninghamella blakesleeana ST-22

2.3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อและเพิ่มปริมาณสปอร์ โพเตโต เด็กซ์โตรสอการ์ (Potato dextrose agar) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม (ต้มให้เดือดแล้วกรองเอาเฉพาะน้ำใส)
เด็กซ์โตรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย เจอมิเนชั่นมีเดียม (Germination medium) (Kulpreecha และคณะ, 1984) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

เด็กซ์ตริน	40	กรัม
แอสพาราจีน	12	กรัม
โพแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	3	กรัม
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSo_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.02	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSo_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.01	กรัม
โซเดียมโมลิบเดท ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.01	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSo_4.5H_2O$)	0.01	กรัม
กรดลิโทโคลิก (Lithocholic acid)	1	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างตามต้องการ ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ นำไปเข้าเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) (pulsed, 50% duty cycle, 5 micro tip limit) นาน 5 นาที ก่อนอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.4 วิธีการเก็บและการเลี้ยงเชื้อ Cunninghamella blakesleeana ST-22

2.4.1 การเก็บรักษาเชื้อ Cunninghamella blakesleeana ST-22

เชื้อสปอร์ของเชื้อ Cunninghamella blakesleeana ST-22 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โพเตโตเด็กซ์โตรสอการ์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว จึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 °ซ สามารถเก็บเชื้อไว้ได้นาน 1 ปี โดยที่ประสิทธิภาพการงอกสายใยของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง

2.4.2 การเพิ่มปริมาณสปอร์ (การเตรียมสปอร์)

ถ่ายเชื้อ Cunninghamella blakesleeana ST-22 จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2.4.1 ด้วยน้ำกลั่น ให้เป็นสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปกระจายลงบนผิวหน้าของอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรสอการ์ ในขวดแก้วขนาด 10x15x5 เซนติเมตร^3 บ่มที่อุณหภูมิ30 °ซ นาน 7 วัน หลังจากนั้นถ่ายสปอร์ออกจากขวดด้วยวิธีล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรแล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง นำส่วนใสที่ได้มาปั่นในเครื่องปั่น (Refrigerated centrifuge) ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 20 นาที นำตะกอนที่ได้มากระจายในนอร์มอลซาลีน (0.9 เปอร์เซนต์ โซเดียมคลอไรด์; 0.9% NaCl) นับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometer

2.4.3 การงอกเป็นสายใย (Germination of mycelium)

ถ่าย 2 มิลลิลิตรของสปอร์ความเข้มข้น $1.25x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรของเชื้อที่เตรียมแล้วตามวิธีข้อ 2.4.2 ลงใน 50 มิลลิลิตรของอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย ตามข้อ2.3.2 ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) หรือขวดรูปชมพู่ก้นบุบ (baffled flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบ Psycrotherm incubator shaker ที่อุณหภูมิ ความเร็ว และระยะเวลาตามที่เหมาะสมซึ่งใช้ในการทดลอง

2.5 วิธีการตรึงสปอร์ Cunninghamella blakesleeana ST-22 โดยใช้แคปปา-คาร์ราจีแนน (Kappa-carrageenan)

2.5.1 การเตรียมสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน

ละลายผงแคปปา-คาร์ราจีแนนในนอร์มอลซาลีน นำไปอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ

121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 70 °ซ เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.5.2 <u>การตรึงสปอร์</u> (spore immobilization) ทำได้ 2 วิธี ดังนี้

2.5.2.1 การตรึงสปอร์โดยวิธีหยดจากเข็มฉีดยา (syringe)

ดัดแปลงจากวิธีของ Wada และคณะ (Wada และคณะ, 1979)

ละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนในนอร์มอลซาลีน 8 มิลลิลิตร ให้ได้เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามต้องการ (วิธีข้อ2.5.1) เติมสปอร์ที่เตรียมแล้ว (วิธีข้อ 2.4.2) 2 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายที่ได้ลงในหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร ค่อยๆ หยดสารละลายเจลผ่านเข็มฉีดยาขนาด 21Gx1.5 (0.80x38 มิลลิเมตรต่อมิลลิเมตร) ลงใน 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่แช่อยู่ในน้ำแข็งและกวนอยู่ตลอดเวลาโดยใช้เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ด้วยความเร็วที่เหมาะสม จะได้สปอร์ตรึง (immobilized spores) ที่เป็นเม็ดเจล หลังจากนั้นแช่เม็ดเจลสปอร์ตรึงที่ได้ใน 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ อุณหภูมิ 4 °ซ อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำการศึกษาต่อไป

2.5.2.2 การตรึงสปอร์แบบ two phase system

ดัดแปลงจากวิธีของ Nilsson และคณะ (Nilsson และคณะ, 1983)

เตรียมสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนในนอร์มอลซาลีนให้ได้เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามต้องการ 16 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร (วิธีข้อ 2.5.1) นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50-55 °ซ และกวนอยู่ตลอดเวลานาน 10 วินาที ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก ที่ความเร็วเหมาะสม ผสมสปอร์ที่เตรียมแล้ว (วิธีข้อ 2.4.2) 4 มิลลิลิตรจนส่วนผสมเข้ากันดี เติมนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต (N-Butylacetate) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร อุณหภูมิประมาณ 50 °ซ กวนบนเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กต่อไปด้วยความเร็วเท่าเดิม นานประมาณ 10 วินาทีจนกระทั่งมองเห็นการเกิดเม็ดเจลอย่างสม่ำเสมอ เติมนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตตที่เย็น (อุณหภูมิต่ำกว่า 4 °ซ) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร กวนต่อไปอีก 20 วินาที จะได้สปอร์ตรึง (immobilized spores) ที่เป็นเม็ด ซึ่งส่วนใหญ่มีลักษณะรูปทรงกลม นำไปกรองผ่านผ้าขาวบาง ล้างด้วย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ที่เย็น (อุณหภูมิต่ำกว่า 10 °ซ) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เม็ดเจลสปอร์ตรึงที่ได้เก็บแช่ไว้ใน 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4 °ซ อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำการ

ทดลองขั้นต่อไป

2.6 วิธีวัดความแข็ง (strength) ของเม็ดเจลสปอร์ตริง

ความแข็งของเม็ดเจลสปอร์ตริงที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.5.2.1 และ 2.5.2.2 สามารถวัดได้ 2 วิธี คือ

2.6.1 ใช้มือจับ

ในการวัดทุกครั้งจะใช้ความเห็นของผู้ทดลองอย่างน้อย 3 คน ค่าความแข็งที่ได้เป็นค่าเปรียบเทียบกับเม็ดเจลมาตรฐาน

กำหนดความแข็งของเม็ดเจลมาตรฐาน เป็นความแข็งของเม็ดเจลที่เตรียมจากแคปปา-คาร์ราจีแนน บริษัท Wako Pure Chemical Industries, Ltd. ประเทศญี่ปุ่น ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อไม่มีสปอร์อยู่ด้วย มีค่าเป็น+5

2.6.2 ใช้เครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้นเพื่อวัดความแข็งของเม็ดเจล

2.6.2.1 ลักษณะและส่วนประกอบของเครื่องมือ

เครื่องมือมีลักษณะคล้ายตาชั่งแขนเดียวแบบสปริง ประกอบด้วยโลหะ 2 ส่วนที่สำคัญ คือ จานชั่งซึ่งเชื่อมต่อกับแท่งโลหะทรงกระบอกตัน (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.3 เซนติเมตร และความสูง 1.7 เซนติเมตร) ด้วยแกนโลหะ แท่งโลหะดังกล่าวสวมอยู่กับกระบอกแก้วกลวง (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.8 เซนติเมตร และความสูง 10.0 เซนติเมตร) ขนาดโตกว่าแท่งโลหะเล็กน้อย ทำให้สามารถขยับแท่งโลหะขึ้นลงได้สะดวกโดยไม่มีความฝืด (รูปที่ 5)

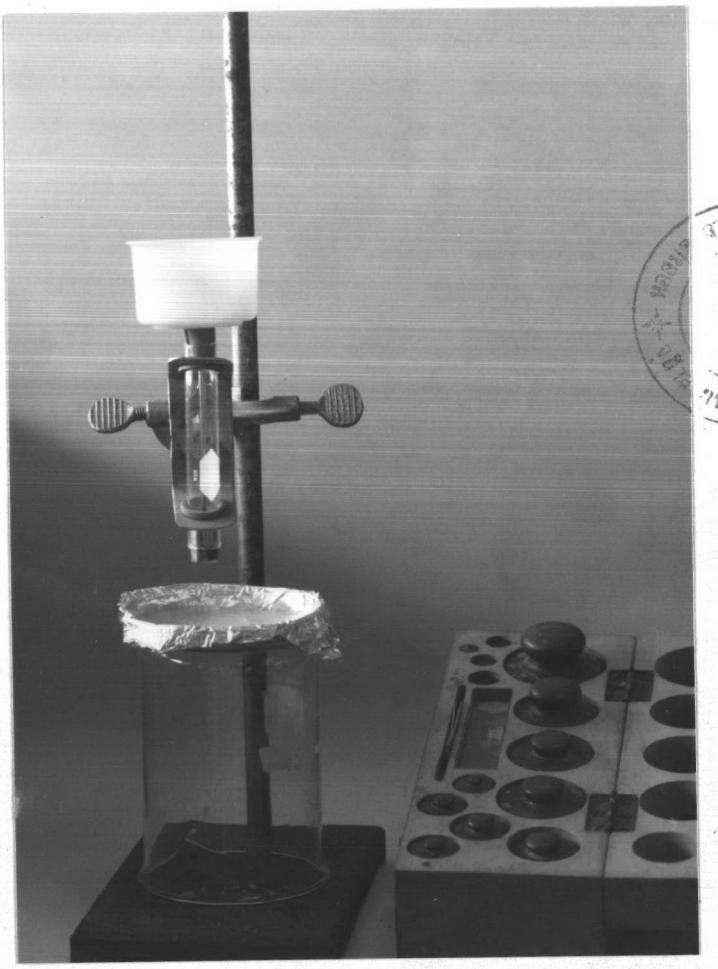
2.6.2.2 วิธีวัดและเปรียบเทียบความแข็งของเม็ดเจล

วางเม็ดเจลบนพื้นเรียบให้อยู่ที่ศูนย์กลางของแก้วทรงกระบอกกลวงซึ่งครอบอยู่ เลื่อนแท่งโลหะทรงกระบอกตันลงมาแตะกับผิวเม็ดเจล ใส่น้ำหนักบนจานชั่งโดยใช้เวลาแต่ละครั้งเท่ากัน (นาน 30 วินาที) แล้วสังเกตการแตกของเม็ดเจล บันทึกน้ำหนักบนจานชั่ง

2.6.2.3 วิธีรายงานความแข็งของเม็ดเจล

รายงานเป็นน้ำหนักต่ำที่สุดที่กดทับแล้วทำให้เม็ดเจลแตกปริ (ใช้ค่าเฉลี่ยของเม็ดเจลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร อย่างน้อย 10 เม็ด) โดยคำนวณค่าน้ำหนักที่เติมบนจานชั่งรวมกับน้ำหนักแท่งโลหะ ต่อพื้นที่หน้าตัดแท่งโลหะในหน่วยของ

รูปที่ 5 เครื่องมือวัดความแข็ง (strength) ของเม็ดเจลสปอร์ตรึง



กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

2.7 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ กรด 3 แอลฟา 15 เบตา-ไดไฮดรอกซี-5 เบตา -โคลานิก (กรด 3 α,15 β-DHC)

2.7.1 สารผสมปฏิกิริยา (Reaction mixture) (Kulpreecha และคณะ, 1984) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

0.1 โมลาร์ ทริส-กรดไฮโดรคลอริก พีเอช 8.4

ทวีน 80 1 มิลลิลิตร

กรดลิโทโคลิก 1, 2 หรือ 3 กรัม

ใช้เสียงจากเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) (pulsed, 50% duty cycle, 5 micro tip limit) ผ่านลงในสารผสมดังกล่าว นาน 5 นาที

2.7.2 การแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3 α,15 β-DHC โดยเชื้อรา Cunninghamella blakesleeana ST-22

นำสายใยของเชื้อราที่เตรียมได้ในข้อ 2.4.3 ประมาณ 4 กรัม มาใส่ลงในสารผสมปฏิกิริยา (ข้อ 2.7.1) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Aquatherm water bath shaker) ที่อุณหภูมิ 34 °ซ ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาต่างๆกันตามความเหมาะสม

2.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรด 3 α,15 β-DHC

ปรับความเป็นกรดด่างของสารละลายจากปฏิกิริยาในข้อ 2.7.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรให้มี พีเอช เป็น 2-3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4.0 โมลาร์ เติมสารละลายมาตรฐาน กรดดีออกซีโคลิก (DCA) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 250 ไมโครกรัม สกัดของผสมทั้งหมดด้วยเอทธิลอะซีเตต (ethylacetate) 5 มิลลิลิตรในหลอดเกลียว นำมาเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า (Vortex mixer) เป็นเวลา 30 วินาที นำชั้นของเอทธิลอะซีเตตที่ได้จากการสกัดมาขจัดน้ำโดยใช้โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) นำสารนี้มา 3 มิลลิลิตร เพื่อทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 °ซ โดยใช้เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสูญญากาศ เติมเฮกซาฟลูออโรไอโซโพรพานอล (HFIP) และกรดไตรฟลูออโรอะซีติก แอนไฮดรายด์ (TFA) 100 และ 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในสารที่สกัดได้และทำให้แห้งแล้ว บ่มของผสมที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระเหยให้แห้งภายใต้สภาวะสูญญากาศ

นำไปวิเคราะห์ปริมาณของกรดน้ำดีโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี (Imai และ Tamura, 1976) ดังต่อไปนี้

ละลายอนุพันธ์ของกรดน้ำดีที่เตรียมไว้ด้วยอะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile) 200 ไมโครลิตร ฉีดสารละลายนี้ 3 ไมโครลิตรเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี (Hitachi 163) โดยมีสภาวะดังนี้

Glass column size	;	3 mm. x 1 m.
Absorbent	;	2% silicone DC-QF-1 on uniport HP 80/100 mesh
Column temperature	;	220 °c
Injection temperature	;	240 °c
Carrier gas	;	N_2 pressure 1.2 kg/cm^2
Detector	;	flame ionization detector (FID)

โดยวิธีนี้เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดน้ำดีชนิดต่างๆจะแตกต่างกันตามลำดับ ดังนี้

กรดลิโทโคลิก	3.5 นาที
กรดดีออกซีโคลิก	6.0 นาที
กรด 3α,15β-DHC	8.0 นาที

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์กรดน้ำดี รายงานปริมาณผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเป็น ไมโครโมลของกรด 3α,15β-DHC ต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมง และรายงานปริมาณกรดลิโทโคลิกที่เหลือเป็น ไมโครโมลของกรดลิโทโคลิกต่อลิตรอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย หรือ ไมโครโมลของกรดลิโทโคลิกต่อลิตรสารผสมปฏิกิริยา ซึ่งคำนวณได้จากเส้นกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 2 และ 3) เมื่อใช้สารบริสุทธิ์กรด 3α,15β-DHC และกรดลิโทโคลิกเป็นสารมาตรฐาน นำไปผ่านกระบวนการเตรียมอนุพันธ์และวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี โดยวิธีการที่กล่าวมาแล้ว

2.8 การตรวจวัดการเจริญของเชื้อรา Cunninghamella blakesleeana ST-22

นำตัวอย่างจากวิธีข้อ 2.4.3 มากรองผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก เพื่อแยกสายใยออกจากส่วนน้ำใส ล้างสายใยด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ

80 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักสายใยแห้ง

กำหนดค่าการเจริญของเชื้อรา Cunninghamella blakesleeana ST-22 เป็น กรัมสายใยแห้งต่อลิตรอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย