บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

2.1.1.1 อุปกรณ์ทั่วไป

ชนิดเครื่องมือ	แบบ - รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ	Model 25	ISSCO., Thailand
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์	Autoclave Model HA-3D	Hirayama Manufacturing Corporation., Japan
ตู้อบแห้ง	-	Memmert., Germany
เครื่องเหวี่ยง	Kokusan H-18 Autoseries	Biomed group Co.Ltd., Japan
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	PHM83 autocal pH meter	Radiometer., Copenhagen
เครื่องชั่ง	1. แบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง	Sartorius., Germany
	2. แบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Sartorius., Germany
กล้องจุลทรรศน์	Optiphot Episcopic-Fluorescen Attachment EF-D	Nikon., Japan
เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสูญญากาศแบบหมุน	RE 111	Auchi., Switzerland
เครื่อง Peristatic pump	Type SJ-1211 H	Chromatograph Alto corporation, Japan
เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์	Shimadzu UV-visible UV-240	Shimadzu., Japan
เครื่องเขย่าแบบหมุนวน (Rotary shaker)	-	-
เครื่องทำแห้งแบบ Freeze Dry	Lyph-Lock 12	Labconco Corporation, USA.

2.1.1.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

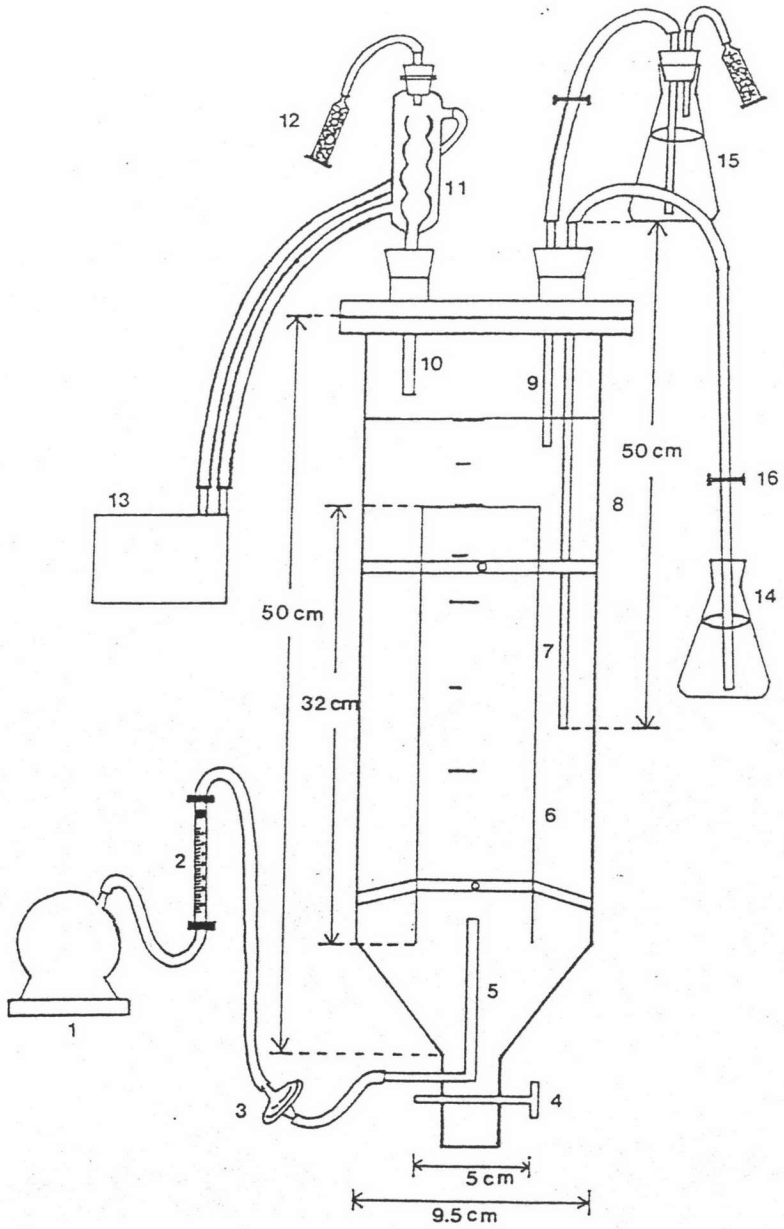
รูปที่ 6 แสดงลักษณะและขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่ใช้ในการทดลองเป็นคอลัมน์โพลีอะคริลิคใสเพื่อให้แสงสามารถผ่านเข้าถังเซลล์พืชได้ระหว่างการทดลอง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 9.5 เซนติเมตร และสูง 50 เซนติเมตร มีฝาปิดสนิทไม่ให้อากาศผ่านเข้าออก ด้านบนฝาต่อท่อพีวีซีซึ่งมีวาล์วปิด-เปิดที่ปลายท่อ จำนวน 2 ท่อ ท่อ A จะอุดด้วยจุกยางที่เจาะรูตรงกลาง สำหรับใส่ท่อแก้วเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร ใช้เป็นทางระบายอากาศออกจากถังปฏิกรณ์ด้านบนท่อจะต่อเข้ากับคอลัมน์ condensor ซึ่งหล่อด้วยน้ำอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไอน้ำที่ระเหยขึ้นมากับอากาศถูกกลั่นกลับสู่ถังปฏิกรณ์ รักษาปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยง ด้านบนของ condensor จะติดเครื่องกรองอากาศป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ท่อ B อุดด้วยจุกยางที่เจาะรูตรงกลาง 2 รู สำหรับใส่ท่อแก้วเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร โดยท่อแรกใช้เป็นท่อส่งน้ำจากขวดใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 5.7 เท่ากับอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อปรับความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ให้คงที่สม่ำเสมอตลอดเวลาของการเพาะเลี้ยง ใช้สำหรับถ่ายเซลล์ตั้งต้นเข้าสู่ถังปฏิกรณ์และชักตัวอย่างระหว่างการเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับท่อ A แต่ท่อแก้วที่เสียบอยู่ตรงกลางของจุกยางมีความยาวกว่า คือเท่ากับ 50 เซนติเมตรซึ่งปลายท่อแก้วจะอยู่ระดับตรงกลางของถังปฏิกรณ์อันเป็นจุดที่ใช้ในการชักตัวอย่างเซลล์พืชเพาะเลี้ยง ภายในถังปฏิกรณ์มีอุปกรณ์เรียกว่า draft tube สร้างจากคอลัมน์แก้วใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 5 เซนติเมตรและยาว 32 เซนติเมตร ใช้ควบคุมทิศทางและความเร็วของกระแสการไหลภายในถังปฏิกรณ์ ด้านล่างของถังปฏิกรณ์ประกอบด้วยวาล์วเปิด-ปิดเพื่อใช้ในการถ่ายของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ออก และส่วนที่เป็นท่อให้อากาศจะเป็นท่ออะลูมิเนียมเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 0.3 เซนติเมตร ซึ่งจะต่อเข้ากับตัวกรองอากาศสำเร็จรูป

2.1.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ	
เบนเลท	บริษัท ดูปองท์ (ประเทศไทย) จำกัด
เอธานอล 95%	องค์การเภสัชกรรม

รูปที่ 6 ขนาดและลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่ใช้ในการทดลอง

(1) ปั๊มให้อากาศ
(2) โรตามิเตอร์
(3) ตัวกรองอากาศสำเร็จรูป
(4) ท่อถ่ายของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ (drain valve)
(5) หัวพ่นอากาศ
(6) draft tube ทำจากท่อแก้วขนาด 5 x 32 cm
(7) ท่อถ่ายเซลล์เริ่มต้นและชักเซลล์ตัวอย่าง
(8) ตัวคอลัมน์ของถังปฏิกรณ์ทำจากโพลีอะคริลิคใส ขนาด 9.5 x 50 cm
(9) ท่อถ่ายน้ำปลอดเชื้อเพื่อปรับปริมาตรของอาหารในถังปฏิกรณ์
(10) ท่อให้อากาศออก
(11) condenser
(12) ตัวกรองอากาศ
(13) water bath ผลิตน้ำที่ 4 °ซ
(14) ขวดใส่เอธานอล 70% เพื่อเอาไว้แช่ท่อเก็บเซลล์ตัวอย่างป้องกันการปนเปื้อน
(15) ขวดใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ pH 5.7
(16) ตัวหนีบ


12
11
15
10
9
50 cm
16
13
8
50 cm
14
7
32 cm
6
2
5
1
3
4
5 cm
9.5 cm

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator)	
BA (Benzyladenine)	Sigma Chemicals Co., USA.
2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)	Fluka, Switzerland
kinetin	Sigma Chemicals Co., USA.
NAA (1-napthalene acetic acid)	Fluka, Switzerland
IAA (Indoleacetic acid)	Fluka, Switzerland
สารเคมีที่ใช้ในการทำโครมาโตกราฟี	
Sephadex LH-20	Phamacia Co., USA.
TLC aluminium sheets silica gel 60 F	Merck, Germany
สารเคมีในการย้อมเซลล์พืช	
Fluorescein diacetate	Sigma Chemical Co., USA.
ผงวุ้น	ห้างหุ้นส่วน วอร์ด เมดิก จำกัด
MES (s-(N-morpholino) ethanesulphonic acid)	Sigma Chemical Co., USA.

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ เป็นสารเคมีอยู่ในระดับเกรดวิเคราะห์ (analytical reagent) สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Co., USA. ทั้งสิ้น

2.2 แคลลัสพืชไข่เน่าที่ใช้ในการทดลอง

แคลลัสพืชไข่เน่าที่ใช้ในการทดลองได้มาจากการคัดเลือกโคโลนีด้วยวิธีกระจายเซลล์เกาะกลุ่ม (aggregated cells) บนอาหารแข็งของแคลลัสโคลน PNA 3 ของ พนา โลหะทรัพย์ทวี (พนา, 2534) ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร 1/2 MS และ B5 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล., น้ำตาลซูโครส 3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และผงวุ้น 0.7 เปอร์เซนต์ ปรับ pH เท่ากับ 5.7 และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 1 เดือน โดยจะเลือกเฉพาะส่วนที่เป็นเซลล์สีแดงไปเพาะเลี้ยงใหม่เท่านั้น

2.3 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า

อาหารครึ่งสูตร MS ของ Murashige and Skoog, 1962 (ภาคผนวกที่ 1)

I16243655

อาหารสูตร B5 ของ Gamborg O.L., 1970 (ภาคผนวกที่ 2)

2.4 สภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า

เพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25±2°ซ ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนท์ ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และสลับความมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน

2.5 การเตรียมอาหารแข็งและอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า

ปิเปตสารอาหารจาก stock ที่เตรียมไว้ (ภาคผนวกที่ 3, 4) ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นประมาณ 500 มล. จากนั้นเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร คนให้ละลาย ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับ pH ให้ได้เท่ากับ pH 5.7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ ถ้าเป็นอาหารแข็งให้เติมผงวุ้น 0.7 เปอร์เซนต์ นำไปต้มจนวุ้นละลายทั่วกัน เทใส่ขวดสำหรับเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.6 การกระจายเซลล์เกาะกลุ่ม (aggregated cells) ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง

ดัดแปลงจากวิธีของ Bergmann (Bergmann, 1960) และพนา โลหะทรัพย์ทวี (พนา, 2534)

นำเซลล์แขวนลอยอิสระอายุ 1 เดือน ซึ่งอยู่ในช่วง log phase มากรองผ่านแผ่นไนลอน (Nylon screen) ขนาดความกว้างของรู 110 ไมโครเมตร เซลล์ที่ผ่านรูของแผ่นกรองจะมีขนาดเป็นเซลล์เดี่ยวและเซลล์เกาะกลุ่มไม่เกิด 2-4 เซลล์ต่อกลุ่มประมาณ 79% (พนา, 2534) แยกเซลล์ที่ได้ออกจากอาหารโดยการนำไปปั่นที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำเซลล์มาเจือจางในอาหารเหลวครึ่งสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ยูนิต ประมาณ2 x 10^4 เซลล์ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยให้คำนิยามของเซลล์ยูนิตว่า "1 เซลล์ยูนิต คือ จำนวนเซลล์เท่าไรก็ได้ที่เกาะกันเป็น 1 กลุ่ม" จากนั้นนำมาผสมกับอาหารวุ้นสูตรเดียวกันที่มีความเข้มข้นของวุ้นเท่ากับ 1.4% และอยู่ในรูปของเหลวอุณหภูมิประมาณ 35-40°ซ ด้วยปริมาตรที่เท่ากัน ดูดอาหารวุ้นเหลวที่ผสมกับเซลล์แล้วด้วยปิเปตปากตัด เทลงบนจานเพาะเลี้ยงจานละ 10 มล. กระจายอาหารวุ้นให้ทั่วจานเพาะ

เลี้ยง จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ยูนิตต่อจานเพาะเลี้ยงประมาณ 1 x 10^5 ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเซลล์ยูนิตที่เหมาะสมคือให้ประสิทธิภาพในการเกิดโคโลนีของเซลล์พืชสูง และไม่หนาแน่นเกินไปที่จะแยกได้โคโลนีเดี่ยวออกจากกัน (พนา, 2534) นำไปเพาะเลี้ยงแบบคว่ำจาน เพื่อป้องกันไอน้ำเกาะที่ฝาจาน วางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน (ข้อ 2.4)

2.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า

ใช้ Spatula ปลอดเชื้อตักเฉพาะเซลล์ลีแดงจากแคลลัสอายุ 1 เดือน ใส่ลงในอาหารเหลวที่จะใช้เพาะเลี้ยงโดยใช้เซลล์เริ่มต้นต่ออาหารเหลวประมาณ 1% น้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าให้เซลล์กระจายในอาหารเหลว จากนั้นนำมากรองผ่านแผ่นไนลอนขนาดความกว้างของรู 550 ไมโครเมตร ระหว่างการกรองใช้ Spatula เกลี่ยเซลล์ที่เกาะกลุ่มขนาดใหญ่ให้กระจายผ่านรูแผ่นไนลอน ลงไปพร้อมกับอาหารเหลวเขย่าให้เซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวทั่วกัน แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. ขวดละ 30 มล. นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ความถี่ 120 รอบต่อนาที ในสภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน (ข้อ 2.4)

2.8 การวัดการเจริญของเซลล์พืชโดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง

กรณีเซลล์พืชเป็นแคลลัสให้ใช้แคลลัสทั้งก้อน หรือถ้าเป็นเซลล์แขวนลอยให้ดูดเซลล์แขวนลอยมา 10 มล. ด้วยปิเปตปากตัด มากรองโดยวิธี suction ผ่าน กระดาษกรอง Whatman No. 1 ที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักแห้งแล้ว นำเซลล์บนกระดาษกรองไปอบในตู้อบแห้งที่ 60°ซ จนมีน้ำหนักแห้งคงที่ การชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ใช้เครื่องชั่งที่ชั่งได้ละเอียดถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.9 การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโธไซยานิน

นำเซลล์พืชถ้าเป็นเซลล์จากแคลลัสให้ใช้แคลลัสทั้งก้อน หรือ ถ้าเป็นเซลล์แขวนลอยใช้ปริมาตร 10 มล. นำเซลล์พืชไปปั่นแยกอาหารเหลวออกก่อนที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีหลังจากนั้นนำมาสกัดแยกสารแอนโธไซยานินด้วยเมธานอล 3 มล. ซึ่งมีกรดไฮโดรคลอลิก 1 เปอร์เซ็นต์เขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer ให้สารที่ใช้สกัดสัมผัสกับเซลล์มากที่สุด กรณีที่เซลล์มีจำนวนมากและสะสมปริมาณแอนโธไซยานินสูง การสกัดครั้งแรกให้สกัดทิ้งไว้ 1 คืน ที่ 4 °ซ

ในที่มืด แยกสารสกัดออกจากเซลล์โดยนำไปปั่นที่ 2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัดซ้ำด้วยวิธีการเดียวกันเช่นนี้ 3 ครั้ง นำสารสกัดปริมาตรรวม 9 มล. มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (max) คือ 525 นาโนเมตร

2.10 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

2.10.1 การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

ทำการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง โดยครั้งแรกใช้สารฆ่าเชื้อรามีชื่อทางการค้าว่าเบนเลท ความเข้มข้น 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ล้างถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 1 ครั้ง ล้างสารฆ่าเชื้อราออกด้วยน้ำกรองปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยแสงอุลตร้าไวโลเล็ต (UV) ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อทิ้งไว้ 1 คืน ใส่ draft tube ลงข้างในถังปฏิกรณ์และปิดฝาด้านบนขันน็อตให้แน่นแล้วจึงฆ่าเชื้อครั้งสุดท้ายด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซนต์ ล้างเอธานอลออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จึงประกอบส่วนต่าง ๆ ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เหลือเข้าด้วยกัน ได้แก่ ท่อสำหรับชักตัวอย่าง, ท่ออากาศ และตัวกรองอากาศ ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที

2.10.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอยตั้งต้น (inocula)

ใช้แคลลัสอายุ 1 เดือน ตักเฉพาะเซลล์สีแดงด้วย spatula ปลอดเชื้อจำนวน 9 กรัมน้ำหนักสด ลงในอาหารเหลวสูตรที่จะใช้เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพปริมาตร 600 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2 ลิตร เขย่าให้กลุ่มเซลล์แตกกระจายลงระดับหนึ่ง แล้วกรองผ่านแผ่นไนลอนขนาดของรู 550 ไมโครเมตร ขณะเดียวกันก็ใช้ spatula เกลี่ยให้เซลล์ผ่านรูของแผ่นไนลอนลงไป จากนั้นแบ่งเซลล์แขวนลอยตั้งต้นที่ได้ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ขวดละ 200 มล. นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบ Rotary ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐานเป็นเวลา 1 สัปดาห์

2.10.3 การถ่ายเซลล์แขวนลอยตั้งต้นลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

นำเซลล์แขวนลอยตั้งต้นอายุ 1 สัปดาห์ที่เตรียมไว้เทลงในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน ปริมาตร 2.8 ลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 5 ลิตร เพราะฉะนั้นจะได้ปริมาตรรวม 3.4 ลิตร และความข้มข้นของเซลล์ตั้งต้นสุดท้ายเท่ากับ 3 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใส่แท่งแม่เหล็กสำหรับกวน (magnetic bar) ปลอดเชื้อ ลงในขวดเซลล์แขวนลอยปิดขวดด้วยจุกยางที่มีท่อ 2 ท่อ คือท่อที่ต่อด้วยสายยางที่อีกปลายข้างหนึ่งต่อเข้ากับท่อสำหรับถ่ายเซลล์ตั้งต้น (ท่อเดียวกับที่ใช้ชักตัวอย่าง) ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และอีกท่อคือท่อที่ใช้ระบายความดันขณะถ่าย

เซลล์ตั้งต้นลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ปลายท่อติดกับตัวกรองอากาศ เพื่อกันจุลินทรีย์ปนเปื้อนมากับอากาศ ทำการถ่ายเซลล์ตั้งต้นโดยใช้หลักการความแตกต่างของความดันด้วยการวางขวดเซลล์แขวนลอยไว้เหนือถังปฏิกรณ์ชีวภาพและตั้งบนเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก เปิดเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กในระดับต่ำสุดแต่เพียงพอที่จะกวนเซลล์แขวนลอยให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว เริ่มต้นอาจใช้ปั๊มแบบ peristatic เข้าช่วยเพื่อลดความดันภายในท่อให้เซลล์แขวนลอยไหลผ่านลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากนั้นจึงปล่อยให้เซลล์แขวนลอยไหลลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพเองด้วยความแตกต่างของความดัน ขณะที่ถ่ายเซลล์ตั้งต้นให้เปิดท่อให้อากาศตรงปลายถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อให้เกิดการผสมและการดึงเซลล์ไม่ให้เซลล์ตกตะกอนแล้วหลุดลงในท่อระบายซึ่งต่อกับวาล์วปิดอยู่ ทำการถ่ายเซลล์แขวนลอยตั้งต้นจนได้ปริมาตร 3 ลิตร ซึ่งเป็นปริมาตรที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพนี้หยุดการไหลของเซลล์แขวนลอยโดยการปิดท่อสายยางด้วยตัวหนีบ 2 ตัว หนีบตรงปลายสายยางที่ต่อกับท่อบนขวดเซลล์แขวนลอย จากนั้นใช้กรรไกรตัดตรงกลางระหว่างตัวหนีบจะได้สายยาง 2 เส้น เส้นที่หนึ่งเป็นสายยางปลายข้างหนึ่งต่อกับท่อถ่ายเซลล์ตั้งต้นของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และปลายอีกข้างหนึ่งถูกหนีบด้วยตัวหนีบนำไปแช่ในเอธานอล 70 เปอร์เซนต์ ใช้เป็นท่อสำหรับการชักตัวอย่าง และ เส้นที่สองเป็นสายยางสั้นปลายข้างหนึ่งต่อกับท่อถ่ายเซลล์ของขวดเซลล์แขวนลอยและปลายอีกข้างหนึ่งถูกหนีบด้วยตัวหนีบเช่นกัน (รูปที่7)นำเซลล์แขวนลอยที่เหลืออยู่ประมาณ 400 มล. นี้ไปแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. ขวดละ 30 มล. นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบRotary ความเร็ว 80 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าควบคู่ไปกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพในสภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

2.10.4 การให้อากาศในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

อากาศที่ให้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะถูกกรองให้ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการให้อากาศผ่านตัวกรองอากาศ ADVANTEC อัตราการให้อากาศตามที่กำหนดทำได้ โดยการปิด-เปิดวาล์วของ rotameter ให้ระดับของลูกลอยใน rotameter อยู่บนสเกลของ rotameter ตามต้องการ โดยค่าสเกลของ rotameter สามารถแปลงเป็นหน่วย vvm (volumn of gas fed per unit operating volumn of reactor per minute) ได้ในกราฟค่ามาตรฐานระหว่างหน่วย vvm กับสเกลบน rotameter ที่ใช้ในการทดลอง (ภาคผนวกที่ 9)

2.10.5 การชักตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ใช้ลูกยางดูดเซลล์แขวนลอยจากปลายของท่อยางที่ใช้ชักตัวอย่างในระดับที่ต่ำกว่าระดับของอาหารเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขณะเดียวกันก็ปลดตัวหนีบออก เซลล์แขวนลอยจะถูกดูดไหลออกมา ปลดลูกยางออกแล้วใส่เซลล์แขวนลอยลงในขวดที่ปลอดเชื้อ ให้ได้ปริมาณ 50

รูปที่ 7 การถ่ายเซลล์แขวนลอยตั้งต้นลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

(1) ปั๊มให้อากาศ

(2) โรตามิเตอร์

(3) ตัวกรองอากาศสำเร็จรูป

(4) ท่อถ่ายของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ (drain valve)

(5) หัวพ่นอากาศ

(6) draft tube ทำจากท่อแก้วขนาด 5 x 32 cm

(7) ท่อถ่ายเซลล์เริ่มต้นและชักเซลล์ตัวอย่าง

(8) ตัวคอลัมน์ของถังปฏิกรณ์ทำจากโพลีอะคริลิคใส ขนาด 9.5 x 50 cm

(9) ท่อถ่ายน้ำปลอดเชื้อเพื่อปรับปริมาตรของอาหารในถังปฏิกรณ์

(10) ท่อให้อากาศออก

(11) condenser

(12) ตัวกรองอากาศ

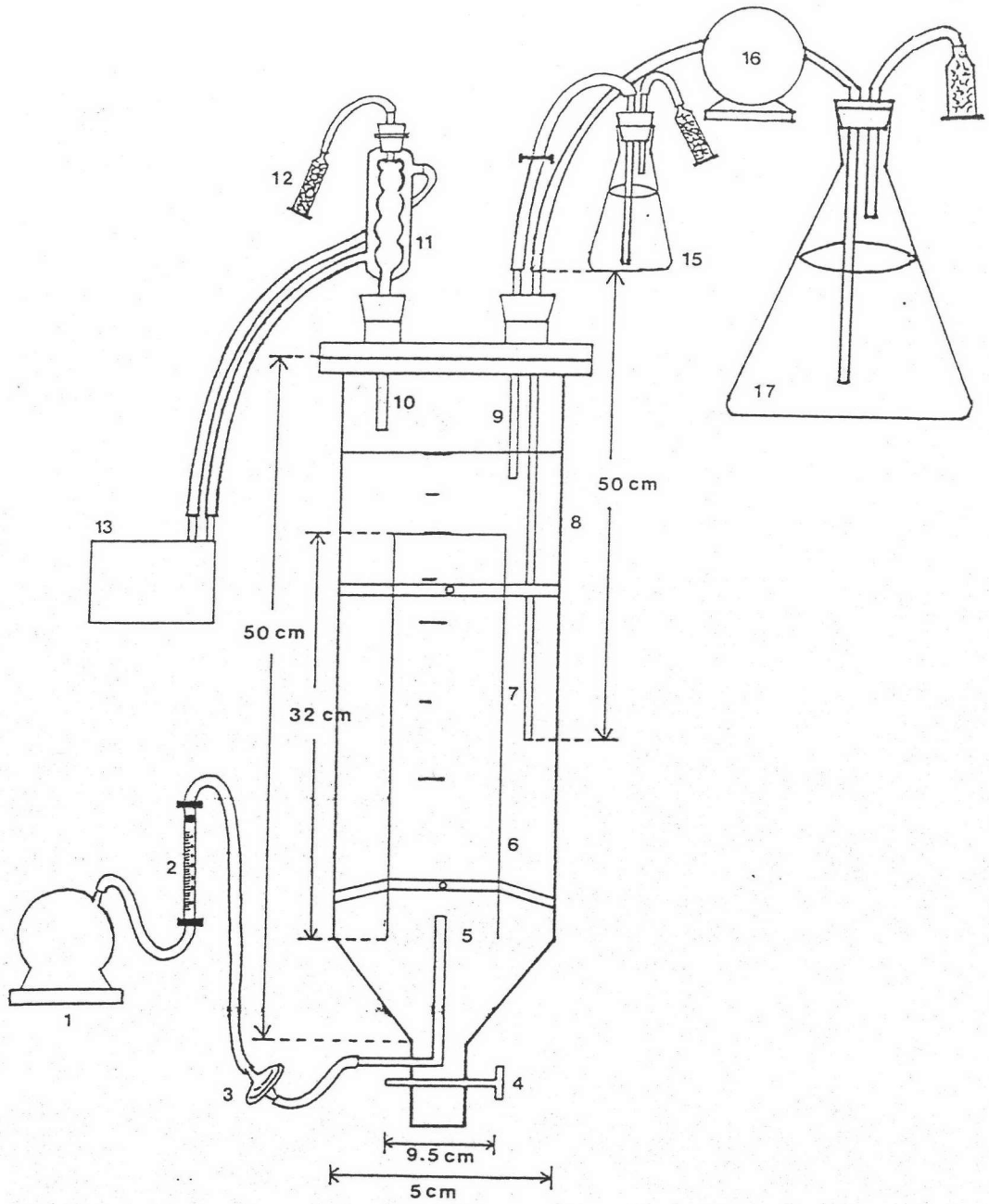
(13) water bath ผลิตน้ำที่ 4 °ซ

(14) ขวดใส่เอธานอล 70% เพื่อเอาไว้แช่ท่อเก็บเซลล์ตัวอย่างป้องกันการปนเปื้อน

(15) ขวดใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ pH 5.7

(16) ขวดใส่เซลล์แขวนลอยเริ่มต้น

(17) peristatic pump


16
12
11
15
10
9
17
50 cm
13
8
50 cm
32 cm
7
6
2
5
1
3
4
9.5 cm
5 cm

มล. จึงใช้ตัวหนีบ หนีบท่อยาง ควรระวังไม่ให้เซลล์แขวนลอยที่ตดออกมาแล้วย้อนกลับลงไปในถังปฏิกรณ์ชีวภาพใหม่ อาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อได้ จากนั้นจึงนำท่อยางไปแช่ในเอธานอล 70 เปอร์เซนต์ทันที ทำการชักตัวอย่างทุก ๆ 5 วัน ระหว่างการเพาะเลี้ยง

2.10.6 การวิเคราะห์ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ นำเซลล์แขวนลอยตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ดังนี้

- วัดการเจริญของเซลล์แขวนลอยโดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง (ข้อ 2.8)
- วิเคราะห์ปริมาณสารแอนโธไซยานิน (ข้อ 2.9)
- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยง โดยวิธี DNSA (3,5-dinitrosalicylic acid) (ภาคผนวกที่ 7)
- วัดเปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยวิธีการย้อมด้วยสี fluorescein diacetate (ภาคผนวกที่ 6)
- วัด pH ของอาหารเพาะเลี้ยง