วิธีการและอุปกรณ์

การเตรียมเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

แหล่งเชื้อ

Aspergillus สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ได้แยกจากแหล่งอาหารที่ใช้รับประทาน ได้แก่ ลูกแป้งทั้ง 3 ชนิด คือ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า และลูกแป้งน้ำส้ม เชื้อหมักเต้าเจี้ยว เชื้อหมักจากโรงงานสุราแอลกอฮอร์ อยุธยา และเชื้อบริสุทธิ์จากห้องวิจัยของบริษัท Tate and Lyte Limited ประเทศอังกฤษ ในการทดลองนี้ได้แยกรา Aspergillus จากลูกแป้งซึ่งนำมาจากจังหวัดต่างๆ และในกรุงเทพฯ รวม 52 แห่ง ส่วนเชื้อหมักเต้าเจี้ยวนำมาจากโรงงานชื่อว่ายงไทย จังหวัดเพชรบุรี Aspergillus ที่ได้จากโรงงานสุราแอลกอฮอร์ อยุธยา ได้มาในรูปของเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ของ A. niger กับ A. oryzae และเชื้อบริสุทธิ์ของ A. niger(A21) ได้มาจากบริษัท Tate and Lyte Limited ใช้เป็นสายพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนกับสายพันธุ์อื่น ๆ ในการทดลองครั้งนี้

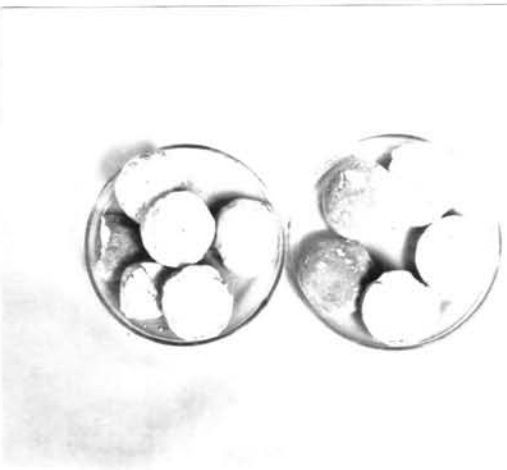
วิธีการแยกเชื้อ ใช้วิธีการแยกเชื้อราดังนี้

ก. Dilution plating โดยชั่งตัวอย่างที่มีเชื้อ 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มล. ทำให้จางต่อไปอีกให้ได้ 10^{-2} หรือ 10^{-3} เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดน้ำนั้น dilution ละ 1 มล. ใส่ในจานทดลองที่ฆ่าเชื้อแล้ว เทอาหารชนิด malt extract agar ลงไป ปิดฝาอบทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีของราจะปรากฏขึ้นให้เห็น ใช้เข็มแยกเชื้อใส่ในหลอดอาหารใหม่ จนได้เชื้อบริสุทธิ์

ข. Streak plate เป็นวิธีแยกเชื้อโดยขีดเชื้อลงบนอาหารแข็ง โดยใช้เข็มที่เป็นห่วง (loop) แตะน้ำที่ทำให้จาง 1 ต่อ 10 มาขีดบน malt extract agar plate เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูจากการ

หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 แสดงภาพเศษมันสำปะหลังที่เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมการผลิต
มันเส้นและแป้งมันสำปะหลัง จังหวัดธนบุรี



รูปที่ 2 แสดงลูกแป้งชนิดต่าง ๆ ลูกแป้งเหล้า ลูกแป้งข้าวหมาก ที่ใช้หมักใน
อาหารบางชนิดที่รับประทานได้ของไทย ใช้เป็นแหล่งแยกเชื้อ
Aspergillus sp.

รูปที่ 3 แสดงภาพของเชื้อหมักเต้าเจี้ยว สำหรับหมักทำซีอิ๊วและเต้าเจี้ยว
ของไทย ซึ่งแยกได้เชื้อรา Aspergillus oryzae

งอกของเชื้อทุก 24 ชั่วโมง พบสายใยของรางอกเป็นกลุ่ม ๆ แล้วใช้เข็มแก้วเขี่ยก้านชูอับสปอร์ (sporangiophore) ภายใต้กล้องจุลทัศน์สเตอริโอ (Stereomicroscope) แตะปลายแห่งที่มีสปอร์ติดอยู่บน Czapek's salt medium ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลอง เก็บไว้ในตู้อุณหภูมิต่ำ การเขี่ยเชื้อนี้เลือกเขี่ยเฉพาะรา Aspergillus เท่านั้น ราที่คิดว่าเป็น Aspergillus ได้นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์ เพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อที่ถูกต้องเสียก่อน โดยอาศัยลักษณะช่อสปอร์ (conidiophore) และสีของเชื้อเป็นหลัก

การจำแนกเชื้อ

เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้ว นำเชื้อที่ได้มาทำ slide culture ตามวิธีของ Riddel (13) โดยตัดชิ้นของอาหารชนิด PDA (Potato dextrose agar) : 1 ลบ.ซม. ใส่บนสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วในสารละลาย 10 % กลีเซอรีนที่ปราศจากเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °ซ.) 2 - 4 วันแล้วใช้ปากคีบ คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ออก แยกชิ้นอาหารออกจากสไลด์ หยดสีย้อม lactophenol cotton blue บนสไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ แล้วปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ และสไลด์แผ่นใหม่อีกอันตามลำดับ โดยวิธีนี้ได้สไลด์ที่ใช้ศึกษาถึง 2 อัน ศึกษาลักษณะช่อสปอร์ head เซลที่ฐาน(base cell) และสายใย (7, 37, 43) ภายใต้กล้องจุลทัศน์ และลักษณะภายนอกกับสีของเชื้อในหลอดอาหารประกอบ

<u>การเตรียมน้ำแป้งมันสำปะหลังเพื่อเลี้ยงเชื้อ</u>

การวิจัยครั้งนี้ต้องการจะกำจัดของทิ้งจากอุตสาหกรรมทางเกษตรให้เป็นประโยชน์ โดยใช้เศษมันสำปะหลังที่ทิ้งจากโรงงานทำแป้งมันและโรงงานทำมันเส้น จากจังหวัดชลบุรี มาเป็นอาหารเลี้ยงรา Aspergillus โดยศึกษาสภาพที่จะได้แป้งจากเศษมันสำปะหลัง ตามวิธีดังนี้ คือ ชั่งเศษมันสำปะหลัง ขนาดประมาณ 3 ลบ.ซม. 150 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มล. แล้วทำการทดลองในสภาพต่าง ๆ กัน คือ

สภาพที่ 1 แช่มันสำปะหลังทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง

สภาพที่ 2 ต้มน้ำเดือดแล้วใส่มันสำปะหลังต้มต่อเป็นเวลา 5 และ 10 นาที

สภาพที่ 3 ผสมน้ำกับเศษมันสำปะหลังแล้วต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 และ 10 นาที

สภาพที่ 4 บดเศษมันสำปะหลังให้เป็นชิ้นละเอียด ประมาณ 3 ลบ.มม. แล้วต้มให้เดือดเป็นเวลา 7 นาที

เนื่องจากมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเศษมันสำปะหลังที่เหลือจากการบรรจุกระสอบส่งไปขายเป็นอาหารสัตว์ ขนาดของเศษมันจึงโตไม่เท่ากันทุกชิ้น และค่อนข้างมีสิ่งสกปรกปนอยู่ด้วย ก่อนทดลองทุกครั้งจึงต้องล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เพื่อล้างสิ่งสกปรกภายนอกออก น้ำแป้งมันสำปะหลังที่ได้นำมาทดสอบหาปริมาณแป้งต่อไปนี้

ก. วิธีการหาปริมาณแป้งมันสำปะหลังในน้ำที่เตรียม

เมื่อได้น้ำแป้งตามสภาพทดลองต่าง ๆ แล้ว นำน้ำแป้งมันสำปะหลังนั้นมาหาปริมาณแป้ง โดยให้ทำปฏิกริยากับสารละลายกรัมไอโอดีน (Gram iodine) โดยต้มน้ำมันสำปะหลังนั้นให้เดือด และคนขณะตั้งไฟ อย่าให้แป้งเป็นก้อน ดูดน้ำแป้งมันสำปะหลังมา 4 มล. เติม 0.1 มล. ของสารละลายกรัมไอโอดีน เอียงหลอดทดลองไปมาเพื่อให้ผสมกันทั่วจะเกิดสีน้ำเงินขึ้น นำสารละลายที่มีสีนี้ไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง Spectronic 88 ของบริษัท Bausch and Lomb ที่ความยาวช่วงคลื่น 620 นาโนมิเตอร์ นำค่าที่ได้ไปเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์แป้งที่ทำการทดลองไว้ หน่วยที่ออกมาเป็น มก.ต่อลิตร คำนวนให้ได้ความเข้มข้นของแป้งเป็นกรัมต่อ น้ำแป้งมันสำปะหลัง 100 มล.

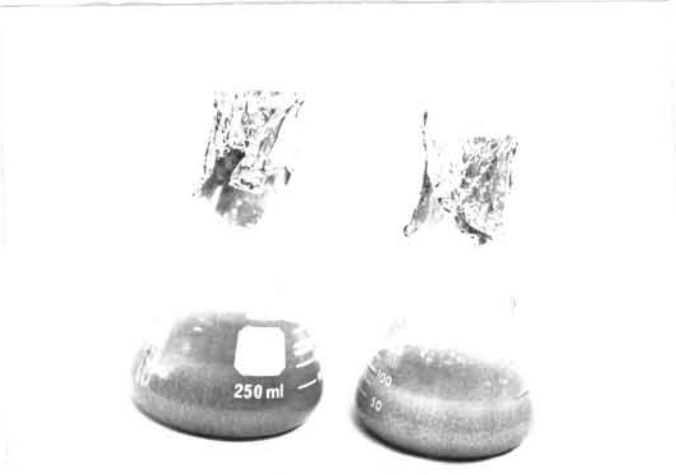
ข. วิธีการทำเส้นกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณแป้ง

ใช้แป้งมันสำปะหลังของบริษัท เอส อาร์ จำกัด ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของแป้ง 10, 20, 50, 100 และ 200 มก. ต่อลิตร คนให้แป้งให้ละลายให้หมดแล้ว ไปอุ่นจนเดือด ระวังไม่ให้แป้งจับตัวกันเป็นลูก ดูดน้ำแป้งที่ต้มแล้วมา 4 มล. เติมสารละลายกรัมไอโอดีน (13) 0.1 มล. เอียงหลอดทดลองไปมาจนเกิดสีแล้ว นำไปวัด absorbance โดย Spectronic 88ที่ 620 นาโนมิเตอร์ นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟ โดยใช้แกนนอนเป็นค่าของความเข้มข้นของแป้ง หน่วย มก. ต่อลิตร และแกนยืนเป็นค่า OD.

วิธีการเตรียมสารละลายกรัมไอโอดีน โดยชั่งไอโอดีน 1 กรัม และโปตัสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ละลายใน 5 มล. ของน้ำกลั่น พอละลายผสมน้ำกลั่นอีกให้ได้ 240 มล. เติม 60 มล. ของ 5 % สารละลายโซเดียมไบคาร์โบเนต คนให้ทั่ว ปรับให้เป็นกรดด้วย กรดเกลือเข้มข้น 1 โมลาร์ (ไอโอดีนจะทำกับน้ำแป้งแล้วให้สีน้ำเงินในสภาพเป็นกรด) เก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดสีชา และห้องเย็น

<u>การเตรียมจำนวนสปอร์ใส่ในอาหารเหลว</u>

ดูดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่เลี้ยงรา Aspergillus ที่มีอายุ 5 - 7 วัน ใช้ปลายเข็มงอลากเบา ๆ ไปมาบนพื้นหน้าของโคโลนี เพื่อให้สปอร์หลุด ใช้ปลายเข็มวงกลมแตะ ทวีน - 80 (Tween - 80) เป็นฟิล์มผสมเพื่อให้สปอร์หลุดจากกัน นับจำนวนสปอร์ โดยใช้เครื่องมือที่เรียกฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer) เครื่องมือแบ่งเป็นช่อง ๆ 16 ช่องใหญ่ แต่ละช่องใหญ่มี 25 ช่องเล็ก ดังนั้น 1 ช่องเล็กมีปริมาตร 4×10^{-3} ลบ.มม. วิธีใช้เครื่องมือนี้ คือใช้ปิเปตต์ที่ปราศจากเชื้อดูดน้ำที่มีสปอร์รา มา 0.1 มล. หยดลงบนเครื่องมือนี้แล้วปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ส่องดู ภายในกล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 10 X 10 นับจำนวนสปอร์ในแต่ละช่องเล็กแบบสุ่ม (random) มา 10 ช่อง หาค่าเฉลี่ย ถ้าต้องการขนาดสปอร์ที่



รูปที่ 4 เพลเล็ทที่อยู่ในอาหารเหลว หลังจากหมักได้ 2 วัน อาหารเหลวประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง แอมโมเนียมซัลเฟต โปตัสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

รูปที่ 5 แสดงภาพของสายใยแห้งของรา Aspergillus niger ภายหลังจากอบที่ 80 °ซ ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง

ที่ใช้ 6 X 10^6 สปอร์ต่อ มล. ต้องได้ค่าเฉลี่ยในแต่ละช่องย่อยประมาณ 1.5 สปอร์ต่อ 1 ช่องเล็ก ตลอดการทดลองใช้ราที่มีอายุ 5 - 7 วัน ใช้จำนวนสปอร์ 6 X 10^6 สปอร์ต่อ มล. ถูกใส่ในอาหารเหลว 100 มล. ที่บรรจุในขวดErlenmeyer flaskขนาด 250 มล. ทุก ๆ การทดลองทำ 2 ชุด และนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °ซ.

<u>วิธีการเก็บโปรตีนจากสายใย</u>

นำขวดอาหารที่มีราเลี้ยงครบตามกำหนดเวลา มาวัดขนาดเพลเล็ตหาค่าเฉลี่ยในจำนวน 10 เพลเล็ต แล้วแยกเพลเล็ตออกจากอาหารเหลว โดยกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. และใช้ดูดด้วยสูญญากาศ น้ำที่กรองได้นำมาวัด pH ด้วยเครื่องวัด pH (Zeromatic type) ส่วนเส้นใยที่กรองได้จะค้างอยู่บนกระดาษกรอง สามารถลอกเป็นแผ่นนำไปล้างน้ำกลั่นใหม่ 3 ครั้ง โดยใช้กระดาษกรองทำแบบเดียวกับข้างต้น ลอกแผ่นเส้นใยออกจากกระดาษกรอง นำเส้นใยนั้นไปชั่งหาน้ำหนักสด แล้วจึงนำสายใยที่กรองได้เข้าตู้อบ 80 ° ซ. 24 ชม. (17) เมื่อแห้งแล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งและตรวจหากรดอะมิโน **ปริมาณ**โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (41) หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldahl(39) แล้วคำนวนหาปริมาณเคดาวน์โปรตีน นอนโปรตีน (non protein) และผลผลิตโปรตีนทั้งหมด (total protein yield)

<u>วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณลอรี่โปรตีน</u> (Lowry Protein)

ได้ใช้วิธีของ Lowry (41) วิธีนี้ค่อนข้างแน่นอนและเป็นที่นิยมใช้กันมานาน สามารถหาปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 10 - 200 ไมโครกรัมขึ้นไป จึงเหมาะที่จะใช้ในการวิจัยครั้งนี้ สารเคมีที่ใช้แบ่งเป็นสารละลาย 4 ชนิดด้วยกัน คือ

สารละลาย ก. ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม ละลายใน 100 มล.ของ 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์

สารละลาย ข. ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 1 กรัม ใน 100 มล. น้ำกลั่น

สารละลาย ค. ชั่งโซเดียมหรือโปตัสเซียมตาร์เตรต 2 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 100 มล.

สารละลาย ง. ผสม Phenol reagent 1 ส่วน กับน้ำกลั่น 1 ส่วน

ผสม 1 มล. ของสารละลาย ข กับ 1 มล.ของสารละลาย ค คนให้เข้ากัน แล้วจึงผสมกับ 100 มล.ของสารละลาย ก คนให้เข้ากัน เป็นสารละลาย ก.ข.ค.

การตรวจปริมาณโปรตีนทุกครั้งได้ทำตามวิธีการนี้ คือ ดูดสารละลายจากตัวอย่างที่ต้องการหาโปรตีน 0.5 มล. ผสมกับ 3 มล. ของสารละลาย ก.ข.ค. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 15 นาที ปิเปตต์ 0.3 มล. สารละลาย ง. ลงในหลอดทดลองดังกล่าว ผสมให้ทั่ว ทิ้งไว้นาน 30 นาที เกิดสีฟ้าน้ำเงินขึ้น นำสารละลายมีสีนี้ไปวัดด้วยเครื่อง Spectronic 88 ที่ความยาวช่วงคลื่น 650 นาโนมิเตอร์ จดค่า absorbance เก็บไว้

ก. วิธีการหาเส้นกราฟมาตรฐานของเปอร์เซนต์ลอรี่โปรตีน

โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ปริมาณ 20, 40, 60, 80, 120 และ 160 ไมโครกรัม แล้วตรวจหาปริมาณลอรี่โปรตีนตามวิธี Lowry ดังกล่าวข้างต้น นำค่า absorbance ที่ได้และปริมาณ BSA ที่ทราบค่าไปสร้างกราฟโดยใช้แกนนอนเป็นค่าปริมาณ BSA และแกนยืนเป็นค่าabsorbance

ข. วิธีการหาเปอร์เซนต์ลอรี่โปรตีนในสายใยแห้งของรา

ชั่ง 0.1 กรัม สายใยแห้งที่อบแล้วมาทำให้ผนังเซลแตก โดยวิธีทางเคมี โดยใช้ 0.4 % NaOH 5 มล. ลงในหลอดทดลองที่มี 0.1 กรัมสายใยแห้ง แล้วใส่

ใน water bath 40° ซ. พร้อมทั้งเขย่าไปด้วยนาน 1 ชั่วโมง นำส่วนที่เป็นน้ำใส มาหาปริมาณลอรี่โปรตีนด้วยวิธี Lowry ดังกล่าวข้างต้น นำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวช่วงคลื่น 650 นาโนมิเตอร์ แล้วอ่านค่าความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน คำนวนหาเปอร์เซนต์ลอรี่โปรตีนในสายใยแห้ง 100 กรัม

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเคดาวน์โปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl

ได้ใช้วิธีของ Kjeldahl (39) หาปริมาณของเคดาวน์โปรตีน โปรตีนนี้เป็นโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในเซล คูณด้วยตัวประกอบค่าหนึ่ง คือ 6.25 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่หาได้นี้จะเป็นค่ารวมของปริมาณไนโตรเจนที่มีอยู่ในรูปของโปรตีน (70) และไนโตรเจนที่มิได้อยู่ในรูปโปรตีน ส่วนใหญ่อยู่ในรูปกรดนิวคลีอิก และพวกอนินทรีย์ไนโตรเจน (36, 54) ซึ่งในที่นี้รวมเรียกว่านอนโปรตีน (non protein)

วิธีการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยการย่อยสลายสายใยราโดยวิธีทำเรียก ไดเจสชั่น (digestion) ใช้หลอดทดลองที่เป็นหลอดสำหรับย่อยสลายบรรจุสารที่ต้องการหาปริมาณไนโตรเจน เติมน้ำยาสำหรับย่อยสลาย (digestive reagent) 1 มล. และกรดกำมะถันเข้มข้น 2 มล. นำไปปักลงในกระบะทรายลึก 2 - 5 ซม. ที่ให้ความร้อน 310 - 320° ซ ย่อยไปจนกว่าจะได้สารละลายใส การย่อยนี้ต้องทำในตู้ควัน

น้ำยาสำหรับย่อยสลายนี้ได้ใช้วิธีตาม Arnold (11) โดยละลาย 134 กรัมของโปตัสเซียมซัลเฟตใน 650 มล. ของน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนียแล้วผสมกับ 200 มล.ของกรดกำมะถันเข้มข้น คนให้ผสมกัน แล้วค่อยไปผสมกับสารละลายของปรอทแดง (red mercuric oxide) 2 กรัม ใน 25 มล. 6 นอร์มอล กรดกำมะถัน สารผสมทั้งหมดนำมาทำให้เจือจางเป็น 1000 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้

เนสเซอไรเซชั่น (Nesslerization) เป็นการทำให้เกิดมีสีขึ้น โดยนำสารละลายกรดที่ย่อยได้จากข้างต้นในหลอดทดลองสำหรับย่อยสลาย มาทำให้เจือจางด้วยน้ำ ดูดสารละลายที่ทำให้เจือจางแล้วนี้มา 3 มล. ผสมกับ 1 มล. ของน้ำกลั่น และ 1 มล.ของสารละลายเนสเลอร์ (nessler reagent) ผสมให้เข้ากัน จะเกิดสารละลายสีส้มแดงขึ้น นำสารละลายนี้ไปวัด absorbance ที่ความยาวช่วงคลื่น 420 นาโนมิเตอร์ ด้วยเครื่อง Spectronic 88

การเตรียมสารละลายเนสเลอร์ (nessler reagent) ตาม Colowick (22) โดยละลาย 22 กรัมของไอโอดีนใน 30 กรัมของโปตัสเซียมไอโอไดด์ที่ละลายอยู่ในน้ำ 20 มล. คนให้เข้ากันแล้วดูดเก็บไว้ประมาณ 1 มล. นำสารละลายที่เหลือนี้ผสมกับ 30 กรัม ของปรอทที่บริสุทธิ์ (ทำให้บริสุทธิ์ได้โดยแช่ปรอทใน 1 นอร์มอล กรดไนตริก 24 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง จนหมดกรด) คนให้ทั่วเข้ากัน ขณะที่ผสมปรอทให้เข้ากับสารละลายนั้น จะต้องทำให้สารละลายนี้เย็นตลอดเวลา โดยไปผ่านน้ำประปา ผสมจนไม่มีสีน้ำตาลของไอโอดีนให้เห็น ลองหยด 1 หยดของสารละลายนี้ในน้ำแป้ง 1 % ดูว่าให้ปฏิกริยากับน้ำแป้งได้สีน้ำเงินหรือไม่ ถ้าเกิดเป็นสีน้ำเงินกับน้ำแป้ง แสดงว่า สารละลายดังกล่าวใช้เป็นสารละลายเนสเลอร์ได้ แต่ถ้าไม่เป็นสีน้ำเงินกับน้ำแป้ง จะต้องหยดสารละลายไอโอดีนในโปตัสเซียมไอโอไดด์ที่ดูดเก็บไว้ตอนต้น 1 มล. นั้นลงไปทีละหยดจนกว่าจะให้ปฏิกริยากับน้ำแป้งแล้วทำให้เป็นสารละลายเจือจางกับ 200 มล. ของน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสักครู่ ค่อย ๆ เทส่วนบนออก ตะกอนปรอทที่เหลือทิ้งไป นำสารละลายส่วนใสนี้ผสมกับ 975 มล.ของ 10 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) คนให้เข้ากับสารละลายนี้เก็บได้นานในอุณหภูมิห้อง

ก. การหาเส้นกราฟมาตรฐานของไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธีของ Kjeldahl

ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นมาตรฐานของไนโตรเจน ชั่งสารนี้ 1.1791 กรัม ละลายใน 0.2 นอร์มอล กรดกำมะถัน 250 มล. (1 มล. = 1.0004 มก.ของไน-

โตรเจน) ทำสารละลายมาตรฐานนี้ให้ได้ปริมาณไนโตรเจนเป็น 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มก. แล้วทำตามวิธี เนสเซอไรเซชั่นต่อไป บันทึกค่าที่ได้ แล้วนำค่า absorbance ที่ได้ไปสร้างกราฟโดยเป็นแกนยืน และปริมาณไนโตรเจน (มก.ต่อหลอด) เป็นแกนนอน

ปริมาณเคดาวน์โปรตีน คำนวนได้จาก

เคดาวน์โปรตีน = 6.25 คูณ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

(ค่า 6.25 คือ ค่าที่ได้จากความจริงที่ว่าโปรตีนส่วนมากจะประกอบด้วยไนโตรเจน 16 % นั่นคือ 16 มก. ไนโตรเจน = 100 มก. โปรตีน และ 1 มก. ไนโตรเจน เท่ากับ 100 ÷ 16 คือ 6.25 มก. ของโปรตีน (70)

ข. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเคดาวน์โปรตีนจากสายใยแห้ง

ชั่งเส้นใยราแห้ง 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองย่อยสลายพร้อมกับ 2 มล. กรดกำมะถันเข้มข้น และ 1 มล. สารละลายย่อยสลาย นำไปย่อยโดยจุ่มลงไปในกระบะทราย ค่อย ๆ เพิ่มความร้อนจนถึงอุณหภูมิ 310 - 320 °ซ. ย่อยเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จนได้สารละลายสีใส นำมาทำให้จาง แล้วดูดสารละลายนี้มา 3 มล. แล้วทำการทดลองต่อตามวิธีเนสเซอไรเซชั่นต่อไป วัดค่า absorbance ที่ 420 นาโนมิเตอร์ ค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในข้อ ก. ค่าจากกราฟ เป็นค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในเส้นใยรา คำนวนออกมาเป็นเปอร์เซนต์ไนโตรเจนต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง แล้วเอาค่า 6.25 คูณจะได้เปอร์เซนต์เคดาวน์โปรตีน

<u>วิธีการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์นอนโปรตีน</u>

การหาเปอร์เซนต์ของนอนโปรตีน หาได้โดยใช้สูตร

นอนโปรตีน = เคดาวน์โปรตีน - ลอรี่โปรตีน

คือ ค่าของเคดาวน์โปรตีนทั้ง ลบออกด้วยปริมาณลอรี่โปรตีน (47)

วิธีคำนวนหาผลผลิตโปรตีนทั้งหมด

การทำโปรตีนเซลเดียว มักคำนึงถึงค่าของผลผลิตโปรตีนทั้งหมด ซึ่งผลผลิตโปรตีนทั้งหมดเป็นลอรี่โปรตีนที่ได้ในสายใยแห้งทั้งหมดที่เลี้ยงในอาหารเหลว 100 มล. จึงเป็นผลคูณของ เปอร์เซนต์ลอรี่โปรตีน กับ น้ำหนักแห้งทั้งหมดที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว 100 มล.

การวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนในสายใยแห้ง

ได้ส่งสายใยแห้งของรา Aspergillus niger สายพันธุ์ A14 และ B1 ไปให้บริษัท Tate & Lyte Limited ประเทศอังกฤษ ให้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่มีในสายใยแห้งนั้น

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับปริมาณโปรตีนใน Aspergillus บางสายพันธุ์ (Preliminary studies)

เพื่อศึกษาให้ทราบถึงเวลาของการที่จะเก็บผลเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงสุดในสายใยและคัดเลือกสายพันธุ์ราที่ใช้ในการทดลองต่อไป จึงเริ่มศึกษาเบื้องต้นโดยเตรียมอาหารเหลวที่ประกอบด้วยน้ำแป้งมันสำปะหลัง 2.3 % pH เริ่มต้น 5.6 (ก่อนเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ) ปริมาตร 100 มล. ใน Erlenmeyer flask 250 มล. บนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที แล้วศึกษา

ก. ศึกษาจำนวนวันที่ราสามารถสร้างโปรตีนได้สูงสุด

ใช้รา Aspergillus 2 สายพันธุ์ คือ A10 และ A14 ที่แยกได้จากแหล่งอาหารที่รับประทานได้ดังกล่าวข้างต้น ในอาหารเหลวที่มีปริมาตร 100 มล. มีแป้งมันสำปะหลัง 2.3 % แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 % และโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 % (2, 30) ใส่อาหารเหลวลงไปใน Erlenmeyer flask 250 มล. pH5.6 ใส่ 1 มล. ของสปอร์ราที่เตรียมไว้ และนับจำนวนสปอร์ได้ 6×10^6 สปอร์ต่อ มล.

(45) ซึ่งเตรียมจากหลอดที่เลี้ยงไว้มีอายุ 5 - 7 วัน แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเพื่อเป็นการเพิ่มการออกซิเจน ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เก็บผลการทดลองทุกวันเป็นเวลา 8 วัน โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตเป็นน้ำหนักแห้ง มีหน่วยเป็นกรัม แล้วนำสายใยแห้งไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และวิธีของ Kjeldahl วัดpH สุดท้ายในน้ำที่กรองได้ และหาปริมาณนอนโปรตีนด้วย การทดลองนี้เพื่อหาวันที่มีการสร้างลอรี่โปรตีนมากที่สุด ใช้วันนั้นเป็นวันที่เก็บผลในการทดลองสภาพต่าง ๆ ต่อไป

ข. วิธีคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการสร้างลอรี่โปรตีนมาก และนอนโปรตีนต่ำ

เมื่อได้วันที่จะเก็บผลจากข้อ (ก) รา Aspergillus ทั้ง 11 สายพันธุ์ ได้ถูกนำมาเลี้ยงในสภาพอาหารเหมือนข้อ (ก) คือ แป้งมันสำปะหลัง 2.3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 0.5 % แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 % โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต pH เริ่มต้น 5.4 มีปริมาตร 100 มล. ใส่ลงใน Erlenmeyer flask 250 มล. จำนวนสปอร์ที่ใส่ 6×10^6 สปอร์ต่อ มล. อายุเชื้อ 5 - 7 วัน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่ 25 °ซ เป็นเวลา 2 วัน จึงเก็บผล เปรียบเทียบการเจริญเติบโตโดยดูจากน้ำหนักแห้ง เปอร์เซนต์ลอรี่โปรตีน เปอร์เซนต์โปรตีน นอนโปรตีน ขนาดของเพลเล็ต และ pHสุดท้าย เพื่อหาสายพันธุ์ราที่จะสร้างลอรี่โปรตีนสูง ได้คัดไว้ 3 สายพันธุ์ คือ A21, A14 และ B1

<u>การเปลี่ยนสภาพต่าง ๆ เพื่อให้ได้โปรตีนสูง</u>

เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีนของ Aspergillus ที่ได้คัดเลือกพันธุ์ไว้ 3 สายพันธุ์ คือ A21, A14 และ B1

ก. ศึกษาปริมาณโปรตีนเมื่อความเป็นกรดและด่างของอาหารเปลี่ยน (pH)

เลี้ยงราที่คัดไว้ 3 สายพันธุ์ (ถือหลักมีโปรตีนสูง นอนโปรตีนต่ำ) แต่ละสายพันธุ์ทำการทดลองเหมือนกันคือ เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2.3 %

$(NH_4)_2SO_4$ 0.5 % KH_2PO_4 0.2 % โดยมี pH ต่างกันดังนี้คือ 2.5, 3.5, 4.5, 5.0, 5.4 และ 6.0 การปรับ pH นั้นใช้ 1 นอร์มอล กรดกำมะถัน แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 2 วัน การเก็บผลทำนองเดียวกับทำในหัวข้อการเก็บผลโปรตีนดังกล่าวข้างต้น แล้วนำไปหาปริมาณโปรตีนน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง pH สุดท้าย ขนาดของเพลเล็ต และเปอร์เซนต์นอนโปรตีน

ข. ศึกษาปริมาณโปรตีนเมื่อให้ไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ใช้เชื้อ 3 สายพันธุ์ดังเดิม แต่ละเชื้อทำการทดลองเหมือนกัน คือเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งมีแป้งมันสำปะหลัง2.3%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%, KH_2PO_4 0.2% pHที่เหมาะสมจากข้อ(ก) นำมาใช้เตรียมเป็น pH เริ่มแรกของการทดลองตอนนี้ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มจาก 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 และ 1.0 % ตามลำดับ นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 2 วัน เก็บผลการทดลองตามวิธีดังกล่าวมาแล้ว นำสายใยแห้งมาหาน้ำหนักแห้ง ลอรี่โปรตีน เคดาวน์โปรตีน ผลผลิตโปรตีนทั้งหมด และนอนโปรตีน น้ำที่กรองได้นำมาหา pHสุดท้ายพร้อมทั้งวัดขนาดของเพลเล็ต และน้ำหนักสดก่อนอบด้วยการเก็บผลเหมือนกับหัวข้อดังกล่าวข้างต้น

ค. ศึกษาความสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

เลี้ยง Aspergillus ดังกล่าว 3 สายพันธุ์ (A21, A14 และ B1) ในอาหารแข็งที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2.3 % $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 % KH_2PO_4 0.2 % วุ้น 1.5 % เทอาหารลงในจานเลี้ยงประมาณ 30 มล. แยกเชื้อจากหลอดทดลองวางลงอาหารที่จะศึกษาอุณหภูมิหลังจากอาหารแข็งตัว แล้วนำไปเลี้ยงในอุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 25, 30, 35, 37, 40 และ 45 °ซ เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี

ง. ศึกษาการเจริญเติบโต ปริมาณโปรตีน และนอนโปรตีนในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่าง ๆ กัน

Aspergillus 3 สายพันธุ์ คือ A21, A14 และ B1 เลี้ยงในอาหารเหลว โดยได้ศึกษาสภาพของการเจริญเติบโตที่เหมาะสมดังกล่าวจากข้อ (ก) ถึง(ค) ใช้สภาพที่เหมาะดังกล่าวของแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหาร ดังสรุปไว้ข้างล่างนี้

สายพันธุ์A21 อาหารเหลวที่ใช้ $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 % KH_2PO_4 0.2 % pH เริ่มต้น 3.5

สายพันธุ์A14 อาหารเหลวที่ใช้ $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 %, KH_2PO_4 0.2 % pH เริ่มต้น 5.0

สายพันธุ์B1 อาหารเหลวที่ใช้ $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 %, KH_2PO_4 0.2 % pH เริ่มต้น 3.5

แต่ละสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมแป้งลงไปตามความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.3, 3.0 และ 5.0 % แต่ละสูตรทำสองชุด ใช้ขวดขนาด 250 มล. มีอาหาร 100 มล. และใช้เชื้อสปอร์ 6×10^6 สปอร์ต่อ มล. ปริมาณ 1 มล. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาทีที่ 25° ซ เก็บผลการทดลองทุกวันโดยเปรียบเทียบน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ขนาดของเพลเล็ต pHสุดท้าย ลอรี่โปรตีน เคดาวน์โปรตีน ผลผลิตโปรตีนทั้งหมด และนอนโปรตีน