

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์

- 1.1 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
- 1.2 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)
- 1.3 กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1)
- 1.4 กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope)
- 1.5 เครื่องเขย่า (Shaker)
- 1.6 เข็มเย็บเชื้อ (Needle)
- 1.7 ตู้เย็บเชื้อ (Laminar air flow hood)
- 1.8 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
- 1.9 เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง (2-decimal balance)
- 1.10 เครื่องชั่งสารทศนิยม 3 ตำแหน่ง (3-decimal balance)
- 1.11 เตาแม่เหล็กไฟฟ้า (Hot plate)
- 1.12 ตู้อบอุณหภูมิสูง (Hot air oven)
- 1.13 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

2. สารเคมี

- 2.1 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethanol)
- 2.2 พงู้น (Agar)
- 2.3 เดรกโทส (Dextrose)
- 2.4 กลีเซอรอล (glycerol)

3. เครื่องแก้ว

- 3.1 จานเพาะเลี้ยง (Petri dish)
- 3.2 หลอดทดลอง (Test tube)
- 3.3 กระบอกตวง (Graduated cylinder) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.4 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.5 แท่งแก้วคนสาร (Stirrer)
- 3.6 ปิเปต (Pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.7 ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100 และ 1000 ไมโครลิตร
- 3.8 แท่งแก้วรูปตัววี และแท่งแก้วรูปตัว L (Spreader)
- 3.9 ขวดเก็บสารก้นกลม
- 3.10 ขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 200, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.11 ขวดเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Duran)

4. อุปกรณ์อื่นๆ

- 4.1 ถุงพลาสติก (Plastic bag)
- 4.2 สำลี (Cotton wool)
- 4.3 ยางรัด (Rubber band)
- 4.4 กระดาษทิชชู
- 4.5 สไลด์ และกระจกปิดสไลด์ (Slide and cover slide)
- 4.6 ผ้าขาวบาง
- 4.7 ถุงมือ (nitrile gloves blue)

5. เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

- 5.1 *Colletotrichum* sp.
- 5.2 *Aspergillus niger*
- 5.3 *Aspergillus flavus*
- 5.4 *Penicillium* sp.
- 5.5 *Mucor rouxii*

(สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

วิธีดำเนินงาน

1. การศึกษาการผลิตไคโตซาจากเชื้อรา *Mucor rouxii* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

การเตรียมสปอร์เชื้อรา *Mucor rouxii*

เจียเส้นใยราที่เลี้ยงบนอาหารPDA เป็นเวลา 7 วัน ลงในอาหารPDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์เติมน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 (0.05%) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 40 มิลลิลิตรต่อขวดชมพู กรองสารละลายสปอร์ผ่านสำลีเพื่อแยกเส้นใยของราออก ตรวจสอบจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ ปรับความเข้มข้นสปอร์อยู่ระหว่าง $1-3 \times 10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Mucor rouxii* ในขวดรูปชมพู่

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BG medium ที่เติมแหล่งคาร์บอน คือ แป้งข้าวเจ้า ที่ปรับความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นใส่กลัสปอร์เชื้อรา *M.rouxii* ลงไปขวดรูปชมพู่ 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อวิเคราะห์หาค่าฟิโอส น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไคโตซาน

2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เติมแหล่งคาร์บอน คือ แป้งข้าวเจ้า ที่ปรับความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นใส่กลัสปอร์เชื้อรา *M.rouxii* ลงไปขวดรูปชมพู่ 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อวิเคราะห์หาค่าฟิโอส น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไคโตซาน

การศึกษาคุณสมบัติของสารละลายไคโตซานที่สกัดได้

1. วัดค่าฟิโอสโดยเครื่อง pH-meter ทำการเปิดเครื่องวัด pH เพื่ออุ่นเครื่องก่อนวัดประมาณ 5-10 นาที แล้ว calibrate ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH อยู่ในช่วงที่คาดว่าใกล้เคียงกับตัวอย่างที่จะวัด ล้างหัววัดด้วยน้ำกลั่น และซับให้แห้งก่อนวัด pH ทุกๆ ครั้ง หรือทุกๆ ตัวอย่างของน้ำที่วัด เติสารละลายไคโตซานที่วัดลงในบีกเกอร์ แล้วทำการวัด pH โดยแกว่งหัววัดเบาๆ เมื่อค่า pH หยุดนิ่งประมาณ 10 วินาที จดบันทึกค่าที่วัดได้ ทำความสะอาดหัววัด แล้วเก็บเข้าที่ให้เรียบร้อย

2. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ข) ทำการดูดตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลจำนวน 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองสำหรับหลอดที่ไม่มีสารตัวอย่าง(blank) ใช้น้ำกลั่น แล้วเติม DNS solution ลงไปในแต่ละหลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว โดยการนำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง จึงเติมน้ำให้ครบ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาล ที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอน

3. นำหนักเซลล์แห้งนำโคโคซานที่เก็บในแต่ละช่วงมารองเอาเซลล์ออกจากกระดวยกรอง (ที่อบจนน้ำหนักคงที่) น้ำใส่ที่ได้เก็บไว้วิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

วิธีการสกัดโคโคซาน

นำตัวอย่างที่เก็บแต่ละช่วงปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองเซลล์ด้วยกระดวยกรองล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้น้ำหนักเซลล์เปียก : 1 N NaOH เท่ากับ 1:20 กรองส่วนของผนังเซลล์ด้วยกระดวยกรองล้างด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง นำผนังเซลล์ที่ได้ไปสกัดโคโคซาน โดยใช้กรดแอสติก 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำน้ำส่วนใสที่ได้จากการกรองมาตกตะกอนโคโคซานด้วยด่าง(2 N NaOH) ปรับพีเอชเท่ากับ 10 จากนั้นเหวี่ยงแยกตะกอนโคโคซานที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ล้างตะกอนโคโคซานด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำ โคโคซานไปทำให้แห้ง

2. การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Mucor rouxii* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

นำผลการศึกษาการผลิตโคโคซานโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 มาทำการถ่ายกลาสปอร์เชื้อรา 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BG medium และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ปริมาตร 1.5 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 5 วันเพื่อวิเคราะห์หาค่าพีเอช น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโคซาน

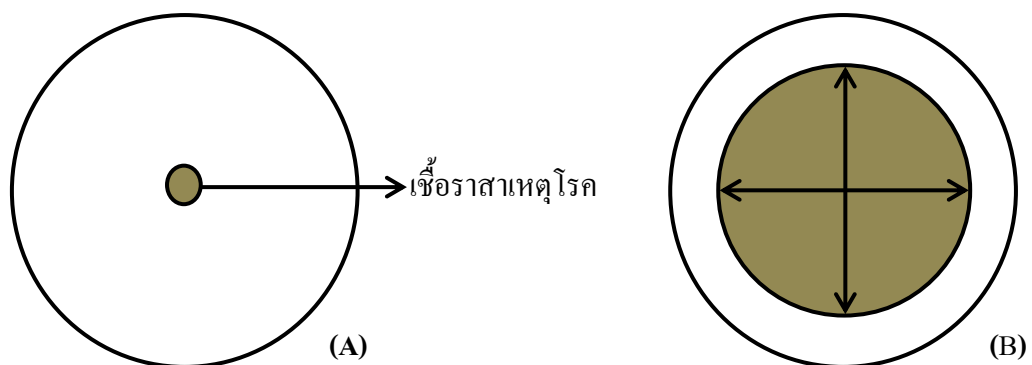
3. การศึกษาผลของสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* และไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคลำไส้

การเตรียมเชื้อราสาเหตุของโรคลำไส้ที่ใช้ในการทดสอบ

นำเชื้อรา *Colletotrichum* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* และ *Penicillium* sp. มาเลี้ยงบนอาหาร PDA หลอดละ 1 เชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน ปิดหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์มอีกรอบ เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดไคโตซานในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคลำไส้ ทดสอบโดยวิธี culture disc technique

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วผสมสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* และไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) ลงในอาหาร PDA ให้ได้ความเข้มข้น 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเทอาหารที่ผสมสารสกัดไคโตซานลงในจานเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของชุดควบคุมจะไม่ผสมสารสกัดไคโตซาน หลังจากผิวหน้าของอาหารที่ผสมสารสกัดและชุดเปรียบเทียบแห้งสนิท นำชิ้นวุ้นที่ได้จากการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะเส้นใยรอบโคโลนีเชื้อราที่มีอายุ 7 วัน วางลงบนผิวหน้าอาหารที่ผสมสารสกัดไคโตซาน นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ดังภาพที่ 3.1



$$\text{ค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อราบนอาหาร} = \frac{X + Y}{2}$$

ภาพที่ 3.1 การทดสอบประสิทธิภาพไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค (percent inhibition of radica growth; PIRG)

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยมีสูตร ดังนี้

$$PIGR = \frac{(R_1 - R_2) \times 100}{R_1}$$

R_1 = ความยาวรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม สร้อยทอง, 2532)

> 75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก

61 - 75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง

51 - 60 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง

≤ - 50 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ