ขั้นตอนการแยก/การสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์ในธรรมชาติ โดยห้องปฏิบัติการแผนกวิจัยและพัฒนาบริษัทโปรไบโอติกแอนด์เฮอร์บัล

ขั้นตอนการคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

1.การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

ตัวอย่างเชื้อรา

↓

แช่ใน 95% ethanol นาน 30 วินาที

↓

แช่ใน 5% Sodium hypochloride นาน 5 นาที

↓

แช่ใน 95% ethanol นาน 30 วินาที

↓

ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นาน 3-5 วินาที

↓

วางบน PDA (เติม tetracycline+ampicillin 50 mg/l

↓

บ่มที่ 25 องศาเซลเซียน นาน 3-5 วัน

↓

นำส่วน Hyphal tip เลี้ยงบนอาหาร PDA (ไม่เติม antibiotic)

↓

บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

↓

เก็บใน PDA slant

2.การเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว

นำเชื้อราบริสุทธิ์จากข้อ 1

↓

เพาะเลี้ยงในอาหาร PDA

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3-4 วัน

↓

ใช้ใบมีผ่าตัดจุ่ม 95% ethanol

↓

ตัดชิ้นส่วนบริเวณของขอบโคโลนีให้มีขนาดชิ้นละ 1x1 ซม. (จำนวน 5 ชิ้น)

↓

ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 300 มล.

↓

บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 สัปดาห์

↓

นำเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

3.การสกัดสารจากเชื้อราเอนโดไฟต์

นำเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงจำนวน 8 ลิตร

กรองแยกน้ำเลี้ยงเชื้อราและเส้นใย

นำเส้นใยมาแช่ในเมทานอลเป็นเวลา 2 วันจำนวน 2 ครั้ง

กรองเอาเส้นใยออกและนำสารสกัดไประเหยตัวทำละลาย

เติมน้ำกลั่น 100 มล.

สกัดด้วยเฮกเซนครั้งละ 300 มล. จำนวน 2 ครั้ง

นำชั้นน้ำที่แยกได้ไปสกัดต่อด้วยเอทิลอะซีเตต ครั้งละ 300 มล.(2ครั้ง)

ระเหยตัวทำละลายจะได้สารสกัดหยาบ