บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเก็บรักษาเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 การเก็บรักษาเชื้อในระยะสั้น

เขี่ยสปอร์เชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ลงบน slant agar สูตร Fukumoto ซึ่งปรับปรุงโดยเอก แสงวิเชียร (ภาคผนวก ก) ที่มีเดกซ์แทรนความเข้มข้น 1.0 % บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จนสปอร์เจริญเต็มที่เก็บที่ 8-10 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

3.1.2 การเก็บรักษาเชื้อในระยะยาว

เก็บสปอร์ของเชื้อราโดยวิธี Lyophilization

3.2 การเลี้ยงเชื้อราในขวดแก้วทรงกรวย

เติมน้ำกลั่นผสม 0.1 % ของ tween 80 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว,121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที) แล้วลงในหลอดเก็บเชื้อราจากข้อ 1 ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาลอยอยู่ในน้ำ นับสปอร์เริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 5×10^7 สปอร์ต่อมล. โดยใช้ haemacytometer (ภาคผนวก ค) ถ่ายสปอร์แขวนลอย 2 มล. ลงใน 100 มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามสูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างโดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวออกมา 5 มล.กรองผ่านกระดาษกรอง whatmanเบอร์ 1 นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์แอคติวิตีเอนไซม์

ตามวิธีในข้อ 3.3

3.3 <u>การตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา</u>

โดยวิธีการของ Fukumoto และคณะ (1971) ดังนี้ น้ำสารละลาย 0.625 % เดกซ์แทรน T2000 ใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 0.4 มล. ผสมกับ 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 อีก 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 0.1 มล.ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส หรือ น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการแยกเซลล์ (culture filtrate) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปรับปรุงโดย เอก (2532) เป็นเวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที นำไปตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปล่อยออกมาโดยวิธีของ Somogyi (1952) - Nelson (1944)

[1 หน่วย (unit)ของเดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรน T2000 ได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ]

3.3.1 <u>การเตรียมสับสเตรท</u> ชั่งเดกซ์แทรน T2000 0.625 กรัมละลายในอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 5.5 และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดเตรียมสาร (volumetric flask)

3.4 <u>การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi(1952)-Nelson(1944)</u>

นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปริมาณ 1 มล.เติมสารละลาย Alkaline copper reagent (ภาคผนวก ข) จำนวน 1 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วเติม สารละลาย Nelson reagent(ภาคผนวก ข) จำนวน 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เติมน้ำขจัดไอออนแล้ว 5 มล.ผสมให้เข้ากันนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm.

คำนวณค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากผลต่างที่เวลาต่างๆ จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมล.

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry (1951)

นำ 1.0 มล.ของสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ เติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข) จำนวน 5.0 มล.ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จึงเติมสารละลายผสม Lowry D (ภาคผนวก ข) จำนวน 0.5 มล.ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm. เปรียบเทียบค่าของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่ใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมล.

3.6 การตรวจวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ (Growth)

โดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง (dry weight) ของเซลล์ซึ่งทำโดยการนำเซลล์ซึ่งอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ทราบปริมาตรแน่นอน มากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ที่ทราบน้ำหนักคงที่ อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงจนน้ำหนักคงที่ ชั่งหาน้ำหนักแห้ง แล้วคำนวณหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

3.7 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNSA (Bernfeld,1955)

ผสม 1.0 มล.ของสารละลายที่จะวิเคราะห์ กับ 1.0 มล.ของสารละลาย DNSA (ภาคผนวก ข) เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลานาน 10 นาที ทำให้เย็นลงทันที เติมน้ำปลอดไอออน 10 มล. ลงไปแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm. หาค่าของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ โดยอาศัยกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมล.

3.8 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl (Leonard,1987)

ใช้ตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน 1-2 มล. เติมตัวคะตะไลส์ 7 กรัม (ภาคผนวก ข) และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มล.ลงไป นำไปอุ่นบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มล.นำตัวอย่างไปกลั่นด้วยเครื่อง Buchi โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข) จำนวน 50 มล. นำเอาขวดที่บรรจุกรดบอริก 4 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข) 100 มล. ซึ่งเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข) 2-3 หยด มารองรับสารละลายที่กลั่นได้จนกระทั่งมีปริมาตรรวม 200 มล.หรือสีของสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีม่วงแล้วจึงนำไปไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ไตเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเขียวใส คำนวณหาปริมาณไนโตรเจน จากสูตรข้างล่างนี้

$$\text{เปอร์เซนต์ไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times C \times 1.4}{V}$$

A = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

C = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

V = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

3.9 การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

3.9.1 เอนไซม์เซลลูเลสรวม (Cellulase activity) โดยวิธีของ Wood และ McCrae (1978)

สับสเตรท (substrate) : สารละลาย 5% ของ α-cellulose ใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.8

เติม 0.4 มล.ของสับสเตรทลงในหลอดทดลองที่บรรจุ 1.4 มล.ของ

0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.8 เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 0.2 มล. ของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้นที่พอเหมาะ เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชม. หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นลงทันที ปั่นแยกตะกอนโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในข้อ 3.7

[1 หน่วยของเซลลูเลสรวม หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1ไมโครโมลต่อชั่วโมงภายใต้สภาวะที่ทดลอง]

3.9.2 <u>การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของ Exoglucanase (C_1) โดยวิธีของ Wood</u> (1979)

สับสเตรท : สารละลายผสมของ 1 % avicel และ 0.25 % arosil 200 ใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.8

เติม 1.0 มล.ของสับสเตรทลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 0.5 มล.ของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้นพอเหมาะ เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 5 นาที ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในข้อ 3.7

[1 หน่วยของ C_1 หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย avicel แล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง]

3.9.3 <u>การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของ Endoglucanase (C_x) โดยวิธี Ryu และ Mandel (1980)</u>

สับสเตรท : สารละลาย 1% คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) ใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.8

เติม 1.0 มล.ของสับสเตรทลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 0.5 มล.ของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้นพอเหมาะ เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็น ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในข้อ 3.7

[1 หน่วยของ C_x หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย CMC ได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง]

3.9.4 <u>การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของ β-glucosidase (cellobiase)โดยวิธี Ryu และ Mandel (1980)</u>

สับสเตรท : สารละลาย 1 % ซาลิซินใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8

เติม 1.0 มล.ของสับสเตรทลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 0.5 มล.ของสารละลายเอนไซม์เบต้า-กลูโคสิเดสที่ความเข้มข้นพอเหมาะ เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีหยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็น วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในข้อ 3.7

[1 หน่วยของเบต้า-กลูโคสิเดส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายซาลิซินได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง]

3.10 การศึกษาความเข้มข้นกลูโคสเพิ่มเติมที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก โดยแปรความเข้มข้นกลูโคสเพิ่มเติมในอาหาร ตั้งแต่ 0 - 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ Rotary shaker อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน ตามวิธีการในข้อ 3.2 ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ ปริมาณโปรตีน การเจริญของเชื้อ ความเป็นกรด-ด่างตามวิธีการในข้อ 3.3 ข้อ 3.4 ข้อ 3.5 และข้อ 3.6 ตามลำดับ

3.11 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดที่ผ่านการอบจนแห้งสนิทดีที่ 80 องศาเซลเซียส มาทำการบด ร่อน และคัดขนาด 50 เมช (mesh) และทำการปรับสภาพก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า-กลูโคสิเดสด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้

ก. 1-5 % H_2SO_4 และ 1-10 % NaOH ที่อุณหภูมิห้องโดยแปรเวลาต่างๆ คือ 10 30 60 90 และ 120 นาที

ข. 4 % NaOH ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แปรผันเวลาต่างๆ คือ 10 30 60 90 และ 120 นาที

ค. การอบไอน้ำยายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส แปรผันเวลาต่างๆ คือ 15 30 และ 60 นาที

ง. 1-10 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำยายใต้ความดัน แปรผันเวลาต่างๆ คือ 15 30 และ 60 นาที

ล้างวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพต่างๆ แล้วด้วยน้ำประปาจนกระทั่งน้ำที่ผ่านวัสดุออกมามีความเป็นกรดด่างประมาณ 7.0 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง คัดเลือกวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมด้วยวิธีในข้อ 3.12

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.12 <u>การคัดเลือกวิธีการปรับสภาพวัสดุที่เหมาะสมด้วยเอนไซม์</u>

ชั่ง 1 กรัม ของวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพจากแต่ละวิธีแล้วจากข้อ 3.11 ใส่ใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.8 ซึ่งบรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบ Rotary shakerอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติมเอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกับ เบต้า-กลูโคสิเดส ที่ความเข้มข้น 656 และ 16 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งของวัสดุ ตามลำดับ โดยให้ปริมาตรรวมบัฟเฟอร์เป็น 50 มล.บ่มต่อที่อุณหภูมิและสภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นลงทันที ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการในข้อ 3.7 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น เลือกวิธีปรับสภาพที่ดีที่สุด เพื่อนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อไป

3.13 <u>ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุที่ปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์</u>

3.13.1 <u>ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุ</u>

ชั่ง 1 กรัมของชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วย 1 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำยายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121° ซ. 15 นาที ใน 0.05 M ของบัฟเฟอร์ซึ่งแปรผันความเป็นกรดด่างต่างๆ ตั้งแต่ 4.0-9.0 ดังนี้ คือ

อะซีเตทบัฟเฟอร์ (pKa = 4.76) ครอบคลุมความเป็นกรดด่าง 4.0 4.5 4.8 5.0 5.5

ซัคสิเนทบัฟเฟอร์ (pKa = 5.64)ครอบคลุมความเป็นกรดด่าง 5.5 6.0

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pKa = 6.82) ครอบคลุมความเป็นกรดด่าง 6.0 6.5 7.0 7.5

ทริส-ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) บัฟเฟอร์ (pKa =8.07) ครอบคลุมความเป็นกรดด่าง 7.5 8.0 9.0

ใส่ในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่า อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที ที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จึงเติมเซลลูเลสและเบต้า-กลูโคสิเดส ที่ความเข้มข้น

70 และ 10 หน่วยต่อกรัมวัสดุ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ และสภาวะเดิมต่อเป็นเวลาอีก 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นลงทันที ปั่นแยกกากด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีในข้อ 3.7 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น

3.13.2 <u>ชนิดของบัฟเฟอร์</u>

ชั่ง 1 กรัมของชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วย 1 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำยายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ. (autoclave) เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว ใส่ใน 0.05 M บัฟเฟอร์ ชนิดต่างๆ คือ ซิเตรท อะซีเตท และ ซัคซิเนท บัฟเฟอร์ ซึ่งมีความเป็นกรดด่าง 4.5 4.8 และ 5.0 ปริมาตร 50 มล.ในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. ทำการทดลองด้วยวิธีการและสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.13.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีในข้อ 3.7 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น

3.13.3 <u>อุณหภูมิที่เหมาะสม</u>

ชั่ง 1 กรัมของชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วย 1 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำยายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ. เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว ใส่ใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาตรรวม 50 มล. ทำการทดลองด้วยวิธีการและสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.13.1 แต่แปรอุณหภูมิในการบ่มระหว่าง 30-60 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการในข้อ 3.7 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น

3.13.4 <u>ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซลลูเลส</u>

ชั่ง 1 กรัมของชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วย 1 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำยายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ. เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว ใส่ใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 ซึ่งบรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40° ซ. เป็นเวลา 5 นาที จึงเติมเอนไซม์เซลลูเลสโดยแปรความเข้มข้นตั้งแต่ 10 - 100 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย (โดยไม่เติมเอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดส) ให้ปริมาตรรวมในบัฟเฟอร์เป็น

50 มล.บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นทันที ปั่นแยกกากด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการในข้อ 3.7 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น

3.13.5 <u>เวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายด้วยเซลลูเลส</u>

ชั่ง 1 กรัมของชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วย 1 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ. เป็นเวลา 15 นาทีแล้วใส่ใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40° ซ. เป็นเวลา 5 นาที จึงเติมเอนไซม์เซลลูเลส โดยเปรียบเทียบระหว่างปริมาณ 80 และ 100 หน่วย และแปรระยะเวลาในการบ่มตั้งแต่ 0-72 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาการบ่มเก็บตัวอย่าง 5 มล. หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ปั่นแยกกากออกแล้วนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น จากนั้นเติมเบตา-กลูโคสิเดส ความเข้มข้น 60 หน่วยต่อกรัมชานอ้อยบ่มต่อที่สภาวะและอุณหภูมิเดิมอีก 6 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ปั่นแยกกากด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น ตามวิธีการในข้อ 3.7

3.13.6 <u>เวลาในการเติมเบตา-กลูโคสิเดส</u>

ชั่ง 1 กรัมของชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วย 1 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ. เป็นเวลา 15 นาทีแล้วใส่ใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 ที่บรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล.บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40° ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จึงเติมเอนไซม์ โดยทำการศึกษาใน 2 สภาวะ คือ

ก) เติมเอนไซม์เซลลูเลส พร้อมกับ เบตา-กลูโคสิเดส ความเข้มข้น 80 และ 60 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย โดยให้ปริมาตรรวมเป็น 50 มล. ย่อยชานอ้อยที่อุณหภูมิและสภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชม. หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 5 นาที ปั่นแยกกาก

ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ความเร็ว 3000 รอบ/นาที 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการในข้อ 3.7

ข) เติมเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้น 80 หน่วยต่อกรัมซานอ้อย ย่อยซานอ้อยที่อุณหภูมิและสภาวะเดียวกันเป็นเวลา 24 ชม. หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เก็บตัวอย่าง 5 มล.ปั่นแยกกากออก นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการย่อยซานอ้อยด้วยเซลลูเลส ส่วนที่เหลือจึงเติมเอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดส ความเข้มข้น 60 หน่วยต่อกรัมซานอ้อย บ่มต่อที่อุณหภูมิและสภาวะเดิมอีก 6 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ปั่นแยกกากออก นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากเบตา-กลูโคสิเดส รวมปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นในข้อ ก)

3.13.7 <u>ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเบตา-กลูโคสิเดส</u>

ชั่ง 1 กรัมของซานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วย 1 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ. เป็นเวลา 15 นาทีแล้วใส่ใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 ซึ่งบรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล.บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40° ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาทีเป็นเวลา 5 นาที จึงเติมเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้น 80 หน่วยต่อกรัมซานอ้อย พร้อมกับเบตา-กลูโคสิเดส ซึ่งแปรผันความเข้มข้น ตั้งแต่ 5-240 หน่วยต่อกรัมซานอ้อย โดยให้ปริมาตรรวมบัฟเฟอร์เป็น 50 มล. บ่มต่อที่อุณหภูมิและสภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชม. หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 5 นาที ปั่นแยกกากด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ความเร็ว 3000 รอบ/นาที 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น ตามวิธีการในข้อ 3.7

3.13.8 <u>ปริมาณซานอ้อยเริ่มต้น</u>

ทำการย่อยซานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วย 1 % NaOH ร่วมกับการออโตเครบ 15 นาที โดยแปรผันความเข้มข้นของซานอ้อยเริ่มต้นจาก 1.0 - 20.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใน 0.05 M ของอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาตรรวม 50 มล. ในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ เอนไซม์

เบตา-กลูโคสิเดส ปริมาณ 80 และ 120 หน่วย ตามลำดับ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40° ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชม. หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ปั่นแยกกากด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ความเร็ว 3000 รอบ/นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นตามวิธีการในข้อ 3.7 และคำนวณความเข้มข้นเซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดสต่อกรัมน้ำหนักแห้งชานอ้อยเริ่มต้น

3.14 <u>การขยายขนาดการเตรียมไฮโดรไลเสทของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน</u>

ทำการย่อยสารละลาย 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของชานอ้อยและฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 1% NaOHร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ. เป็นเวลา 15 นาที ระข้าว และ แกลบซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วย 1 % NaOH ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 และ 30 นาที ตามลำดับ ในอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาตรรวม 150 มล.ในขวดทรงกรวยขนาด 500 มล. ความเข้มข้นของเซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดสที่ 40 และ 60 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งของวัตถุดิบ ตามลำดับ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 40° ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ปั่นแยกกากด้วยเครื่องปั่นแยกแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) rotor ชนิด JA-14 ความเร็ว 5,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Lyophiliser หรือ Freeze Dryer แล้ววิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในไฮโดรไลเสทด้วยเครื่องวิเคราะห์กลูโคส (glucose analyzer) เก็บสารละลายน้ำตาลที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

3.15 <u>การเตรียมไฮโดรไลเสทของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน</u>
(เกษม,2536)

วัสดุการเกษตรที่ใช้ ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน กากเมล็ดฝ้าย

ชั่งวัตถุดิบ 120 กรัมใส่ในภาชนะที่ทนกรด เติมกรดซัลฟูริก 1 นอร์มอลจำนวน 40 มล.นำไปนึ่งอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส, ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

เป็นเวลา 40 นาที ทำให้เย็นแล้ว เติมน้ำยจัดไอออนปริมาตร 80 มล. จากนั้นนำไปปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ประมาณ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 N และนำมาตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (rotor ชนิด JA-14) ที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสมา วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl (Leonard, 1987) และทำให้แห้งด้วยเครื่อง Lyophiliser หรือ Freeze Dryer เก็บในตู้เย็น จนกว่าจะนำมาใช้

3.16 <u>ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส เมื่อใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน</u>

3.16.1 <u>ชนิดของแหล่งคาร์บอน</u>

ใช้ไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยชานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และ แกลบ ด้วยเอนไซม์จากข้อ 3.14 ในปริมาณ 0.1 % ของกลูโคสในไฮโดรไลเสท เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับ 0.5 % เดกซ์แทรน (น้ำหนักโมเลกุล 3-50 x 10^6) ซึ่งเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เพื่อทดแทน 1.0 % เดกซ์แทรน ในสูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก ทำการเลี้ยง *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารควบคุมที่มี 0.1 % กลูโคสบริสุทธิ์ ร่วมกับ 0.5 % เดกซ์แทรน และเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก โดยวิธีการในข้อ 3.2 ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างโดยดูดอาหารเหลวออกมา 5 มล. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 วิเคราะห์แอคติวิตีเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และการเจริญของเซลล์ โดยวิธีการในข้อ 3.3 ข้อ 3.5 และข้อ 3.6 ตามลำดับ

3.16.2 <u>เวลาที่เหมาะสมในการเติมสารชักนำการสร้างเอนไซม์</u>

เลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ด้วยสูตรอาหารดัดแปลง

(ภาคผนวก ก) ที่มีไฮโดรไลเสทของชานอ้อยในปริมาณ 0.1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เมื่อเทียบกับกลูโคส และ 1.0 % เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ ด้วยวิธีการในข้อ 3.2 แต่แปรระยะเวลาในการเติมเดกซ์แทรน ตั้งแต่ 0-48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างโดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 5 มล. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 วิเคราะห์แอคติวิตีเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และการเจริญของเซลล์ ด้วยวิธีการในข้อ 3.3 ข้อ 3.5 และข้อ 3.6 ตามลำดับ.

3.16.3 <u>ปริมาณแหล่งคาร์บอนและสารชักนำสำหรับการสร้างเอนไซม์</u>

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก) โดยแปรผันปริมาณไฮโดรไลเสทของชานอ้อยตั้งแต่ 0.1-0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) และ ปริมาณของเดกซ์แทรน ตั้งแต่ 0.5-1.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำการทดลองโดยวิธี Factorial Design (3x3) เลี้ยงเชื้อในสภาวะอุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างโดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 5 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1 วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และ การเจริญของเซลล์ ตามวิธีการในข้อ 3.3 ข้อ 3.5 และ ข้อ 3.6 ตามลำดับ

3.17 <u>ศึกษาการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับผลิตเดกซ์แทรนเนส</u>

3.17.1 <u>ชนิดของแหล่งไนโตรเจน</u>

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก) ที่มี ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย ปริมาณ 0.1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) เป็นแหล่งคาร์บอน และ 1.0 % เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ โดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ไฮโดรไลเสทของ

กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน และ กากเมล็ดฝ้าย เปรียบเทียบกับการใช้ $NaNO_3$ ในปริมาณเท่ากันคือ 0.2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เลี้ยงเชื้อราในอุณหภูมิห้อง (30 - 35 องศาเซลเซียส) อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างโดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 5 มล.กรองผ่านกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1 วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และ การเจริญของเซลล์ โดยวิธีการในข้อ 3.3 ข้อ 3.5 และ ข้อ 3.6 ตามลำดับ

3.17.2 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก) แต่แปรผันปริมาณของ $NaNO_3$ ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน ตั้งแต่ 0.05 - 0.3 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสภาวะอุณหภูมิห้อง (30 - 35 องศาเซลเซียส) อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างโดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 5 มล. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1 วิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตี ปริมาณโปรตีน และการเจริญของเซลล์ โดยวิธีการในข้อ 3.3 ข้อ 3.5 และข้อ 3.6 ตามลำดับ

3.18 ผลของสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

เลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในอาหารสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีไฮโดรไลเสทของชานอ้อยในปริมาณ 0.1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) เป็นแหล่งคาร์บอน 1.0 % เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ 0.2 % $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการทดลองโดยเปรียบเทียบระหว่างการเติมและไม่เติม 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ เลี้ยงเชื้อในสภาวะอุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างโดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 5 มล. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1 วิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตี ปริมาณโปรตีน และการเจริญของเซลล์ โดยวิธีการในข้อ 3.3 ข้อ 3.5 และข้อ 3.6 ตามลำดับ