

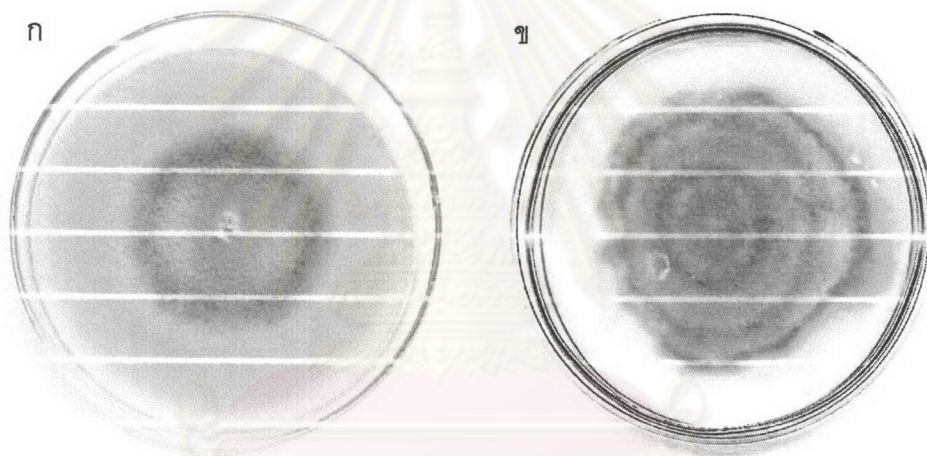
บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อราที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 *Trichoderma reesei* QM9414 จากห้องปฏิบัติการการใช้ประโยชน์จากชีวมวลของพืช (Plant Biomass Utilization Research Unit) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รูปที่ 3.1)

3.1.2 *Trichoderma reesei* Rut C-30 จากห้องปฏิบัติการการใช้ประโยชน์จากชีวมวลของพืช (Plant Biomass Utilization Research Unit) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 เชื้อรา *T. reesei* ที่ใช้ในงานวิจัย

ก. *T. reesei* QM9414

ข. *T. reesei* Rut C-30

3.2 วัสดุและอุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์/ครุภัณฑ์	บริษัท/ประเทศ
กล่องควบคุมสภาพแสงสำหรับถ่ายภาพดิจิทัล (digital image box)	Medalight Company Limited, Thailand
กล้องดิจิทัลรุ่น Nikon Coolpix 4300	Nikon Corporation, Japan

วัสดุอุปกรณ์/ครุภัณฑ์	บริษัท/ประเทศ
ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow	-
เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น SPL 15-MP	Labcon, South Africa
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น U4600P	Sartorius, Germany
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC205	Denver Instrument Company, USA
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Hettich Rotofix 32	Global Medical Instrumentation, Inc., USA
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น SpectroQuest 2800	Unico, USA
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (thermostated water bath) รุ่น maxi-shake	Heto-Holten AS, Denmark
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SA-500K	Sturdy Industrial Co., Ltd., Taiwan
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Professional meter PP-50	Sartorius, Germany
ปิเปตอัตโนมัติขนาด 50 1,000 และ 5,000 μ l	Biohit Corporation, Finland
ชุดเครื่องแก้ว	Pyrex, New York, USA
ชุดเครื่องแก้ว Duran Scott	Schott Duran, Germany
กระดาษกรอง Whatman No.1	Whatman International Ltd., England

3.2.2 ซอฟต์แวร์

ซอฟต์แวร์	บริษัท/ประเทศ
DIB Color Measurement Software	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางภาพถ่ายและ เทคโนโลยีทางการพิมพ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย
SPSS 13.0	SPSS Inc., USA

3.2.3 สารเคมี

ชนิด	บริษัท/ประเทศ
วุ้นผงตรานางเงือก	พัฒน์สินเอนเตอร์ไพรส์, ประเทศไทย
Albumin from bovine serum	Fluka Chemie, Switzerland
3,5-Dinitrosalicylic acid	
di-Sodium hydrogen arsenate heptahydrate (AsHNa ₂ O ₄ ·7H ₂ O)	
Tween 80	
Yeast extract	
Ammonium molybdate (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	Mallinckrodt Chemical, Inc., USA
Ammonium sulfate (NH ₄) ₂ SO ₄	Scharlau Chemie, Spain
Calcium hydrogen phosphate dihydrate (CaHPO ₄ ·2H ₂ O)	
α-Cellulose	Sigma-Aldrich, Inc., Germany
Corn steep liquor	
Citric acid C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	Asia Pacific Specialty Chemicals Limited, Australia
Congo red (C ₃₂ H ₂₂ N ₆ Na ₂ O ₆ S ₂)	
D-Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO ₃)	
Potassium sodium (+)- tartrate (KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O)	
Cobalt chloride (CoCl ₂)	MAY & BAKER Ltd., England
Ferrous sulphate (FeSO ₄)	
Manganese sulphate (MnSO ₄)	
Zinc sulphate (ZnSO ₄)	
Copper sulphate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	Carlo Erba Reagenti, Italy
Magnesium sulphate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	
tri-Sodium citrate dihydrate (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)	
Sodium hydroxide anhydrous pellets (NaOH)	
Sulfuric acid (H ₂ SO ₄)	

ชนิด	บริษัท/ประเทศ
Hydrochloric acid (HCl)	Merck, Germany
Manganese sulphate (MnSO ₄)	
Phenol (C ₆ H ₅ OH)	
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	
Sodium sulfate anhydrous (NaSO ₄)	
Sodium bisulfate granular (Na ₂ S ₂ O ₅)	J.T. Baker Inc., USA

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การวัดเซลล์เลสแอกทิวิตี

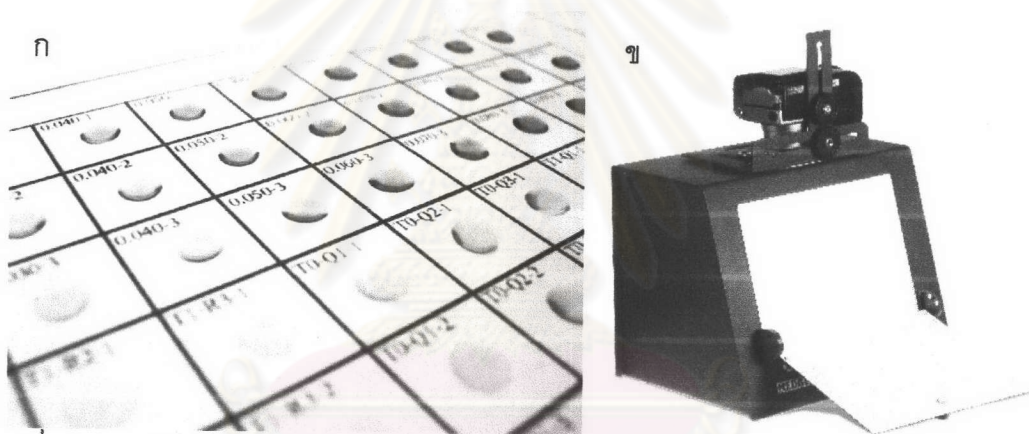
นำเชื้อรา *T. reesei* สายพันธุ์ QM9414 และ Rut C-30 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) จำนวน 5 ช้อน ใส่ลงในขวดอาหาร Production Medium (ภาคผนวก ก) สำหรับผลิตเซลล์ นำขวดอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำอาหารทั้งหมดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสนำไปวิเคราะห์แอกทิวิตีของเซลล์เลสในขั้นตอนต่อไป (Punnapayak, Kuhirun and Pomthep, 1999) โดยผลิตเซลล์เลสทั้งหมด 3 ช้อน และนำเซลล์เลสที่ผลิตได้ในแต่ละช้อนมาวิเคราะห์และหาค่าเฉลี่ยของเซลล์เลสแอกทิวิตีดังนี้

การวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีโดยวิธีปกติ

นำเซลล์เลสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *T. reesei* สายพันธุ์ QM9414 และ Rut C-30 มาวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีโดยผ่านระบบประมวลผลทางภาพ โดยนำเซลล์เลสที่ผ่านการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method แบบปกติ (Ghose, 1987) (ภาคผนวก ค) และ Somogyi-Nelson method แบบปกติ (Somogyi, 1951) (ภาคผนวก ค) มาหยดลงบนแผ่นฟิล์มใสขนาดหยดละ 10 µl (รูปที่ 3.1) นำกล้องดิจิทัลมาถ่ายภาพแผ่นฟิล์มใสภายใต้กล่องควบคุมสภาพแสง (digital image box) (รูปที่ 3.1) จากนั้นนำรูปถ่ายที่ได้ไปแปลงข้อมูลรูปให้อยู่ในระบบ CIE ให้ค่าสัมประสิทธิ์สี La*b* โดยใช้โปรแกรม DIB color measurement software นำค่าสัมประสิทธิ์สี La*b* ที่ได้มาคำนวณเซลล์เลสแอกทิวิตี (ภาคผนวก ค) เปรียบเทียบกับการวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีโดยระบบสเปคโตรโฟโตเมทรี ทำการทดลอง 3 ช้อน และหาค่าเฉลี่ยของเซลล์เลสแอกทิวิตี

การวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีโดยวิธีย่อยส่วน

นำเซลล์เลสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *T. reesei* สายพันธุ์ QM9414 และ Rut C-30 มาวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีโดยผ่านระบบประมวลผลทางภาพ โดยนำเซลล์เลสที่ผ่านการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method แบบย่อยส่วนลดปริมาณการใช้สารเคมีต่างๆ ลง 5 เท่า (ภาคผนวก ค) และ Somogyi-Nelson method แบบย่อยส่วนลดปริมาณการใช้สารเคมีต่างๆ ลง 5 เท่า (ภาคผนวก ค) มาหยดลงบนแผ่นฟิล์มใสขนาดหยดละ 10 μ l (รูปที่ 3.1) นำกล้องดิจิทัลมาถ่ายรูปแผ่นฟิล์มใสภายใต้กล่องควบคุมสภาพแสง (digital image box) (รูปที่ 3.1) จากนั้นนำรูปถ่ายที่ได้ไปแปลงข้อมูลรูปให้อยู่ในระบบ CIE ให้ค่าสัมประสิทธิ์สี $L^*a^*b^*$ โดยใช้โปรแกรม DIB color measurement software นำค่าสัมประสิทธิ์สี a^* มาคำนวณเซลล์เลสแอกทิวิตี (ภาคผนวก ค) เปรียบเทียบกับการวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีโดยระบบสเปคโตรโฟโตเมทรี โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ยของเซลล์เลสแอกทิวิตี



รูปที่ 3.2 การถ่ายรูปภายใต้กล่องควบคุมสภาพแสงสำหรับถ่ายรูปดิจิทัล (digital image box)

ก. หยดสารละลายตัวอย่างเซลล์เลสบนแผ่นฟิล์มใส

ข. กล่องควบคุมสภาพแสงสำหรับถ่ายรูปดิจิทัล (digital image box)

3.3.2 เปรียบเทียบผลการวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีเฉลี่ยระหว่างการวิเคราะห์โดยระบบประมวลผลทางภาพและการวิเคราะห์โดยระบบสเปคโตรโฟโตเมทรี

เปรียบเทียบผลการวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีเฉลี่ยโดยวิธี DNS method และ Somogyi-Nelson method ระหว่างการวิเคราะห์โดยระบบประมวลผลทางภาพและการวิเคราะห์โดยระบบสเปคโตรโฟโตเมทรี โดยทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Scheffe test โดยใช้โปรแกรม SPSS

3.3.3 เปรียบเทียบผลการวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีเฉลี่ยระหว่างการวิเคราะห์แบบปกติและแบบย่อส่วน

เปรียบเทียบผลการวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีเฉลี่ยของเซลล์เลสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *T. reesei* สายพันธุ์ QM9414 และ Rut C-30 ระหว่างวิธีปกติและวิธีย่อส่วน โดยทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Scheffe test โดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0

3.3.4 สร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างการวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีและการวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีโดยวิธีประมวลผลทางภาพ

วิเคราะห์และสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างการวัดเซลล์เลสแอกทิวิตี โดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีและการวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีโดยวิธีประมวลผลทางภาพ โดยเปรียบเทียบจากสมการของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ระหว่างการวิเคราะห์เซลล์เลสแอกทิวิตีโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี และการวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีโดยวิธีประมวลผลทางภาพ

3.3.5 สร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างวิธีวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีโดยวิธีปกติ และวิธีย่อส่วน

วิเคราะห์และสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างการวัดเซลล์เลสแอกทิวิตีโดยวิธีปกติ และวิธีย่อส่วน โดยเปรียบเทียบจากสมการของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ระหว่างการวิเคราะห์เซลล์เลสแอกทิวิตีโดยวิธีปกติ และวิธีย่อส่วน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย