บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การเก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อรา

ทำการเก็บตัวอย่าง เพื่อรวบรวมสายพันธุ์เชื้อรา จากดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์เศษต้น และใบป่านศรนารายณ์ และวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมทำเชือก จากอำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี และอำเภอโนนสูง จังหวัดนครราชสีมา

การคัดเลือกและคัดเทียบเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้

1. การคัดเลือกขั้นที่หนึ่ง ตามวิธีการของ Mandels และ Sternberg (1976)

นำตัวอย่าง อย่างละ 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 2 นาที ดูดเอาสารแขวนลอย 1 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุสูตรอาหาร Czapex's dox 100 มิลลิลิตร มีกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 2.0 x 10.0 เซนติเมตร เป็นแหล่งคาร์บอนจุ่มอยู่ (ภาคผนวก ก.1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำเชื้อราออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA (ภาคผนวก ก.2) เพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์

2. การคัดเลือกขั้นที่สอง ตามวิธีการของ Hankin และ Anagnostakis (1977)

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากขั้นที่หนึ่ง มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน ตัดปลายเส้นใยให้มีขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร CMC agar (ภาคผนวก ก.3) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน ราดทับด้วยสารละลาย congo red ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ล้างออกด้วย 1 M NaCL แยกเอาเฉพาะเชื้อราที่เกิดบริเวณวงใส (clear zone) รอบโคโลนีออกมา

3. การคัดเทียบขั้นที่สาม ตามวิธีการของ Punnapayak และ Emert (1986)

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากขั้นที่สอง มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน ตัดปลายเส้นใยให้มีขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร production (ภาคผนวก ก.4) จำนวน 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Controlled Environmental Incubator Shaker Model G 25, New Brunswick Scientific Co. Inc, USA) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 30 37 และ 45 ^{o}C ตามลำดับ เลือกเอาเฉพาะเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

<u>การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา</u>

ใช้วิธีการเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์ (slide culture technique)

1. การเตรียมสไลด์

วางสไลด์เลี้ยงเชื้อ และกระจกปิดสไลด์บนแท่งแก้วรูปตัววีในจานเพาะเชื้อที่ปิดฝา นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยความร้อน ที่อุณหภูมิ 180 ^{o}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2. การเพาะเชื้อรา

ตัดวุ้นเลี้ยงเชื้อให้มีขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร จากอาหารแข็งสูตร PDA วางบนสไลด์ในจานเพาะเชื้อ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยของเชื้อราที่จะทำการเพาะลงบริเวณด้านข้างทั้งสี่ด้านของชิ้นวุ้น แล้วใช้กระจกปิดสไลด์วางทับลงบนชิ้นวุ้น ใส่ก้อนสำลีชุบน้ำที่ปราศจากเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยอาศัยแนวของ Barnett และ Hunter (1972) และ Domsch และ Gams (1980)

<u>การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา</u>

1. การศึกษาความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร production โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ^{o}C เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน นำไปวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อ

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 1 บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ศึกษาที่อุณหภูมิ 5 ระดับคือ 25 30 35 40 และ 45 ^{o}C เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน นำไปวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

3. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 2 แต่เปลี่ยนแปลงชนิดของแหล่งคาร์บอน คือมี CMC MCC กระดาษกรอง และสำลี ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน นำไปวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 2 แต่ศึกษาถึงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน นำไปวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

4. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3 แต่เปลี่ยนแปลงชนิดของแหล่งไนโตรเจน คือมี ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) ammonium nitrate (NH_4NO_3) urea ($CO(NH_2)_2$) และ peptone ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน นำไปวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3 แต่ศึกษาถึงความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.2 0.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16748864

0.6 0.8 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน นำไปวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

5. การศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริม (supplementation)

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 4 แต่มีความเข้มข้นของ casein (CE 90 M) และ soybean meal (SE 50 M) จากบริษัท Deltown Chemurgic รัฐนิวยอร์ค ประเทศสหรัฐอเมริกา อยู่ในช่วง 0.05 ถึง 0.125 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน นำไปวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

<u>การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราในถังหมักขนาด 5 ลิตร</u>

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 5 ในถังหมัก (Bioflo IIc, New Brunswick Scientific, Co. Inc, USA) ขนาด 5 ลิตร ที่มีอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน นำไปวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

<u>การหมักแอลกอฮอล์ (เอทธานอล) แบบเชื้อผสม (mixed-cultures fermentation)</u>

1. การเตรียมเชื้อยีสต์

เลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเหลวสูตร YMB (ภาคผนวก ก.5) บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ^{o}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกเซลล์ ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Servall Refrigerated Automatiic, Ivan Servall, Inc., USA) ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาเฉพาะตัวเซลล์ ไปใช้ในการหมักเอทธานอล

2. การหมักเอทธานอลแบบเชื้อผสม

เลี้ยงเชื้อรา และเชื้อยีสต์ (ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ น้ำหนักแห้ง) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี production medium ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และ F_2 medium

(ภาคผนวก ก.6) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มี MCC และเส้นใยของป่านศรนารายณ์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง เป็นวัสดุหมัก ทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ 30 และ 40 ^{o}C เป็นเวลา 6 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน นำไปวิเคราะห์หาปริมาณของเอทธานอลที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์ผล

1. การวิเคราะห์ปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลส โดยการวิเคราะห์หา FPA ตามวิธีการของ Mandels และ Sternberg (1976) และ CMCase ตามวิธีการของ Acebal และคณะ (1986) (ภาคผนวก ข.1 และ 2 ตามลำดับ)

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายซับสเทรตให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นมาตรฐาน (ภาคผนวก ข.3)

3. การวิเคราะห์แอลกอฮอล์ (เอทธานอล) หาปริมาณของเอทธานอลที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Gas Liquid Chromatography (GC) โดยใช้เครื่อง Gas Liquid Chromatograph (Shimadzu, 7 AG) แบบ flame ionization detector มี Porapak Q column

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid assay (DNS) (ภาคผนวก ข.4) ตามวิธีการของ Miller (1959)

5. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ด้วยเครื่องวัดน้ำตาลกลูโคส (YSI Model 27, Yellow springs, USA)

6. การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ ใช้วิธี Direct Microscopic Count โดยใช้ Counting chamber ของ Haemacytometer (American Optical) (ภาคผนวก ข.5)

7. การวัด pH ใช้เครื่อง pH meter

การทดลองมีการทำ 4 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย