บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น NovaSpec 4049 ของบริษัท LKB Biochrom, England
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น 8453 ของบริษัท Hewlett Packard
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น G 25 บริษัท Scientific Co. Inc.
4. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ของบริษัท Lab-Line
5. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Steam Sterilizer/ Autoclave) ของบริษัท Ta Chang Medical Instrument Factory, Taiching, Taiwan
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) Model universal 16 ของบริษัท Hettich, Germany
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) model SS40-2 Ambient ของบริษัท Grant Instruments (Cambridge) Ltd. England
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น Servall refrigerated-automatic ของบริษัท Ivan Servall, INC. Norwalk, Connecticut U.S.A.
9. เครื่องกระจายเยื่อ Mavis engineering Co.Ltd.
10. เครื่อง pressure รุ่น Model-73 03-01
11. เครื่องวัดความขาวสว่างของเยื่อ Elrepho 2000 ของบริษัท Datacolor Ltd. Switzerland
12. ตู้อบความร้อนสูง (Hot Air Oven) รุ่น U50 790,387 ของบริษัท Memmert
13. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น U4600P ของบริษัท Scientific Promotion Co. Ltd.
14. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น ion analyzer 255 ของ บริษัท Corning, USA

เคมีภัณฑ์

เคมีภัณฑ์สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. น้ำตาลไซโลส (D-xylose) (Fluka)
2. ผงสกัดยีสต์ (yeast extract) (Difco)
3. วุ้นผง (agar) (Difco)
4. peptone (Difco)

5. ผงสกัดมอลท์ (Malt extract) (Scharlau)
6. ยีสต์ไนโตรเจนเบส (Yeast Nitrogen Base) (Difco)
7. แอสพาราจีน (L-Asparagine Monohydrate)
8. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) (Scharlau)
9. โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Scharlau)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้สำหรับวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

1. โซเดียมคาร์บอนเนต (Na_2CO_3) (Carlo Erba)
2. โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทต $COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$) (Rochelle salt)
3. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) (Carlo Erba)
4. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) (Carlo Erba)
5. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) (Carlo Erba)
6. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) (AnalaR)
7. แอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) (Mallinckrodt)
8. โซเดียมไฮโดรเจนไดโซเดียมอาซีเนท ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) (M&B)
9. ไซแลน (Sigma)

เศษวัสดุทางการเกษตร

จากอำเภอกระทุ่มแบน จังหวัดสมุทรสาคร

1.รำละเอียด

2.รำหยาบ

3.แกลบ

4.ฟางข้าว

เคมีภัณฑ์ที่ใช้สำหรับเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.2H_2O$) (Fluka)
2. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (Carlo erba)

เชื้อที่ใช้ในการวิจัย

1. เชื้อ *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. T.D. Leathers (Learther และคณะ,1988)
2. เชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. T.P.West (West และ Hamer, 1991)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรักษาเชื้อ *A. pullulans*

นำ *A. pullulans* มาลากลงบนอาหารแข็งเอียงชนิด YMX (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 วัน นำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. pullulans*

เลี้ยง *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารเหลวสูตรเพื่อการเจริญ (ภาคผนวก ก) โดยเตรียมเซลล์ตั้งต้นเป็นเซลล์แขวนลอย(cell suspension) มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้เซลล์ตั้งต้น 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทุกๆ 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาหาปริมาณของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์โดยการนำอาหารเหลวจากการเลี้ยงเชื้อมา spread plate บนจานอาหารแข็ง PDA (ภาคผนวก ก) เพื่อนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟการเจริญเติบโต

3. การเตรียมเซลล์ตั้งต้นของ *A. pullulans*

นำ *A. pullulans* จากอาหารแข็งเอียงชนิด YMX มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเพื่อการเจริญของเชื้อ (ภาคผนวก ก) บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำเป็นเซลล์แขวนลอยมีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นับโดยใช้ Hemacytometer แต่ละการทดลองใช้เซลล์ตั้งต้น 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* เพื่อผลิตไซแลนเนส

4.1 การศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อรา *A. pullulans* ในอาหารเหลวสูตร production (ภาคผนวก ก) ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 1 N HCL หรือ 1 N NaOH ให้มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 5.0 และ 6.0 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 4 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนส (ภาคผนวก ข)

4.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อรา *A. pullulans* ในอาหารเหลวสูตร production ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 1 N HCL หรือ 1 N NaOH ให้มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม 4 ระดับคือ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 4 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ ไซแลเนส (ภาคผนวก ข)

4.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อรา *A. pullulans* ในอาหารเหลวสูตร production แต่เปลี่ยนแปลงชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็น รำละเอียด รำหยาบ แกลบข้าว และ ฟางข้าว ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นปมบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 4 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ ไซแลนเนส (ภาคผนวก ข)

เลี้ยงเชื้อรา *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCCในอาหารเหลวสูตร production ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นรำละเอียด ส่วนสายพันธุ์ NRRL เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร production ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นฟางข้าว มาหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 4 วัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ ไซแลนเนส (ภาคผนวก ข)

5. **การเตรียมไซแลนเนสในภาวะที่เหมาะสม**

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ในอาหารเหลวสูตร production ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น รำละเอียด 3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายพันธุ์ NRRL เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร production ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นฟางข้าว 4 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 จากนั้นบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 และ 3 วันตามลำดับ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบาง กำจัดเซลล์ของ *A. pullulans* โดยการปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในส่วนของเหลวที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียม-ซัลเฟตระหว่าง 30 – 50 เปอร์เซ็นต์ เก็บตะกอนโปรตีนโดยการปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที dialysis กับโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.8 เพื่อเอาเกลือออกจากตะกอนโปรตีน นำไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนส (ภาคผนวก ข)

6. **การฟอกเยื่อกระดาษด้วยไซแลนเนส**

ชั่งเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสที่ยังไม่ผ่านกระบวนการฟอกจำนวน 30 กรัม(น้ำหนักแห้ง) ใส่ในถุงพลาสติกขนาด 9 x14 นิ้ว เติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.8 ที่ผสมไซแลนเนสความเข้มข้น 5 25 และ 50 IUต่อน้ำหนักของเยื่อกระดาษ 1 กรัม ลงไปในถุงให้ความข้นของเยื่อลดลงเหลือ 3 เปอร์เซ็นต์ นำมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทุกครึ่งชั่วโมง จะทำการบีบนวดเยื่อเพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น นำเยื่อที่ได้มาวัดค่าความขาวสว่างและค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อ (ภาคผนวก ค) ส่วนของน้ำฟอกเยื่อที่ได้นำไปวัดด้วยเครื่องวัดความเข้มแสง spectrophotometer ความยาวคลื่น 190-350 นาโนเมตร

7. **การวิเคราะห์เอนไซม์ด้วยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น**

วิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์ไซแลนเนส โดยใช้ไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ 0.25 มิลลิลิตรเป็นสับสเตรต เติมไซแลนเนสที่เจือจางด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.8 จนมีความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา10 นาที จากนั้นจึงนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีการของ Somogi (1952) และ Nelson (1944) (ภาคผนวก ข)