บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ในการวิจัย

1. ตัวอย่างดินที่นำมาแยกเชื้อรา เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ รวม 50 ตัวอย่าง จำแนกได้ดังนี้

1.1 สวนรุกขชาติ	10 ตัวอย่าง
1.2 ดินบริเวณมหาวิทยาลัยแม่โจ้	10 ตัวอย่าง
1.3 ดินบริเวณสวนลำใยและลิ้นจี่อำเภอพร้าว	10 ตัวอย่าง
1.4 ดินบริเวณดอยสุเทพ-ปุย	10 ตัวอย่าง
1.5 ดินบริเวณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่	10 ตัวอย่าง

2. อาหารที่ใช้สำหรับแยกเชื้อและการเพาะเลี้ยง (แสดงสูตรและวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก)

2.1 Potato dextrose agar (PDA)

2.2 อาหารเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อรา (enrichment medium, EM)

2.3 อาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราที่สามารถผลิต mannanase (cultivation medium, CM)

2.4 Locust bean gum agar (LBG Agar)

2.5 อาหารเหลวสำหรับศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน

2.6 อาหารเหลวสำหรับศึกษาความเข้มข้นของ locust bean gum

2.7 อาหารเหลวสำหรับศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน

2.8 อาหารเหลวสำหรับศึกษาผลของ corn steep solids และโซเดียมไนเตรท

2.9 อาหารเหลวสำหรับศึกษาผลของความเป็นกรด ด่างของอาหารในการเพาะเลี้ยง

2.10 อาหารสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา (Czapek Solution Agar)

3. สารเคมี

3.1 บัฟเฟอร์ (แสดงสูตรและวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข)

3.1.1 Acetate buffer

3.1.2 Phosphate buffer

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (แสดงสูตรและวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข)

3.2.1 DNS reagent

3.2.2 40% Na-K-Tartrate

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน (แสดงสูตรและวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข)

3.3.1 Bovine Serum Albumin (BSA)

3.3.2 Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB)

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเหลวเพื่อเพิ่มปริมาณและผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา (แสดงสูตร และวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข)

- Trace metal solution

4. เครื่องมือ

4.1 Spectrophotometer รุ่น UV 2,100 ยี่ห้อ Shimazu

4.2 Incubator shaker

4.3 ตู้ incubator อุณหภูมิ 30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส

4.4 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง รุ่น 7,800 ยี่ห้อ Kubota

4.5 pH meter

4.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

4.7 Ultra mixer

4.8 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)

4.9 ตู้อบ (hot air oven)

4.10 ตู้ถ่ายเชื้อ

4.11 กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope พร้อมถ่ายภาพ

4.12 Hot plate พร้อม stirrer

4.13 เครื่องชั่งสารเคมีอย่างละเอียด

4.14 ตู้เย็นสำหรับเก็บ สารเคมี บัฟเฟอร์และเอนไซม์

5. อุปกรณ์อื่น ๆ

5.1 หลอดทดลอง

5.2 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร

5.3 ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร

5.4 บิคเกอร์ ขนาด 50, 100 และ 500 มิลลิลิตร

5.5 ปิเปต ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร

5.6 กระบอกตวง ขนาด 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

5.7 Micropipette ขนาด 0-20 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร พร้อม tip

5.8 ขวด Mc Cartney สำหรับเก็บเอนไซม์

5.9 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

5.10 ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)

5.11 เข็มถ่ายเชื้อปลายงอ (needle)

5.12 ปากคีบ (forcep)

5.13 ที่เจาะจุกคอร์ก ขนาด 0.7 เซนติเมตร (cork borrer)

5.14 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petridish)

6. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีการวิจัย

1. การแยกเชื้อราที่ผลิต **mannanase** จากดิน

1.1 ทำการเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่าง ๆ โดยเลือกเก็บดินบริเวณที่มีการทับถมของซากกิ่งไม้ ใบไม้ มาก ๆ

1.2 เพิ่มจำนวนเชื้อราที่ต้องการ (enrichment) โดยชั่งตัวอย่างดิน1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้ก้อนดินกระจายจากนั้นใช้ปิเปตที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด

1 มิลลิลิตร ดูดส่วนสารละลายบริเวณเหนือตะกอนดินมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มปริมาณ (enrichment medium) pH 5.5 (ดังภาคผนวก ก) ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ภายในบรรจุ glass bead จำนวน 3-4 เม็ด

1.3 นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 2 - 4 วัน สังเกตดูการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น นำสารละลายที่มีเส้นใยของเชื้อรา มาทำ dilution spread plate บนอาหารแข็ง locust bean gum บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเส้นใยแล้วแยกเป็นโคโลนีเดียว (single colony) เก็บไว้เป็น stock culture

1.4 นำเชื้อราที่แยกได้ มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง locust bean gum บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เพื่อให้เชื้อรามีการเจริญเต็มที่

1.5 ใช้ cork borrer ขนาด 0.7 เซนติเมตร เจาะเอาเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็ง locust bean gum มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อรา pH 5.5 ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ภายในบรรจุ glass bead จำนวน 3-4 เม็ด (1 ขวดรูปชมพู่ต่อ 1 cork borrer) นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ (seed culture)

1.6 ใช้ปิเปตตัดปลายตรงส่วนดูดสารออกมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อรามา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase pH 5.5 (ดังภาคผนวก ก) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ภายในบรรจุ glass bead จำนวน 3-4 เม็ด นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชม.

1.7 ทำการเก็บเอนไซม์ โดยนำน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อราไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง เป็นเวลา 15 นาที ที่ 5 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 12,000 xg เก็บส่วนใสไว้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์

1.8 นำส่วนใส (crude enzyme) มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ตามวิธีของ Miller (1959) โดยการนำส่วนใส (crude enzyme) มาเตรียม reaction mixture กระทำในอ่างน้ำแข็งซึ่งประกอบด้วย crude enzyme 0.05 มิลลิลิตร, 1% (w/V) locust bean gum 0.05 มิลลิลิตร และ 0.1 M Na-acetate buffer pH 5.5 (ดังภาคผนวก ข) 0.05 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ต่อจากนั้นเติม DNS reagent (ดังภาคผนวก ข) ปริมาณ

2 มิลลิลิตร เขย่า นำไปต้มน้ำเดือดนาน 15 นาที แล้วเติม 40 % Na-K-Tartrate (ดังภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ทันที เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายแมนโนส

1.9 นำส่วนใส (crude enzyme) มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดย coomassie brilliant blue G-250 เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย crude enzyme 500 ไมโครลิตรและ coomassie (ดังภาคผนวก ข) 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโมเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin

1.10 นำค่า enzyme activity และ specific activity ของเชื้อราที่คัดเลือกได้มาเปรียบเทียบกัน เลือกเฉพาะเชื้อราที่มีการผลิตเอนไซม์ดีที่สุด มาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase ต่อไป

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของเชื้อราไอโซเลต KM-1

2.1 นำเชื้อราไอโซเลต KM-1 มาเพาะเลี้ยงบนสไลด์ (slide culture) เพื่อดูลักษณะโครงสร้างภายนอกของเชื้อรา โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เช่น ขนาดและรูปร่างของเส้นใย โคนิเดีย พร้อมทั้งสีที่สังเกตได้ นอกจากนี้ยังสังเกต ascocarp และ fruiting body ด้วยว่าเป็นชนิดใด นำมาเปรียบเทียบลักษณะกับเชื้อราที่ได้จำแนกแล้วในหนังสือ Compendium of soil fungi (Domsh *et al.*, 1980) และจัดลำดับอนุกรมวิธานตามหนังสือ The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture (VON ARX, 1981)

2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

2.2.1 เตรียมอาหาร PDA (ดังภาคผนวก ก) สำหรับเลี้ยงเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จำนวน 15 จาน ทำการทดลอง 5 การทดลอง (treatment) การทดลองละ 3 ซ้ำ (replication)

2.2.2 นำเชื้อรา KM-1 จากที่เลี้ยงไว้ในจานอาหารเป็นเวลา 5 วัน มาเจาะตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย โดยที่เจาะจุกคอร์ก(cork borrer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร

2.2.3 ใช้เข็มถ่ายเชื้อปลายงอ นำชิ้นวุ้นที่ตัดแล้ววางบนอาหารกลางจานอาหารแล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ อุณหภูมิ 27, 30, 37, 45, และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ

2.2.4 บันทึกการเจริญของเชื้อรา KM-1 โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีทุกวันจนครบ 7 วัน นำค่าที่ได้จำนวน 3 ซ้ำ มาหาค่าเฉลี่ยแล้วเปรียบเทียบกันแต่ละอุณหภูมิ และในแต่ละวันเพื่อสังเกตความแตกต่าง

2.3 การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญของเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

2.3.1 เตรียมอาหาร PDA ที่มี pH แตกต่างกัน คือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8 ตามลำดับ โดยใช้ 0.1 M HCl, 1 M HCl, 0.1 M NaOH และ 1 M NaOH ปรับ pH ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จำนวน 27 จาน ทำการทดลอง 9 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

2.3.2 นำเชื้อรา KM-1 ที่เลี้ยงไว้บนจานอาหารเป็นเวลา 7 วันมาเจาะตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยโดยใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ซึ่งลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว

2.3.3 ใช้เข็มถ่ายเชื้อปลายงอ นำชิ้นวุ้นที่ตัดแล้วมาวางบนกลางจานอาหารที่ค่า pH แตกต่างกัน แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.3.4 บันทึกการเจริญของเชื้อรา KM-1 โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีทุกวันจนครบ 7 วัน นำค่าที่ได้จำนวน 3 ซ้ำ มาหาค่าเฉลี่ยแล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกันแต่ละ pH และในแต่ละวันเพื่อสังเกตความแตกต่าง

3. การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน ต่อการผลิต mannanase โดยเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

3.1 เตรียมอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 9 ชนิดด้วยกันคือ แป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch), แป้งข้าวเหนียว, แป้งมันสำปะหลัง, แป้งบุกเมืองกาญจน์, บุกจากเพชรบูรณ์, แป้งบุกญี่ปุ่น (konjac mannan), locust bean gum, กลูโคสและแมนโนส โดยใช้ 1%(W/V) (ดังภาคผนวก ก)

3.2 นำเชื้อรา KM-1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง locust bean gum เป็นเวลา 5 วัน มาเจาะตัดชิ้นวุ้น บริเวณปลายเส้นใยโดยใช้ที่เจาะจุกคอร์ก ขนาด 0.7 เซนติเมตร แล้วใช้เข็มถ่ายเชื้อปลายงอเขี่ยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยลงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของ locust bean gum 0.5%(W/V) ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมงเพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ

3.3 ใช้ปิเปตดูดน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อรามา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase pH 5.5 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

3.4 ทำการเก็บเอนไซม์ โดยนำน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อราไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง เป็นเวลา 15 นาที ที่ 5 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 12,000 xg เก็บส่วนใสไว้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ดังข้อ 1.8 และปริมาณโปรตีน ดังข้อ 1.9

3.5 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์และ specific activityที่แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

4. การศึกษาผลความเข้มข้นของ locust bean gum ต่อการผลิต mannanase ของ เชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

4.1 เตรียมอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของ locust bean gum ที่แตกต่างกัน คือ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3%(W/V) ตามลำดับ (ดังภาคผนวก ก) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

4.2 นำเชื้อรา KM-1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง locust bean gum เป็นเวลา 5 วัน มาเจาะตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ ดังข้อ 3.2

4.3 ใช้ปิเปตดูดน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อรามา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase pH 5.5 ที่มีความเข้มข้นของ locust bean gum ที่แตกต่างกัน ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

4.4 ทำการเก็บเอนไซม์ โดยนำน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อราไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง เป็นเวลา 15 นาที ที่ 5 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 12,000 xg เก็บส่วนใสไว้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังข้อ 1.8 และปริมาณโปรตีนดังข้อ 1.9

4.5 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์และ specific activity ที่ความเข้มข้นของ locust bean gum แตกต่างกัน

5. การศึกษาผลของความเป็นกรดด่าง ของอาหารเหลวต่อการผลิต mannanase โดย เชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

5.1 เตรียมอาหารเหลวผลิต mannanase ที่มีความเป็นกรด ด่างของอาหารเหลว แตกต่างกันดังนี้ คือ 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 ตามลำดับ (ดังภาคผนวก ก) โดยทำการทดลองอย่างละ 2 ซ้ำ

5.2 นำเชื้อรา KM-1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง locust bean gum เป็นเวลา 5 วัน มาเจาะตัดชิ้นวุ้น บริเวณปลายเส้นใย เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อดังข้อ 3.2

5.3 ใช้ปิเปตดูดน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อรามา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวเพื่อผลิตmannanase ที่มีความเป็นกรด ด่างของอาหารเหลวแตกต่างกัน โดยใช้ 1.5% (W/V) locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอนที่เตรียมไว้ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

5.4 ทำการเก็บเอนไซม์ โดยนำน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อราไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง เป็นเวลา 15 นาที ที่ 5 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 12,000 xg เก็บส่วนใสไว้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังข้อ 1.8 และปริมาณโปรตีน ดังข้อ 1.9

5.5 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์และ specific activity ในอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase ที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน

6. การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต mannanase โดยเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

6.1 เตรียมอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 6 ชนิด ดังนี้คือ (W/V) ของ 0.2% yeast extract, 0.2% soy bean meal, 0.2% urea, 0.2% $NaNO_3$, 0.2% peptone และ 0.1% corn steep solids ตามลำดับโดยใช้ 1% (W/V) locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอน (ดังภาคผนวก ก)

6.2 นำเชื้อรา KM-1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง locust bean gum เป็นเวลา 5 วัน มาเจาะตัดชิ้นวุ้น บริเวณปลายเส้นใย เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ ดังข้อ 3.2

6.3 ใช้ปิเปตดูดน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อรามา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase pH 5.5 ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันที่เตรียมไว้ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250

มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

6.4 ทำการเก็บเอนไซม์ โดยนำน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อราไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงเป็นเวลา 15 นาที ที่ 5 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 12,000 xg เก็บส่วนใสไว้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังข้อ 1.8 และปริมาณโปรตีน ดังข้อ 1.9

6.5 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์และ specific activity ในอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase ที่มีแหล่งของไนโตรเจนแตกต่างกัน

7. การศึกษาผลของ $NaNO_3$ และ corn steep solids ต่อการผลิต mannanase โดย

Talaromyces sp. KM-1

7.1 เตรียมอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase ที่แตกต่างกัน ดังนี้คือ (W/V) ของอาหารเหลวที่ไม่เติม 0.2% $NaNO_3$ และ 0.1% corn steep solids, อาหารเหลวที่เติมเฉพาะ 0.2% $NaNO_3$ อย่างเดียว อาหารเหลวที่เติมเฉพาะ 0.1% corn steep solids อย่างเดียว และอาหารเหลวที่เติมทั้ง 0.2% $NaNO_3$ และ 0.1% corn steep solids โดยทำการทดลองอย่างละ 2 ซ้ำ

7.2 นำเชื้อรา KM-1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง locust bean gum เป็นเวลา 5 วัน มาเจาะตัดชิ้นวุ้น บริเวณปลายเส้นใย เพื่อเตรียมหัวเชื้อดังข้อ 3.2

7.3 ใช้ปิเปตดูดน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อรามา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase pH 5.5 ที่เตรียมไว้ ดังข้อ 7.1 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในขวดชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

7.4 ทำการเก็บเอนไซม์ โดยนำน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อราไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงเป็นเวลา 15 นาที ที่ 5 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 12,000 xg เก็บส่วนใสไว้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังข้อ 1.8 และปริมาณโปรตีน ดังข้อ 1.9

7.5 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์และ specific activity ในอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase ที่แตกต่างกัน

8. การศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อต่อการผลิต mannanase โดยเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

8.1 เตรียมอาหารเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อรา และอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์

8.2 นำเชื้อรา KM-1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง locust bean gum เป็นเวลา 5 วัน มาเจาะตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ ดังข้อ 3.2

8.3 ใช้ปิเปตดูดน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อราในปริมาณต่างกันดังนี้ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ลงในอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase pH 5.5 ที่เตรียมไว้ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

8.4 ทำการเก็บเอนไซม์โดยนำน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อราไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง เป็นเวลา 15 นาที ที่ 5 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 12,000 xg เก็บส่วนใสไว้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังข้อ 1.8 และปริมาณโปรตีน ดังข้อ 1.9

8.5 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์และ specific activity ในอาหารเหลว เพื่อผลิต mannanase ที่เติมหัวเชื้อในปริมาณที่แตกต่างกัน

9. การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของ mannanase โดยเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

9.1 นำส่วนใส (crude enzyme) ที่ได้จากการทดลองมาทดสอบหาผลของ pH ต่อการทำงานของ mannanase โดยนำส่วนใสมาเตรียม reaction mixture กระทำในอ่างน้ำแข็ง ซึ่งประกอบด้วย crude enzyme 0.05 มิลลิลิตร, 1%(W/V) locust bean gum 0.05 มิลลิเมตร และ 0.05 มิลลิเมตรของ acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M ที่มี pH แตกต่างกันคือ 3, 3.5 4, 4.5, 5, และ 5.5 ใน phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M ที่มี pH แตกต่างกัน คือ 6, 6.5, 7 และ 7.5 ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน บ่มเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ต่อจากนั้นเติม DNS reagent ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้ เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาทีแล้วเติม 40 % Na-K-Tartrate 1 มิลลิลิตร ทันที เขย่าให้เข้า กัน ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายแมนโนส

9.2 นำส่วนใส (crude enzyme) มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนดังข้อ 1.9

9.3 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ที่ค่า pH แตกต่างกัน

10. การศึกษาผลของระยะเวลาต่อการทำงานของ mannanase โดยเชื้อรา

Talaromyces sp. KM-1

10.1 นำส่วนใส (crude enzyme) ที่ได้จากการทดลองมาทดสอบหาผลของระยะเวลา ต่อการทำงานของ mannanase โดยนำส่วนใสมาเตรียม reaction mixture กระทำ ในอ่างน้ำแข็ง ซึ่งประกอบด้วย crude enzyme 0.05 มิลลิลิตร และ 1%(W/V) locust bean gum 0.05 มิลลิลิตร และ 0.1 M Na-acetate buffer pH 5.5 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในอ่างน้ำ ควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่แตกต่างกันคือ 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที ตามลำดับ ต่อจากนั้นเติมDNS reagent ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาทีแล้วเติม 40% Na-K-Tartrate ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทันที เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายแมนโนส

10.2 นำส่วนใส (crude enzyme) มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ดังข้อ 1.9

10.3 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ที่ระยะเวลาการบ่มเอนไซม์แตกต่างกัน

11. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ mannanase โดยเชื้อรา

Talaromyces sp. KM-1

11.1 นำส่วนใส (crude enzyme) ที่ได้จากการทดลองมาทดสอบหาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ mannanase โดยนำส่วนใสมาเตรียม reaction mixture กระทำในอ่างน้ำแข็ง ซึ่งประกอบด้วย crude enzyme 0.05 มิลลิลิตร, 1%(W/V) locust bean gum 0.05 มิลลิลิตร และ 0.1 M Na-acetate buffer 0.05 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 37, 45, 50, 55, 60, และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับเป็นเวลา 20 นาที ต่อจากนั้นเติม DNS reagent ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มน้ำเดือด นาน 15 นาที แล้วเติม 40 % Na-K-tartrate ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทันที เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายแมนโนส

11.2 นำส่วนใส (crude enzyme) มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ดังข้อ 1.9

11.3 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

12. การศึกษาผลของระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตและการทำงาน ของ mannanase โดยเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

12.1 เตรียมอาหารเหลวเพื่อผลิตmannanase ที่มี 1.5 % (W/V) ของ locust bean gum pH 5.5 เป็นแหล่งคาร์บอน

12.2 นำเชื้อรา KM-1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง locust bean gum มาเจาะตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ ดังข้อ 3.2

12.3 ใช้ปิเปตดูดน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อรา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase ที่มีความเข้มข้น 1.5 % (W/V) ของ locust bean gum pH 5.5 ที่เตรียมไว้ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา แตกต่างกัน ดังนี้คือ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ

12.4 ทำการเก็บเอนไซม์ ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันโดยนำน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อราไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง เป็นเวลา 15 นาที ที่ 5 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 12,000 xg เก็บส่วนใสไว้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์

12.5 ทำการทดสอบทำงานของเอนไซม์ โดยเตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วยCrude enzyme 0.05 มิลลิลิตร, 1% (W/V) locust bean gum 0.05 มิลลิลิตร และ 0.1 M Na-acetate buffer pH 5.5 0.05 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที แล้วเติม DNS reagent ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ทันที เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 15 นาที แล้วเติม 40 % Na-K-tartrate ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายแมนโนส

12.6 นำส่วนใส (crude enzyme) มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ดังข้อ 1.9

12.7 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ที่ระยะเวลการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

12.8 ทำการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1 ที่เจริญในอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน โดยการนำเส้นใยของเชื้อรามากรองด้วยกระดาษ Whatman No. 1 ที่ชั่งน้ำหนักกระดาษมาก่อนแล้ว จากนั้นนำมาทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักแห้งของเชื้อราที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University