

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดินและการคัดเลือกเชื้อรา

1.1 เก็บตัวอย่างดินบริเวณต่างๆ เช่น ดินบริเวณน้ำพุร้อน จังหวัดเชียงใหม่ ดินบริเวณชายหาด จังหวัดจันทบุรี ระยอง และชลบุรี ดินบริเวณภายในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นต้น จำนวน 100 ตัวอย่าง โดยเก็บดินลึกกลงไปประมาณ 10-15 cm

1.2 นำดินตัวอย่างมา enrichment เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อรา โดยใช้ตัวอย่างดิน 30 g ในอาหารที่มี colloidal chitin หรือเปลือกกุ้ง 10 % เป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก) เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์

1.3 นำตัวอย่างดินจากการทำ enrichment มาเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} หรือใช้ดินตัวอย่าง 1 g มา spread plate บนอาหาร chitin agar (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 5-7 วัน

1.4 แยกเชื้อราไอโซเลทลักษณะแตกต่างกันมาเพาะเลี้ยงบน chitin agar plate อีกครั้งเพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์แล้วเก็บเชื้อราแต่ละไอโซเลทในหลอดอาหารวุ้นแข็ง chitin หรือ malt yeast extract glucose agar (MYG) (ภาคผนวก ก)

1.5 ทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง $(28\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 30°C , 37°C และ 45°C

2. การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตโคติเนสในอาหารเหลว Enzyme production medium (EPM) (ภาคผนวก ก)

2.1 นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 1 ทั้งหมด 64 ไอโซเลทรวมกับเชื้อราจากหน่วยเก็บเชื้อมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 6 ไอโซเลท รวม 70 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง chitin ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5-7 วัน นำมาทำ mycelium และ spore suspension โดยเติม 1% tween 80 ที่ปราศจากเชื้อ 3 ml ใช้หัวงอถ่ายเชื้อที่นำเชื้อแล้วขูดเบาๆ ให้สปอร์กระจายแล้วโดยใช้ hemacytometer นับจำนวนสปอร์ ให้ได้จำนวน สปอร์ 1×10^6 - 1×10^8 spores/ml

2.2 เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* sp. PJ15 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณไพรินทร์ บุตรกระจำง) บนอาหาร MRS agar (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทำ suspension โดยขูดเชื้อจาก slant ลงใน 0.2M phosphate buffer pH 7.0 ที่มาเชื้อแล้วเขย่าเทียบจำนวนเซลล์กับ McFarland No. 0.5 ให้ได้จำนวนเซลล์ 10^6 - 10^8 cells/ml

2.3 ปิเปิด mycelium และ spore suspension ของเชื้อรา 0.5 ml และ suspension ของ *Lactobacillus* sp. PJ15 0.5 ml แบ่งลงอาหาร EPM 25 ml ใน flask ขนาด 125 ml ตาม treatment ดังนี้

2.3.1 mycelium และ spore suspension เชื้อรา+EPM

2.3.2 suspension *Lactobacillus* sp. PJ15+EPM

2.3.3 mycelium และ spore suspension เชื้อรา+ suspension *Lactobacillus* sp. PJ15+EPM

2.4 นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วัน

2.5 เก็บ crude enzyme โดยนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (High speed centrifuge, Lab-Line, Model no.3527/3527-1 USA) ที่ 6,000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็น crude enzyme ไปตรวจวัด chitinase activity และวัดปริมาณโปรตีน เพื่อหาค่า specific activity

2.6 การวัดการทำงานของไคตินสโดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Miller (1959) และ ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (1951)

2.6.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี Miller (1959)

การหาค่า chitinase activity วัดได้จาก N-acetylglucosamine ที่ถูกปล่อยออกมาจาก ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทโดยใช้ DNS reagent ทำปฏิกิริยา และใช้ N-acetylglucosamine ในการทำกราฟมาตรฐาน โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.6.1.1 เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย

Enzyme control ประกอบด้วย crude enzyme 500 μ l ผสมกับ 0.2M phosphate buffer (pH 7.0) 1,000 μ l

Substrate control ประกอบด้วย substrate 1,000 μ l ผสมกับ 0.2M phosphate buffer (pH 7.0) 500 μ l

Enzyme substrate ประกอบด้วย crude enzyme 500 μ l ผสมกับ substrate 1,000 μ l

โดย substrate เตรียมได้จาก colloidal chitin 1 g ใน 0.2M phosphate buffer (pH 7.0) 4,000 μ l

2.6.1.2 นำ reaction mixture ไปบ่มพร้อมเขย่าใน magnetic shaking water bath (Julabo Labortechnik. GMBH D-77960 Seelbach and Variomax Telemodule 40S GERMANY) ความเร็วรอบ 600 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

2.6.1.3 เติม DNS reagent 2 ml (ภาคผนวก ข) ลงในแต่ละหลอด

2.6.1.4 ปิดหลอดด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที

2.6.1.5 เติม 40 % sodium potassium tartrate 1 ml แล้วทำให้เย็นทันที

2.6.1.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu UV 2000 Japan) โดยใช้ 0.2M phosphate buffer เป็น blank

กราฟมาตรฐานของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เตรียมจาก N-acetylglucosamine (NAG) ที่มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 mg/ml ในน้ำกลั่น (ภาคผนวก ง)

2.6.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้ Lowry's method (Lowry, 1951)

นำ crude enzyme จากข้อ 2.6 ปริมาตร 3 ml เติมสารละลาย reagent C (ภาคผนวก ข) 3 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลาย Folin - phenol reagent (ภาคผนวก ข) 0.3 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เทียบปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (ภาคผนวก ง) เพื่อนำไปหาค่า specific activity

กราฟมาตรฐานของโปรตีน เตรียมจาก bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 0, 0.03, 0.06, 0.09, 0.12, 0.15, 0.18, 0.21, 0.24 และ 0.27 mg/ml ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ภาคผนวก ง)

3 ทดสอบความสามารถในการผลิตโคตินเอสในอาหารแข็ง

3.1 นำเชื้อราที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์สูงในอาหารเหลวที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Lactobacillus* sp. PJ15 จากข้อ 2 จำนวน 8 ไอโซเลตคือ CK10, CK56, A4, SP4, SP5, SP6, SP7 และ SP9 ทดสอบการผลิตโคตินเอสในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบดเปรียบเทียบกับอาหารแข็งกระดองปู

3.1.1 เตรียมเชื้อราในรูปของ mycelium และ spore suspension โดยเลี้ยงเชื้อราในหลอดอาหารวุ้นเลี้ยง chitin (5 ml) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นเติม 1% tween 80 ฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 15 ml ลงไปใช้เข็มเขี่ยเชื้อราชุดเอาเส้นใยและสปอร์ออกมาแล้วเขย่าให้เข้ากัน นับจำนวนสปอร์ให้ได้ 1×10^8 spores/ml

3.1.2 เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบด เปรียบเทียบกระดองปูบด โดยใช้ mycelium และ spore suspension 5 ml ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ถัง ขนาด 8"x12" ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ประกอบด้วยเปลือกกุ้งบด 5 g และ กระดองปูบด 5 g เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วันเป็นเวลา 1 เดือน

3.1.3 สกัดเอนไซม์ในอ่างน้ำแข็ง โดยเทตัวอย่างลงบีกเกอร์ แล้วเติมน้ำกลั่นมาเชื้อปริมาณ 4 เท่าของน้ำหนักรวมของอาหารแข็ง กวนตลอดเวลานาน 30 นาที แล้วเก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.4 กรอง crude enzyme ด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น แล้วนำส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที 2 ครั้ง เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme นำมาตรวจวัด chitinase activity และวัดปริมาณโปรตีน

3.2 เลือกเชื้อราที่ให้ค่า chitinase activity สูงจากข้อ 3.1 คือเชื้อราไอโซเลท SP6 ที่ให้ค่า chitinase activity สูงในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบดนำมาทดสอบการผลิตไคตินเนสโดยใช้เปลือกกุ้งบดเป็น substrate แบ่งชุดการทดลองดังนี้

ให้	X = เปลือกกุ้งบดมาเชื้อ	LAB = <i>Lactobacillus</i> sp. PJ15
	CSn = ข้าวโพดหมักไม่มาเชื้อ	CSs = ข้าวโพดหมักมาเชื้อ
ชุดการทดลองที่ 1	X+SP6	ชุดการทดลองที่ 2 X+SP6+LAB
ชุดการทดลองที่ 3	X+SP6+LAB+CSn	ชุดการทดลองที่ 4 X+SP6+CSn
ชุดการทดลองที่ 5	X+SP6+กรดแลกติก	ชุดการทดลองที่ 6 X+CSn
ชุดการทดลองที่ 7	X+LAB	ชุดการทดลองที่ 8 X+กรดแลกติก
ชุดการทดลองที่ 9	X+SP6+CSs	ชุดการทดลองที่ 10 X+SP6+LAB+CSs
ชุดการทดลองที่ 11	X+CSs	

3.2.1 เตรียมเชื้อราไอโซเลท SP6 ในรูป mycelium และ spore suspension

3.2.2 เตรียมเชื้อ *Lactobacillus* sp. PJ15 ในรูป suspension โดยเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* sp. PJ15 ในหลอดอาหารรูนีเยียง MRS ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจียเชื้อ *Lactobacillus* sp. PJ15 ลง 0.2M phosphate buffer pH 7.0 มาเชื้อ เขย่าให้เข้ากันแล้วเทียบ McFarland No. 0.5 เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ 1×10^6 - 1×10^8 cells/ml

3.2.3 ปิเปต mycelium และ spore suspension ของเชื้อราไอโซเลท SP6 5 ml และ suspension ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. PJ15 5 ml ลงในอาหารแข็งทั้ง 7 ชุดการทดลอง ซึ่งประกอบด้วยเปลือกกุ้งบด 5 g, ข้าวโพดหมัก 5 g และ 5% กรดแลกติก 5 ml ในถุงพลาสติก ขนาดใหญ่ 8"x12" เปรียบเทียบกับถุงพลาสติกขนาดเล็ก 5"x7" และในจานอาหาร

ขนาด 100x15 mm โดยใช้เปลือกกุ้งบด 2 g ข้าวโพดหมัก 2 g เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน

3.2.4 สกัดเอนไซม์ แล้วเก็บ crude enzyme นำไปตรวจวัด chitinase activity และปริมาณโปรตีน

3.3 เลือกชุดการทดลองจากข้อ 3.2 ที่ให้ค่า enzyme activity สูงทั้งหมด 4 ชุดการทดลองในจานอาหารขนาด 100x15 mm คือ X+SP6, X+SP6+LAB, X+SP6+กรดแลกติก และ X+SP6+CSs ทำการทดลองเปรียบเทียบกับเปลือกกุ้งที่ผ่านการสกัด ไคตินแล้ว ดังนี้

3.3.1 การสกัดไคตินจากเปลือกกุ้ง โดยเริ่มจากกำจัดแร่ธาตุด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 3% (37% HCl) กวนตลอดเวลา 2 ชั่วโมง ด้วย stirring hot plate ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้อัตราส่วนปริมาณเปลือกกุ้งต่อปริมาณกรด (g/v) เป็น 1:10 หลังจากนั้นล้างน้ำแล้วใช้ผ้าขาวบาง 2 ชั้นกรองจนหมดกรด ต่อมำกำจัดโปรตีนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3% กวนตลอดเวลา 2 ชั่วโมง ด้วย stirring hot plate ที่อุณหภูมิ 55±2°C โดยใช้อัตราส่วนปริมาณเปลือกกุ้งต่อปริมาณกรดเป็น 1 : 10 (g/v) หลังจากนั้นล้างน้ำแล้วกรองจนหมดค่าจะได้ไคตินลักษณะสีชมพู (เยวภา และคณะ, 2534) นำไคตินที่ได้ไปเป็นสับสเตรท (เปลือกกุ้งสกัด) เปรียบเทียบกับการใช้เปลือกกุ้งบด

3.3.2 เตรียม mycelium และ spore suspension ของเชื้อราไอโซเลท SP6 และ suspension ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. PJ15

3.3.3 ปิเปต mycelium และ spore suspension ของเชื้อราไอโซเลท SP6 2 ml และ suspension ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. PJ15 2 ml ลงในอาหารแข็งทั้ง 8 ชุดการทดลอง ซึ่งประกอบด้วยเปลือกกุ้งบด 2 g, เปลือกกุ้งสกัด 2 g, กรดแลกติก 2 ml และ ข้าวโพดหมักน้ำเชื้อ 2 g ในจานอาหาร

Xs = เปลือกกุ้งบดน้ำเชื้อ

Xt = เปลือกกุ้งสกัดน้ำเชื้อ

CS = ข้าวโพดหมักน้ำเชื้อ

LAB = *Lactobacillus* sp. PJ15

ชุดการทดลองที่ 1 X+SP6

ชุดการทดลองที่ 2 X+SP6+LAB

ชุดการทดลองที่ 3 X+SP6+กรดแลกติก

ชุดการทดลองที่ 4 X+SP6+CS

ชุดการทดลองที่ 5 Xt+SP6

ชุดการทดลองที่ 6 Xt+SP6+LAB

ชุดการทดลองที่ 7 Xt+SP6+กรดแลกติก

ชุดการทดลองที่ 8 Xt+SP6+CS

3.3.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์เก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วัน

3.3.5 สกัดเอนไซม์ แล้วเก็บ crude enzyme นำไปตรวจวัด chitinase activity และปริมาณโปรตีน

4 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเอสของเชื้อราไอโซเลท SP6

เลือกชุดการทดลองจากข้อ 3.3 ที่ให้ค่า chitinase activity สูงคือ Xt+SP6+CSs มาศึกษาหาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเอส ดังนี้

4.1 ปริมาณ mycelium และ spore suspension ที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเอส

เตรียม mycelium และ spore suspension ของเชื้อราไอโซเลท SP6 ปีเปิด mycelium และ spore suspension ปริมาตร 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ml ตามลำดับ ลงในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยอัตราส่วนของเปลือกกุ้งสกัดต่อข้าวโพดหมักในจานอาหารเท่ากับ 2 g : 2 g บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วัน สกัดเอนไซม์แล้วนำไปหาค่า chitinase activity และปริมาณโปรตีน

4.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการหมักในอาหารแข็งต่อการผลิตไคตินเอส

ใช้เชื้อตั้งต้นของไอโซเลท SP6 ในรูป mycelium และ spore suspension ปริมาตร 3 ml ลงในอาหารแข็งที่ใช้อัตราส่วนของเปลือกกุ้งสกัดต่อข้าวโพดหมักในจานอาหาร เท่ากับ 2 g : 2 g บ่มที่อุณหภูมิ 37°C สกัดเอนไซม์แล้วนำไปหาค่า chitinase activity และปริมาณโปรตีนเพื่อหาค่า specific activity ที่ระยะเวลาในการหมักต่างๆ คือ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ 15 วันตามลำดับ

4.3 วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเอส

ใช้เชื้อตั้งต้นของไอโซเลท SP6 ในรูป mycelium และ spore suspension ปริมาตร 3 ml ลงในอาหารแข็งที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรแตกต่างกันได้แก่ เปลือกกุ้งสกัดต่อข้าวโพดหมัก, เปลือกกุ้งสกัดต่อข้าวโพดสด, เปลือกกุ้งสกัดต่อเปลือกถั่วเขียว, เปลือกกุ้งสกัดต่อเปลือกถั่วลิสง, เปลือกกุ้งสกัดต่อฟางข้าว, เปลือกกุ้งสกัดต่อแกลบ, เปลือกกุ้งสกัดต่อขี้เลื่อยในจานอาหาร โดยใช้ปริมาณเปลือกกุ้งสกัดต่อวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรต่างๆ เท่ากับ 2 g : 2 g นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C สกัดเอนไซม์แล้วนำไปหาค่า chitinase activity และปริมาณโปรตีน

4.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเอส

ใช้เชื้อตั้งต้นของไอโซเลท SP6 ในรูป mycelium และ spore suspension ปริมาตร 3 ml ลงในอาหารแข็งที่ใช้อัตราส่วนของเปลือกกุ้งสกัดต่อฟางข้าวเท่ากับ 2 g : 2 g นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$), 30°C, 37°C และ 45°C เป็นเวลา 7 วัน สกัดเอนไซม์แล้วนำไปหาค่า chitinase activity และ ปริมาณโปรตีน

4.5 เปรียบเทียบสถานะที่เหมาะสมทั้งหมดกับการเติมอาหารพื้นฐาน (basal medium) (ภาคผนวก ก) ลงในอาหารแข็ง

ใช้เชื้อตั้งต้นของไอโซเลท SP6 ในรูป mycelium และ spore suspension ปริมาตร 3 ml ลงในอาหารแข็งที่ใช้อัตราส่วนของเปลือกกุ้งสกัดต่อฟางข้าวเท่ากับ 2 g : 2 g เปรียบเทียบกับอาหาร

แข็งที่เติมอาหารพื้นฐานปริมาตร 3 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน สกัดเอนไซม์แล้วนำไปหาค่า chitinase activity และปริมาณโปรตีน

5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ crude enzyme

เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท SP6 ตามข้อ 4.5 ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งสกัดผสมฟางข้าวไม่เคี้ยวอาหารพื้นฐาน สกัด crude enzyme นำมาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

5.1 เวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์กับสับสเตรท

ตรวจวัด chitinase activity ที่เวลาต่างๆ โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ตามข้อ 2.6.1 แต่เปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์เป็นนำไปบ่มที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที อุณหภูมิ 37°C นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร

5.2 อุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์

ตรวจวัด chitinase activity ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ตามข้อ 2.6.1 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์เป็น 30°C , 37°C , 45°C และ 50°C เป็นเวลา 30 นาที

5.3 ผลของ pH

ตรวจวัด chitinase activity ที่ pH ต่างๆ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามข้อ 2 แต่เปลี่ยนใช้ บัฟเฟอร์ pH 4, 5, 6, 7 และ 8 ในการเตรียมสับสเตรท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

6. การบ่งชนิดของเชื้อราไอโซเลท SP6

นำเชื้อราไอโซเลท SP6 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Czapek's solution agar (ภาคผนวก ก) ที่มี 20 % sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งนำมาเพาะเลี้ยงโดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์ (ภาคผนวก จ) เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอกของเชื้อรา เช่น สี ขนาด รูปร่างของเส้นใยและโคนิเดีย ทดสอบการเจริญของเชื้อราไอโซเลท SP6 ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MYG บ่มที่อุณหภูมิ 20°C , $26-28^{\circ}\text{C}$, 37°C , 45°C และ 55°C เป็นเวลา 7 วัน ทำการบ่งบอกชนิดแล้วจัดลำดับชั้นทางอนุกรมวิธานตามหนังสือ Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett and Hunter, 1987) พร้อมทั้งเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ได้กับหนังสือ The Genus Aspergillus (Raper and Fennell, 1965)