

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อรา

- 1.1 ตัวอย่างดินจากบริเวณใต้ต้นมะขม บริเวณตึกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Microbiology Section Chaing Mai University (MSCMU)
- 1.2 ตัวอย่างดินจากบริเวณที่มีเห็ดเจริญในแหล่งต่างๆ บนคอกยสุเทพ
- 1.3 ตัวอย่างดินโป่งจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน
- 1.4 ตัวอย่างดินบริเวณชายทะเลในจังหวัดระยอง
- 1.5 แหนมเห็ด
- 1.6 เปลือกกุ้งที่นำไปฝังไว้ในดินบริเวณต่างๆ
- 1.7 เชื้อที่ปนเปื้อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 1.8 เชื้อบริสุทธิ์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. อาหารที่ใช้สำหรับแยกและเพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ก)

- 2.1 Basal medium
- 2.2 Chitin agar
- 2.3 Chitin overlay plate (COP)
- 2.4 Enrichment medium
- 2.5 Enzyme production medium (EPM)
- 2.6 Malt extract Yeast extract Glucose agar (MYG)
- 2.7 Potato dextrose agar (PDA)

3. สารเคมี

- 3.1 บัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ค)
 - 3.1.1 Acetate buffer
 - 3.1.2 Phosphate buffer

3.2 สับสเตรท (ภาคผนวก ข)

3.2.1 Ball milled chitin

3.2.2 Colloidal chitin

3.2.3 Swollen chitin

3.3 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Miller (1959) (ภาคผนวก ค)

3.3.1 3,5 dinitrosalicylic acid

3.3.2 Sodium hydroxide (NaOH)

3.3.3 Phenol

3.3.4 Na_2SO_3

3.3.5 Sodium potassium tartrate ($\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

3.3.6 N-acetyl-D-glucosamine ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_6$)

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Modified Lowry (1951)

(ภาคผนวก ค)

3.4.1 Sodium hydroxide (NaOH)

3.4.2 Sodium bicarbonate (NaHCO_3)

3.4.3 Copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

3.4.4 Trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

3.4.5 Folin-ciocaltean reagent

3.4.6 Bovine serum albumin (BSA)

3.5 สารเคมีอื่นๆ

3.5.1 Hydrochloric acid (HCl)

3.5.2 Lactophenol

3.5.3 Sodium chloride (NaCl)

4. เครื่องมือ

4.1 เครื่องชั่งสารอย่างละเอียด Sartorius model LC 620S

4.2 เครื่องวัดพีเอช pH-meter model PHM 61

4.3 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) Shimadzu รุ่น UV 2100

4.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

4.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (shaker water bath)

- 4.6 เครื่องผสมสาร (mixer)
- 4.7 ตู้อบ (hot air oven)
- 4.8 กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope
- 4.9 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) Tomy model SS-305
- 4.10 ตู้ incubator อุณหภูมิ 20, 30, 37, 45°C
- 4.11 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
- 4.12 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow)
- 4.13 ตู้ควัน (Hood) Astec รุ่น BFC10-010LCC

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อรา

ทำการแยกเชื้อราจากตัวอย่างต่างๆ เช่น เปลือกกุ้งที่นำไปฝังดินไว้เป็นเวลา 15 วัน เหย็ดที่มีราขึ้น คัดจากบริเวณที่มีเห็ดขึ้นและดินบริเวณชายทะเล เป็นต้น โดยชั่งตัวอย่างหนัก 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล. ที่บรรจุอาหาร enrichment (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 25 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ปิเปตขนาด 1.0 มล. ลูดยeast suspension ออกมา 0.1 มล. เกลี่ยบนอาหาร chitin overlay plate (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน แยกเชื้อราที่เจริญบนอาหาร chitin overlay plate ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เก็บในอาหารร่วนเยือก Malt extract Yeast extract Glucose agar (MYG) (ภาคผนวก ก) สำหรับตัวอย่างที่มีเชื้อราเจริญอยู่ นำมาแยกเชื้อโดยตรง โดยวิธี streak plate บนอาหาร chitin overlay plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-7 วัน เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารร่วนเยือก MYG

2. การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตโคติเนสในอาหารเหลว Enzyme production medium (EPM)

นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 1 มาทำการทดสอบความสามารถในการผลิตโคติเนสในอาหารเหลว EPM โดยเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ ด้วยวิธีการดังนี้

2.1 ใช้เข็มเย็บเพาะเชื้อราบริสุทธิ์ที่เก็บในอาหารร่วนเยือก MYG จากข้อ 1 เพาะลงในจานอาหารแข็ง chitin agar โดยวิธีการเพาะเป็นจุดกลางจานอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-28±2°C) เป็นเวลา 5 วัน

2.2 ใช้ที่เจาะจุดจอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร (มม.) เจาะปลายเส้นใยที่เจริญบนอาหารแข็ง chitin agar (ภาคผนวก ก) ใส่ในอาหารเหลว EPM จำนวน 5 ขั้ววันที่เจาะจุด

คอร์ก/อาหาร 25 มล. เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน

2.3 ใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว จากข้อ 2.3 ลงในอาหารเหลว EPM อีกครั้ง ปริมาตร 1 มล./อาหาร 25 มล. เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน

2.4 เก็บ crude enzyme โดยใช้เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บส่วนใสเพื่อนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

2.5 วัดค่าการทำงานของเอนไซม์โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Miller (1959) และปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry (1951)

2.5.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี Miller (1959)

2.5.1.1 เตรียม assay mixture ดังนี้

enzyme control : crude enzyme 300 μ l + 0.2 M phosphate buffer pH 7 1,200 μ l

substrate control : colloidal chitin 1,200 (ภาคผนวก ข) μ l + 0.2 M phosphate buffer pH 7 300 μ l

enzyme substrate : crude enzyme 300 μ l + colloidal chitin 1,200 μ l

2.5.1.2 ปั่น assay mixture ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

2.5.1.3 นำ assay mixture มาเติมสาร DNS (ภาคผนวก ค) 2 มล. คัมในน้ำเดือด 15 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็นลงทันที แล้วเติม 40% Na-K-tartrate 1 มล.

2.5.1.4 นำ assay mixture ที่ได้ไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วดูดส่วนใส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

กราฟมาตรฐานของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เตรียมจาก N-acetylglucosamine (NAG) ที่มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 100, 120, 140, 160 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นตามภาคผนวก ง

เอนไซม์ 1 unit หมายถึง เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายให้ได้ N-acetylglucosamine 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ตามสภาวะที่กำหนด

2.5.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้ Lowry's Method (Lowry,1951)

นำ crude enzyme จากข้อ 2.5 ปริมาตร 0.3 มล. เติมน้ำกลั่น reagent C 3 มล. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมน้ำกลั่น phenol reagent 0.3 มล. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (ภาคผนวก ง) เพื่อนำไปหาค่า specific activity

กราฟมาตรฐานของโปรตีน เตรียมจาก bovine serum albumine (BSA) ที่มี ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 และ 350 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น(ภาคผนวก ง)

3. ทดสอบความสามารถในการผลิตโคดีนีสในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

นำเชื้อราที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์สูงในอาหารเหลว จำนวน 20 ไอโซเลทมา ทดสอบการผลิตโคดีนีสในอาหารแข็งเปลือกกุ้งร่วมกับเชื้อราที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้เคยมีผู้ทดสอบแล้วว่าให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงอีกจำนวน 10 ไอโซเลท การทดสอบทำได้ดังนี้

3.1 เตรียมเชื้อราในรูปของ spore suspension โดยการเลี้ยงเชื้อราในอาหารวุ้นเยือก PDA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 5 มล.ลงไป ใช้เข็มเขี่ยเชื้อรา ขูดเอาเส้นใยและสปอร์ออกมา แล้วเขย่าให้เข้ากัน

3.2 ทำการเพาะเชื้อราลงในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง โดยใช้ spore suspension 1 มล. ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ขวด ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื่อนี้ประกอบด้วยเปลือกกุ้งบด 5 กรัม ผสมกับอาหารพื้นฐาน (BSM) (ภาคผนวก ก) 10 มล. (คิดเป็นความชื้นเริ่มต้น 67% ตามภาคผนวก ก.ข้อ 9) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน

3.3 ทำการสกัดเอนไซม์ในอ่างน้ำแข็ง โดยการเติม 0.2M phosphate buffer pH 7 20 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ที่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อราไว้ครบ 15 วันแล้ว ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันทุก 10 นาที จนครบ 60 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เอาเฉพาะ ส่วนใสเป็น crude enzyme

3.4 นำ crude enzyme ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามข้อ 2.5.1 และปริมาณโปรตีนตามข้อ 2.5.2 จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์และ specific activity

4. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของ *Basipetospora* sp CK₄₄

นำ *Basipetospora* sp CK₄₄ มาเพาะเลี้ยงบนสไลด์ (ภาคผนวก จ) เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอกของเชื้อรา โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เช่น ขนาด และรูปร่างของเส้นใย โคนิเดีย พร้อมทั้งสิ่งที่สังเกตได้ นอกจากนี้ยังสังเกตว่ามีการสร้างฟรุติติงบอดี้ (fruiting body) เช่น ascocarp หรือไม่ นำมาจัดลำดับชั้นทางอนุกรมวิธานตามหนังสือ Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett & Hunter, 1987)

5. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄₄

เพาะ *Basipetospora* sp CK₄₄ ลงในจานอาหารแข็ง MYG บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ใช้จุกคอร์กเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. เจาะบริเวณปลายเส้นใยมาเลี้ยงตรงกลางจานอาหาร MYG โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 20°C, 30°C, 37°C และ 45°C วัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเพื่อดูการเจริญบนอาหาร MYG ทุกๆ วัน เป็นเวลา 5 วัน บันทึกการเจริญของเส้นใยที่อุณหภูมิต่างๆ

6. ศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄₄

เพาะ *Basipetospora* sp CK₄₄ ลงในจานอาหารแข็ง MYG บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 วัน ใช้ที่เจาะจุกคอร์กเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. เจาะปลายเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MYG ที่มี pH 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเพื่อดูการเจริญบนอาหาร MYG ทุกๆ วัน เป็นระยะเวลา 5 วัน

7. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของ *Basipetospora* sp CK₄₄

7.1 การศึกษาผลของปริมาณความชื้นในอาหารที่เพาะเลี้ยงต่อการผลิตไคตินเอส

7.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีความชื้นแตกต่างกัน 9 ระดับคือ 44, 50, 55, 58, 62, 64, 67, 69 และ 71 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (ภาคผนวก ก ข้อ 9) ตามสูตรที่ 1 ถึง สูตรที่ 9 ในขบวนการหมัก ขนาด 125 มล

7.1.2 นำ *Basipetospora* sp CK₄₄ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเยิง PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 5 มล. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อรา ขูดเอาเส้นใยและสปอร์ออกมา แล้วเขย่าให้เข้ากัน ใช้ spore suspension ในข้อ 7.1.1 ขวดละ 1 มล. เป็นเชื้อตั้งต้นในการเพาะเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน

7.1.3 เมื่อครบเวลา 15 วันทำการสกัดเอนไซม์ในอ่างน้ำแข็ง โดยการเติม 0.2 M phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 20 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ที่ได้เพาะเลี้ยง *Basipetospora* sp CK₄₄ ใช้

แห้งแล้วคนผสมให้เข้ากันทุก 10 นาที จนครบเวลา 60 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงที่ 4 °C ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสเป็น crude enzyme

7.1.4 นำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้ colloidal chitin (ภาคผนวก ข. ข้อ 1) เป็นสับสเตรท นำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

7.1.5 เปรียบเทียบค่าการทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ที่ได้จากอาหารที่มีความชื้นต่างกัน

7.2 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตโคตินเนสจาก *Basipetospora* sp CK₄₄

7.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้น 67% และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

8 ชุด คือ (ภาคผนวก ก ข้อ 10)

- (1) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน
- (2) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2% + yeast extract 1%
- (3) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%
- (4) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี NaNO_3 2%
- (5) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2%
- (6) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี urea 2%
- (7) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี peptone 2%
- (8) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี yeast extract 2%

7.2.2 ใช้เชื้อตั้งต้นตามข้อ 7.1.2 ขวดละ 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน

7.2.3 ทำการสกัดเอนไซม์ แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น แล้วนำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

7.3 การศึกษาผลของปริมาณ NaNO_3 ที่มีต่อการผลิตโคตินเนสจาก *Basipetospora* sp CK₄₄

7.3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (ภาคผนวก ก) ที่มีปริมาณ NaNO_3 ต่างกันคือ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4% โดยน้ำหนัก มีความชื้น 67%

7.3.2 ใช้เชื้อตั้งต้นตามข้อ 7.1.2 ขวดละ 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน

7.3.3 ทำการสกัดเอนไซม์ แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น แล้วนำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

7.4 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตโคตินเนสจาก *Basipetospora* sp CK₄₄

7.4.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้น 67% มี NaNO₃ 2% ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานและแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน, 11 ชุด คือ (ภาคผนวก ก ข้อ 12)

- | | |
|---|----|
| (1) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน | |
| (2) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี glucose | 1% |
| (3) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี sucrose | 1% |
| (4) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี manitol | 1% |
| (5) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี N-acetyl-D-glucosamine | 1% |
| (6) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี chitosan | 1% |
| (7) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี colloidal chitin | 1% |
| (8) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี swollen chitin | 1% |
| (9) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี ball-milled chitin | 1% |
| (10) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี แป้งข้าวเจ้า | 1% |
| (11) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี แป้งมัน | 1% |

7.4.2 เตรียมเชื้อตั้งต้นตามข้อ 7.1.2 ขวดละ 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน

7.4.3 ทำการสกัดเอนไซม์ แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น แล้วนำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

7.5 การศึกษาผลของปริมาณ colloidal chitin ที่มีต่อการผลิตโคตินเนสจาก *Basipetospora* sp CK₄₄

7.5.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีปริมาณ colloidal chitin ต่างกันคือ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4% โดยน้ำหนักมี NaNO₃ 2% โดยน้ำหนักมีความชื้น 67%

7.5.2 เตรียมเชื้อตั้งต้นตามข้อ 7.1.2 ขวดละ 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน

7.5.3 ทำการสกัดเอนไซม์ แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น แล้วนำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

7.6 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄₄ ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งเพื่อผลิตเอนไซม์

7.6.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้น 67% มี NaNO₃ 2% colloidal chitin 1% โดยน้ำหนักในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (ภาคผนวก ก)

7.6.2 ใช้เชื้อตั้งต้นตามข้อ 7.1.2 ขวดละ 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง, 20, 30, 37 และ 45 °C เป็นเวลา 15 วัน

7.6.3 ทำการสกัดเอนไซม์ แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น แล้วนำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

7.7 การศึกษาผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานต่อการผลิตไคตินเอส

7.7.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีความเป็นกรด-ด่างต่างกันดังนี้คือ 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 โดยใช้ 0.1M HCl และ 0.1M NaOH ในการปรับ pH

7.7.2 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน pH ต่างๆ 10 มล. ค่อยๆ เติมน้ำกลั่น 5 กรัม เพื่อปรับให้มีความชื้น 67%

7.7.3 เตรียมเชื้อตั้งต้นตามข้อ 7.1.2 ใช้ปริมาณ 1 มล. ต่ออาหาร 1 ขวด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน

7.7.4 ทำการสกัดเอนไซม์ แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น แล้วนำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

7.8 การศึกษาผลของชนิดของสารสกัด

7.8.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้น 67% มี NaNO_3 2% colloidal chitin 1% โดยน้ำหนักในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี pH 5

7.8.2 เตรียมเชื้อตั้งต้นตามข้อ 7.1.2 ใช้ปริมาณ 1 มล. ต่ออาหาร 1 ขวด บ่มที่อุณหภูมิห้อง, 20, 30, 37 และ 45 °C เป็นเวลา 15 วัน

7.8.3 ทำการสกัดเอนไซม์ด้วยสารสกัดชนิดต่างๆ ดังนี้

(1) Phosphate buffer pH 7

(2) Phosphate buffer pH 8

(3) Acetate buffer pH 5

(4) Sodium chloride 0.85%

(5) น้ำกลั่น

นำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น แล้วนำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

7.9 การศึกษาผลของระยะเวลาในการสกัดเอนไซม์

7.9.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้น 67% มี NaNO_3 2% colloidal chitin 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี pH 5

7.9.2 เตรียมเชื้อตั้งต้นตามข้อ 7.1.2 ใช้ปริมาณ 1 มล.ต่ออาหาร 1 ขวด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน

7.9.3 ทำการสกัดเอนไซม์ด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7 เป็นเวลา 1, 6 และ 24 ชั่วโมง

7.9.4 นำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น แล้วนำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

7.10 การศึกษาผลของการ treat เปลือกกุ้งด้วยกรดและด่างเพื่อใช้ในการเตรียมอาหาร

7.10.1 ผสมเปลือกกุ้งอบแห้ง 25 กรัม กับ 1.0 N NaOH 250 มล. (สัดส่วน 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 95-100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองและล้างด้วยน้ำจนเป็นกลาง อบที่ 60 °C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ใช้ส่วนที่ได้ 10 กรัม ผสมกับ HCl (1.0 N) 100 มล. (สัดส่วน 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองและล้างด้วยน้ำจนเป็นกลาง อบให้แห้งที่ 60 °C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (สุมาลัย และคณะ, 2540)

7.10.2 ใช้เปลือกกุ้งที่ได้ 5 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน 10 มล. ในการเตรียมอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

7.10.3 เตรียมเชื้อตั้งต้นตามข้อ 7.1.2 ใช้ขวดละ 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน

7.10.4 ทำการสกัดเอนไซม์ แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น แล้วนำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

7.11 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง *Basipetospora* sp CK₄ เพื่อผลิตโคตินีน

7.11.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้น 67% มี NaNO_3 2% colloidal chitin 1% โดยน้ำหนักในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี pH 5

7.11.2 เตรียมเชื้อตั้งต้นตามข้อ 7.1.2 ใช้ปริมาณ 1 มล.ต่ออาหาร 1 ขวด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-20 วัน

7.11.3 ทำการสกัดเอนไซม์ แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น แล้วนำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

7.12 การศึกษาผลของชนิดของเชื้อตั้งต้น (inoculum) ในการเพาะเลี้ยง *Basipetospora* sp CK₄₄ เพื่อผลิตไคตินเอส

7.12.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้น 67% มี NaNO₃ 2% colloidal chitin 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มี pH 5

7.12.2 เตรียมเชื้อตั้งต้น 9 แบบ ดังนี้ (Ikasari, 1994)

- (1) Spore suspension จากอาหารวุ้นเลี้ยง PDA อายุ 3 วัน 1 มล.
- (2) Spore suspension จากอาหารวุ้นเลี้ยง PDA อายุ 5 วัน 1 มล.
- (3) Spore suspension จากอาหารวุ้นเลี้ยง PDA อายุ 7 วัน 1 มล.
- (4) Spore suspension จากอาหารวุ้นเลี้ยง PDA อายุ 9 วัน 1 มล.
- (5) เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว EPM เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณ 1 มล.
- (6) เลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งเปลือกกุ้งเป็นเวลา 15 วัน จากนั้นนำอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ประมาณ 1 กรัม มาใช้เป็นเชื้อตั้งต้น
- (7) เลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งเปลือกกุ้งเป็นเวลา 15 วัน นำขวดรูปชมพูที่มีเชื้อราเจริญอยู่ในอาหารไปอบแห้งที่ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบด จากนั้นนำมา 1 กรัม เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 10 มล. นำมา 1 มล. เพื่อใช้เป็น เชื้อตั้งต้น
- (8) เลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งเปลือกกุ้งเป็นเวลา 15 วัน จากนั้นนำอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ไป อบแห้งที่ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วบด นำมา 1 กรัม เพื่อใช้เป็น เชื้อตั้งต้น

7.12.3 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 วัน ทำการสกัดเอนไซม์แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น แล้วนำมาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

8. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ crude enzyme

8.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตอร์

ตรวจวัด chitinase activity ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยการบ่มส่วนผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง, 30, 37, 40, 45, 50 และ 55°C หลังจากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แล้วนำไปคำนวณหา ค่าการทำงานของเอนไซม์

8.2 เวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรท

ตรวจวัด chitinase activity โดยใช้ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ต่างๆ กันดังนี้คือ 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที หลังจากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แล้วนำไปคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

8.3 pH ที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรท

ตรวจวัด chitinase activity ที่ pH ต่างๆ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา โดยใช้บัฟเฟอร์ pH 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 ในการเตรียมสับสเตรท (ภาคผนวก ค) นำไปบ่มที่ 40°C 30 นาที หลังจากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แล้วนำไปคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์

8.4 ชนิดของไคตินที่ใช้เป็นสับสเตรท

ตรวจวัด chitinase activity โดยใช้สับสเตรทเป็นไคติน 3 ชนิดคือ ball-milled chitin, colloidal chitin และ swollen chitin เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที

9. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate

9.1 แบ่ง crude enzyme ใส่หลอดทดลอง 6 หลอดๆ ละ 10 มล.

9.2 เติม ammonium sulfate ที่บดละเอียดหาค่า 1.07, 1.66, 2.29, 2.95, 3.66 และ 5.23 กรัม ตามลำดับ จะได้ความเข้มข้นเป็น 20, 30, 40, 50, 60 และ 80% saturation ตามลำดับ (ภาคผนวก ข)

9.3 เขย่าเบาๆ ให้ ammonium sulfate ละลายหมด

9.4 ตั้งทิ้งไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

9.5 นำไปเหวี่ยงที่ 6,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที

9.6 แยกส่วนใสและตะกอน แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 มล.

9.7 วัด chitinase activity และ specific activity ในส่วนใส และส่วนตะกอนที่ละลายแล้ว

9.8 เลือกช่วง % saturation ที่ตะกอนให้ค่า enzyme activity 0 ถึง 100%

9.9 นำ crude enzyme มาตกตะกอนอีกครั้ง โดยครั้งแรกใช้ % saturation ที่ตะกอนให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0%

9.10 นำส่วนโสรที่ได้จากการตกตะกอนมาเติม ammonium sulfate อีกครั้งใช้ % saturation ที่ตะกอนให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 100%

9.11 นำส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายด้วยน้ำกลั่นค่อยๆเติมจนตะกอนละลายหมด จากนั้นนำไปวัดค่าการทำงานของเอนไซม์