

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์

- 1.1. จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- 1.2. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 16x150 และ 16x100 mm
- 1.3. ที่วางหลอดทดลอง (rack)
- 1.4. ขวดรูปชมพู่ (flask)
- 1.5. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 250 , 500 และ 1,000 ml
- 1.6. ปิเปต (pipette) ขนาด 1 , 5 , และ 10 ml
- 1.7. auto pipette ขนาด 10-100, 200-1000 μ l และ 1-5 ml
- 1.8. tip สำหรับใช้กับ auto pipette แต่ละขนาด
- 1.9. กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 10 , 50 , 100 และ 1,000 ml
- 1.10. บีกเกอร์ (beaker)
- 1.11. แท่งแก้วคน (stirrer)
- 1.12. หลอดหยด (dropper)
- 1.13. ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 1.14. ช้อนตักสาร (Spatula)
- 1.15. ปากคีบ (forceps)
- 1.16. กรวยแก้ว (funnel)
- 1.17. ที่เจาะคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 , 1.0 cm
- 1.18. แผ่นไม้กระดานสำหรับรองตัดส่วนต่างๆของพืช
- 1.19. เข็มเย็บเชื้อ (needle)
- 1.20. ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
- 1.21. กระดาษอลูมิเนียม (aluminium foil)
- 1.22. สำลี
- 1.23. กระดาษขึงสาร
- 1.24. paraffin film
- 1.25. กระดาษซับ (อาจใช้กระดาษทิชชูหรือกระดาษกรอง)

- 1.26. สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ (slide and cover slips)
- 1.27. แท่งแก้วรูปตัว V
- 1.28. กระดาษวัด pH
- 1.29. ถังพลาสติก
- 1.30. หนังสือ
- 1.31. ไม้บรรทัด
- 1.32. มีดผ่าตัด
- 1.33. ฟ้ายาวบาง
- 1.34. stage micrometer
- 1.35. ocular micrometer

2. เครื่องมือ

- | | |
|---|-------------------------|
| 2.1. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope) | ยี่ห้อ Olympus |
| 2.2. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) | ยี่ห้อ Olympus |
| 2.3. hot plate | ยี่ห้อ Eylea |
| 2.4. ตู้เย็นเก็บสารเคมี | ยี่ห้อ Toshiba, Hitachi |
| 2.5. เตาแก๊ส | |
| 2.6. หม้อนึ่งอ autoclave) รุ่น SS-325 | ยี่ห้อ Tomy |
| 2.7. เครื่องชั่งหยาบ (2 ตำแหน่ง) | |
| 2.8. เครื่องชั่งละเอียด (4 ตำแหน่ง) | ยี่ห้อ Sartorius |
| 2.9. ตู้ถ่ายเชื้อ รุ่น TL 2448 | ยี่ห้อ Holten |
| 2.10. ตู้อบ (hot air oven) | ยี่ห้อ Heraeus |
| 2.11. ตู้บ่มเชื้อปรับอุณหภูมิ 30°C | ยี่ห้อ Memmert |
| 2.12. ตู้บ่มเชื้อปรับอุณหภูมิ 20°C | ยี่ห้อ Sanyo |
| 2.13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ | ยี่ห้อ Memmert |
| 2.14. เครื่องวัด pH รุ่น F21 | ยี่ห้อ Horiba |
| 2.15. เครื่องเหวี่ยง รุ่น EBA 12R | ยี่ห้อ Hettich |
| 2.16. incubator shaker | ยี่ห้อ Lab-Line |
| 2.17. reciprocal shaker รุ่น NR-80 | ยี่ห้อ Taitec |
| 2.18. spectrophotometer รุ่น UV-2100 | ยี่ห้อ Shimadzu |

2.19. vacuum pump

ยี่ห้อ Emerson

3. วัสดุ

- 3.1. มันฝรั่ง
- 3.2. ข้าวโพดบด
- 3.3. เมล็ดข้าวเหนียว

4. ตัวอย่างพืช

- 4.1. กิ่งไผ่ป่า (*Bambusa arundinacea* Wile), BAR
- 4.2. กิ่งไผ่บงหนาม (*B. burmanica* Griff), BBU
- 4.3. กิ่งไผ่บงป่า (*B. longispatha* Kurz), BLO
- 4.4. กิ่งไผ่บง (*B. natan* Wall), BNA
- 4.5. กิ่งไผ่เลียง (*B. ventricosa* Me Clure), BVE
- 4.6. กิ่งไผ่เหลียง (*B. vulgaris* Gamble), BVU
- 4.7. กิ่งไผ่ตง (*Dendrocalamus asper* Backer), DAS
- 4.8. กิ่งไผ่ชางคอย (*D. membranaceus* Munro), DME
- 4.9. กิ่งไผ่ชาง (*D. nudius* Pilg), DNU
- 4.10. กิ่งไม้หกเครือ (*Gigantochloa nigro-ciliata* (Munro) Kurz), GNI
- 4.11. กิ่งไผ่ดำ (*Phyllostachys nigra* Munro), PNI
- 4.12. กิ่งไผ่รวกดำ (*Thyrsostachys oliveri* Gamber), TOL
- 4.13. กิ่งไผ่รวก (*T. siamensis* Gamble), TSI

5. สารเคมี

- 5.1. สารเคมีที่ใช้ในการแยกเชื้อราจากกิ่งไผ่

5.1.1 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite, NaClO_3), ชื่อทางการค้า คลอโรกซ์ (Clorox)

5.1.2 95% ethanol

5.1.3 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

- 5.2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสไลด์กิ่งถาวร

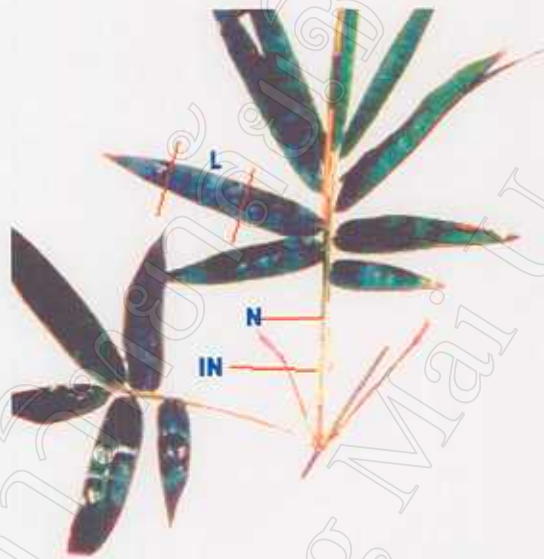
- 5.3.1 lactophenol
- 5.3.1 lactophenol-cotton blue
- 5.2.2 95% , 70% ethanol
- 5.2.3 น้ำกลั่น
- 5.2.4 น้ำยาทาเล็บ
- 5.3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัด mannanase, cellulase, xylanase, และ inulinase โดยวิธี gel diffusion (วิธีเตรียมภาคผนวก ค)
 - 5.3.1 0.1M citrate buffer และ 0.2M phosphate buffer
 - 5.3.2 0.2M K_2HPO_4
 - 5.3.3 congo red 1% (w/v)
 - 5.3.4 1M NaCl
 - 5.3.5 phytigel 0.7% (w/v)
 - 5.3.6 agar 0.7% (w/v)
 - 5.3.7 0.1% substrate 4 ชนิด ได้แก่ cellulose, inulin, xylan และ locust bean gum
- 5.4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (วิธีเตรียมภาคผนวก ค)
 - 5.4.1 DNS-reagent
 - 5.4.2 40% sodium-potassium tartrate
 - 5.4.3 sodium acetate buffer pH 5.6
 - 5.4.4 locust bean gum, gum arabic
- 5.5. สารเคมีที่ใช้ในตรวจวัดปริมาณโปรตีน (วิธีเตรียมภาคผนวก ค)
 - 5.5.1 C-reagent ประกอบด้วย A-reagent (2% w/v Na_2CO_3 ใน 0.1M NaOH) และ B-reagent (0.5% w/v $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ใน 1% Na-K tartrate)}
 - 5.5.2 D-reagent {(1N Folin-ciocalteau reagent sodium hypochlorite ($NaClO_3$))}
- 6. อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก.)
 - 6.1. Potato dextrose agar (PDA)
 - 6.2. 2% Malt extract agar (MA)
 - 6.3. Corn-meal agar (CMA)
 - 6.4. Water agar โรยด้วยเมล็ดข้าวเหนียว (WA+S)
 - 6.5. Locust bean gum agar (LBA)

วิธีการทดลอง

1. ทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ส่วนต่างๆของกิ่งไม้ด้วย 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ก่อนนำมาแยก endophytic fungi

เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่ชิ้นส่วนข้อ ปล้อง และใบของกิ่งไม้ใน 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ในการฆ่าเชื้อปนเปื้อนที่ผิวก่อนนำมาแยก endophytic fungi มีขั้นตอนดังนี้

- (1.) นำตัวอย่างกิ่งไม้ที่ไม่เป็นโรคมาล้างน้ำให้สะอาด
- (2.) ใช้กรรไกรตัดกิ่งตัดส่วนต่างๆของกิ่งไม้คือ ข้อ (node) ปล้อง (internode) ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ส่วนแผ่นใบ (leaf) ตัดหัวและท้ายใบทิ้งไป ดังภาพ 9



ภาพ 9 ส่วนต่างๆของกิ่งไม้ที่ใช้ทดลอง ได้แก่ ข้อ (N), ปล้อง (IN) และ ใบ (L)

- (3.) แช่ใน 95% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 30 วินาที
- (4.) แช่ใน 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ในเวลานานต่างๆกันคือ 0, 1, 2, 3, 4, 5 นาที
- (5.) แช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นเวลา 5 นาที ปลอ่ยทิ้งไว้ให้แห้งโดยนำไปวางบนกระดาษซับที่ปราศจากเชื้อ
- (6.) ผ่าครึ่งส่วนข้อและปล้องแต่ละชิ้น ส่วนใบตัดให้เป็นชิ้นๆ ขนาด 1x1 cm ให้ได้จำนวนส่วนละ 10 ชิ้น นำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MA โดยแต่ละจานอาหารจะวาง 5 ตำแหน่ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20°C

(7.) สังเกตผลการทดลองทุก 5 วัน เป็นเวลา 5-20 วัน วิเคราะห์ผลการเจริญของเชื้อที่เวลาต่างๆเพื่อให้ทราบถึงเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรด์ แยกเชื้อที่เจริญไปทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร potato dextrose agar เก็บเชื้อที่ได้ไว้ใน PDA slant เพื่อจัดจำแนกในระดับ genus ต่อไป

2. การแยก endophytic fungi จากกิ่งไม้

การแยก endophytic fungi จากกิ่งไม้ มีลำดับขั้นตอนดังนี้

- (1.) เก็บตัวอย่างกิ่งไม้ 2 ลักษณะคือ กิ่งแก่ และกิ่งอ่อน
- (2.) นำตัวอย่างมาผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวเหมือนกับข้อ 1 (2-6) แต่ในขั้นตอนการแช่ใน 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ส่วนข้อและเปลือกใช้เวลา 5 นาที ส่วนใบ 2 นาที
- (3.) สังเกตผลการทดลองเป็นเวลา 5-20 วัน แยกเชื้อที่เจริญไปทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร potato dextrose agar เก็บเชื้อที่ได้ไว้ใน PDA slant และหรือ sterile water เพื่อจัดจำแนกในระดับ genus และทดสอบการผลิตเอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์บางชนิดต่อไป

3. การตรวจสอบและบ่งบอกชนิดเชื้อรา endophyte

- (1.) ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยงคือ PDA และ CMA
- (2.) ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์ ทำสไลด์กึ่งถาวร (ภาคผนวก ข) สำหรับชนิดที่สร้างสปอร์จำนวนมาก หรือสปอร์อาจหลุดจากก้านชูสปอร์ง่าย
- (3.) เปรียบเทียบลักษณะต่างๆเพื่อบ่งบอกชนิดของเชื้อราในระดับ genus โดยเทียบกับ key มาตรฐาน เช่น key ของ Von Arx (1981), Banett and Hunter (1987) และ Sutton (1980) เป็นต้น

4. การคัดเลือกเชื้อรา endophyte ที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดหนึ่งชนิดใดได้สูง โดยประยุกต์ใช้วิธี gel diffusion ของ Downie *et al.* (1994)

- (1.) นำเชื้อรา endophyte บริสุทธิ์ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว cultivation medium (ภาคผนวก ก) ที่มี 1% w/v ของโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน (substrate) คือ cellulose, inulin, xylan และ locust bean gum ในหลอดทดลองขนาด 16x150 mm
- (2.) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) บนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวา ด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

(3.) นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 2 มาตรวจการผลิตเอนไซม์ โดยนำมาหยดในหลุม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 mm บนอาหารแข็งซึ่งประกอบด้วย locust bean gum 0.1% (w/v) กับ phyta gel 0.7% (w/v) ใน 1:1 0.1M citrate buffer/0.2M phosphate buffer สำหรับการวัดการผลิต mannanase ส่วนเอนไซม์อื่นๆใช้ substrate นั้นๆ 0.1% (w/v) กับวุ้น 0.7% (w/v) แทน บ่มที่ อุณหภูมิ 40°C ในที่มืด เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

(4.) เท 0.2M K_2HPO_4 ลงไปให้ท่วมผิวหน้า เพื่อปรับสภาพให้เป็นเบส เขย่าเป็น ระยะๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วเททิ้ง

(5.) ข้อมทับด้วย congo red 1.0% (w/v) เป็นเวลา 15 นาที ควรเขย่าอย่างสม่ำเสมอ ระวังอย่าสีข้อมแห้ง แล้วเททิ้ง

(6.) ล้างด้วย 1M NaCl จนสามารถเห็นวงใสได้ชัดเจน วัดขนาดวงใส นำผลที่ได้มา เปรียบเทียบกันระหว่างการใช้ substrate แต่ละชนิด เพื่อเลือกชนิดของเอนไซม์ที่เชื้อราส่วนใหญ่ ผลิตได้ดี แล้วทดสอบเอนไซม์ชนิดดังกล่าวในขั้นตอนอื่นๆต่อไป

5. การคัดเลือกเชื้อรา endophyte ที่ผลิต mannanase ได้สูง โดยวิธี gel diffusion (Downie *et al.*, 1994)

(1.) นำเชื้อรา endophyte บริสุทธิ์ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว cultivation medium ที่มี locust bean gum 1% (w/v) ที่อยู่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 mm

(2.) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวา ด้วยความเร็ว 160 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

(3.) นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 2 มาตรวจการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธี gel diffusion โดย หยดน้ำเลี้ยงเชื้อในหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 mm บนอาหารแข็งซึ่งประกอบด้วย locust bean gum 0.1% (w/v) กับ phytagel 0.7% (w/v) ใน 1:1 0.1M citrate buffer/0.2M phosphate buffer บ่มที่ อุณหภูมิ 40°C ในที่มืด เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

(4.) เท 0.2M K_2HPO_4 ลงไปให้ท่วมผิวหน้า เขย่าเป็นระยะๆ เป็นเวลา 30 นาที เททิ้ง ข้อมทับด้วย congo red 1.0% (w/v) นาน 15 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ แล้วเททิ้ง ขั้นตอนสุดท้าย ล้างด้วย 1M NaCl จนเห็นวงใสได้ชัดเจน

(5.) วัดขนาดวงใส แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อเลือกเชื้อราไอโซเลทที่ให้ วงใสขนาดใหญ่ ซึ่งคาดว่าจะผลิต mannanase ได้ดีไปทดสอบในขั้นตอนถัดไป

6. การคัดเลือกเชื้อรา endophyte ที่ผลิต mannanase ได้สูง โดยวิธี DNS

method (Alberto and Own, 1990 อ้างโดยนลิน, 2541)

(1.) นำเชื้อรา endophyte ที่ให้วงใสขนาด 15-23 mm ในการทดสอบโดยวิธี gel diffusion ในข้อ 4 มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4 วัน

(2.) ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 cm เจาะบริเวณปลายโคโลนีมา 5 ชิ้น เลี้ยงใน seed medium (ภาคผนวก ก) 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml บ่มเป็นเวลา 2 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

(3.) ใช้กล้ำเชื้อที่ได้จากข้อ 2 ปริมาตร 2 ml มาใส่ลงใน cultivation medium ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml บ่มเป็นเวลา 4 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

(4.) เก็บตัวอย่าง crude enzyme โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme แล้วนำไปตรวจวัด mannanase activity และปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ง) คัดเลือกเชื้อราไอโซเลทที่ผลิต mannanase ได้สูงสุดมาศึกษาต่อไป

7. การศึกษาการเจริญของเชื้อรา endophyte ไอโซเลท GnCMU384 บนอาหารแข็ง และการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างสืบพันธุ์เพื่อบ่งบอกชนิดระดับ genus

(1.) ศึกษาการเจริญบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA, CMA, MA, LBA, WA ที่โรยด้วยเมล็ดข้าวเหนียว บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6 วัน ตรวจสอบลักษณะการเจริญของเชื้อ และทำสไลด์กึ่งถาวร

(2.) สังเกตลักษณะเส้นใย สี ลักษณะโคโลนี ตรวจสอบรูปร่างและขนาดสปอร์ นำผลที่ได้ไปเทียบกับ key มาตรฐานเพื่อบ่งบอกชนิดระดับ genus

8. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

ศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase ได้แก่ สูตรอาหารพื้นฐานสำหรับผลิต mannanase ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน pH อาหารเริ่มต้น ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม และเวลาที่เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด

8.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

8.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

(1.) เลี้ยงเชื้อรา GnCMU384 บนอาหารแข็ง LBG บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-5 วัน

(2.) ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 cm เจาะบริเวณปลายโคโลนีมา 5 ชิ้น มาเลี้ยงใน seed medium 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml บ่มเป็นเวลา 2 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

8.1.2 ใช้กล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 8.1.1 ปริมาตร 2 ml มาใส่ลงใน cultivation medium 3 สูตร (ภาคผนวก ก) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ทำ 3 ซ้ำ บ่มเป็นเวลา 4 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

8.1.3 เก็บตัวอย่าง crude enzyme โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme แล้วนำไปตรวจวัด mannanase activity วัดปริมาณโปรตีน คัดเลือกสูตรที่ทำให้ *Fusarium* sp. GnCMU384 ผลิต mannanase ได้สูงสุดมาศึกษาต่อไป

8.2 การศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

8.2.1 เตรียมกล้าเชื้อเหมือนข้อ 8.1.1

8.2.2 ใช้กล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 8.2.1 ปริมาตร 2 ml มาใส่ลงใน cultivation medium ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), NaNO_3 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), corn steep solid 0.1% (w/v), pH 5.5 และมีแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน 13 ชนิดคือ glucose, galactose, mannose, manitol, soluble starch, locust bean gum, แป้งบุก, mannan จาก *Acacia variabilis*, mannan จาก *A. campanulatus*, แป้งข้าวเหนียว, แป้งข้าวเจ้า, ข้าวโพดป่น, และ Arabic gum อย่างละ 1% ทำ 3 ซ้ำ บ่มเป็นเวลา 4 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

8.2.3 เก็บตัวอย่าง crude enzyme โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme แล้วนำไปตรวจวัด mannanase activity วัดปริมาณโปรตีน เลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ทำให้ *Fusarium* sp. GnCMU384 ผลิต mannanase ได้สูงสุดมาศึกษาต่อไป

8.3 การศึกษาปริมาณ locust bean gum ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

8.3.1 เตรียมกล้าเชื้อเหมือนข้อ 8.1.1

8.3.2 ใช้กล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 8.3.1 ปริมาตร 2 ml มาใส่ลงใน cultivation medium ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), NaNO_3 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), corn steep solid 0.1% (w/v), pH 5.5 และมีปริมาณ locust bean gum ที่เป็นแหล่งคาร์บอนต่างกัน 11 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0% (w/v) ทำ 3 ซ้ำ บ่มไว้เป็นเวลา 4 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

8.3.3 เก็บตัวอย่าง crude enzyme โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme แล้วนำไปตรวจวัด mannanase activity วัดปริมาณโปรตีน คัดเลือกระดับปริมาณ locust bean gum ที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้ *Fusarium* sp. GnCMU384 ผลิต mannanase ได้สูงสุดมาศึกษาต่อไป

8.4 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

8.4.1 เตรียมกล้าเชื้อเหมือนข้อ 8.1.1

8.4.2 ใช้กล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 8.4.1 ปริมาตร 2 ml มาใส่ลงใน cultivation medium ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), locust bean gum 3.0% (w/v) pH 5.5 และมีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 9 ชนิดคือ peptone, yeast extract, beef extract, soy bean powder, urea, NaNO_3 , corn steep solid 0.1% (w/v) กับ NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ casein ปริมาณ 0.2% ทำ 3 ซ้ำ บ่มเป็นเวลา 4 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

8.4.3 เก็บตัวอย่าง crude enzyme โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme แล้วนำไปตรวจวัด mannanase activity วัดปริมาณโปรตีน คัดเลือกชนิดแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ *Fusarium* sp. GnCMU384 ผลิต mannanase ได้สูงสุดมาศึกษาต่อไป

8.5 การศึกษาปริมาณ peptone ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

8.5.1 เตรียมกล้าเชื้อเหมือนข้อ 8.1.1

8.5.2 ใช้กล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 8.5.1 ปริมาตร 2 ml มาใส่ลงใน cultivation medium ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), locust bean gum 3.0% (w/v) pH 5.5 และมีปริมาณ peptone ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 11 ระดับคือ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0% (w/v) ทำ 3 ซ้ำ บ่มเป็นเวลา 4 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

8.5.3 เก็บตัวอย่าง crude enzyme โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme แล้วนำไปตรวจวัด mannanase activity วัดปริมาณโปรตีน คัดเลือกระดับปริมาณ peptone ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ *Fusarium* sp. GnCMU384 ผลิต mannanase ได้สูงสุดมาศึกษาต่อไป

8.6 การศึกษาค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมในการผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

8.6.1 เตรียมกล้าเชื้อเหมือนข้อ 8.1.1

8.6.2 ใช้กล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 8.6.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาใส่ลงใน cultivation medium ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), locust bean gum 3.0% (w/v) และ peptone 0.9% (w/v) แล้วปรับระดับ pH ของอาหารต่างๆกันเป็น 2, 3, 4, 5, 5.5, 6, 7, 8, 9, และ 10 โดยใช้ 1M NaOH และ 1M HCl ทำ 3 ซ้ำ บ่มไว้เป็นเวลา 4 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

8.6.3 เก็บตัวอย่าง crude enzyme โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme แล้วนำไปตรวจวัด mannanase activity วัดปริมาณโปรตีน คัดเลือกระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ทำให้ *Fusarium* sp. GnCMU384 ผลิต mannanase ได้สูงสุดมาศึกษาต่อไป

8.7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp.

GnCMU384

8.7.1 เตรียมกล้าเชื้อเหมือนข้อ 8.1.1

8.7.2 ใช้กล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 8.7.1 ปริมาตร 2 ml มาใส่ลงใน cultivation medium ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), locust bean gum 3.0% (w/v) และ peptone 0.9% (w/v) แล้วปรับระดับ pH ของอาหารเป็น 7.0 แยกไปบ่มไว้ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆกัน 3 ระดับคือ อุณหภูมิห้อง, 37°C และ 45°C เป็นเวลา 4 วัน ทำ 3 ซ้ำ

8.7.3 เก็บตัวอย่าง crude enzyme โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme แล้วนำไปตรวจวัด mannanase activity วัดปริมาณโปรตีน เลือกระดับอุณหภูมิในการบ่มที่ทำให้ *Fusarium* sp. GnCMU384 ผลิต mannanase ได้สูงสุดมาศึกษาต่อไป

8.8 การศึกษาไคนetikของการผลิต mannanase โดย *Fusarium* sp. GnCMU384

8.8.1 เตรียมกล้าเชื้อเหมือนข้อ 8.1.1

8.8.2 ใช้กล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 8.8.1 ปริมาตร 2 ml มาใส่ลงใน cultivation medium ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), locust bean gum 3.0% (w/v) และ peptone 0.9% (w/v) แล้วปรับระดับ pH ของอาหารเป็น 7.0 บ่มไว้ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำ 3 ซ้ำ

8.8.3 เก็บตัวอย่าง crude enzyme ทุกๆ 12 ชั่วโมงจนถึงเวลา 132 ชั่วโมง โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที นาน 15 นาทีเก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme แล้วนำไปตรวจวัด mannanase activity วัดปริมาณโปรตีน และหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ เลือกระยะเวลาที่เชื้อจะสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดเพื่อใช้ในการบ่มเชื้อราไอโซเลทนี้ต่อไป

9. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของ crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

ศึกษาคุณสมบัติเฉพาะตัวบางประการของ crude enzyme mannanase ที่ได้จาก *Fusarium* sp. GnCMU384 ได้แก่ pH ของบัฟเฟอร์ ระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ crude enzyme จะทำงานได้ดีที่สุด

9.1 การศึกษาผลของ pH ของบัฟเฟอร์

ตรวจวัด mannanase activity โดยเตรียมส่วนผสมดังภาคผนวก ค แต่ใช้บัฟเฟอร์ ที่ pH ต่างๆดังนี้ sodium acetate buffer 0.1M pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0 และ phosphate buffer 0.1M pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่และวัดปริมาณโปรตีน เลือกกระดับ pH ที่ทำให้ crude enzyme ทำงานได้ดีที่สุดใช้ในการศึกษาต่อไป

9.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิ

ตรวจวัด mannanase activity โดยเตรียมส่วนผสมดังภาคผนวก ค โดยใช้ sodium acetate buffer 0.1M pH 6.5 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆคือ 40, 50, 60, 70, และ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ และวัดปริมาณโปรตีน เลือกกระดับอุณหภูมิที่ทำให้ crude enzyme ทำงานได้ดีที่สุดใช้ในการศึกษาต่อไป

9.3 การศึกษาผลของช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยา

ตรวจวัด mannanase activity โดยเตรียมส่วนผสมดังภาคผนวก ค โดยใช้ sodium acetate buffer 0.1M pH 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 และ 480 นาที แล้วตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ และวัดปริมาณโปรตีน เลือกใช้ช่วงเวลาที่ ทำให้ crude enzyme ทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดต่อไป

10. การตรวจสอบผลผลิตจากการทำงานของ crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

นำ crude enzyme ส่วนที่เหลือจาก ข้อ 7.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรมาเติมด้วย locust bean gum 1% (w/v) ที่ละลายใน sodium acetate buffer 0.1M pH 6.5 0.5 มิลลิลิตรเช่นเดียวกัน บ่มเพาะ

บนเครื่องเย้าต่ออีก 1 วัน เมื่อครบเวลานำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ คูดสารละลายที่ได้มา 2 ไมโครลิตรมา spot บนแผ่น TLC ที่เป็น silica gel นำไปแช่ใน solvent ที่ประกอบด้วย 1-butanol : 2 propanol : water ในอัตราส่วน 10 : 5 : 4 แล้วพ่นด้วย develop spot ซึ่งประกอบด้วย panisaldehyde : H_2SO_4 : ethanol ในอัตราส่วน 1 : 1 : 18 ก่อนนำไปอบที่ $100^{\circ}C$ เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลโดยเทียบกับสารมาตรฐานของโมนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ หรือไตรแซคคาไรด์ต่างๆ