

อุปกรณ์และวิธีการ อุปกรณ์และสารเคมี

1. วัสดุดิบ

การวิจัยนี้ใช้ส่วนสับประดพันธ์กล้วยไม้ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ เปลือก จุก และแกน โดยผสมให้เข้ากัน แต่ส่วนที่ใช้เป็นหลักในการทำวิจัยนี้คือ เปลือก โดยในเปลือกสับประดนั้นประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งนำมาผ่านการปรับสภาพ เพื่อแยกเอาเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออก จากนั้นนำเซลลูโลสที่ได้มาทำการทดลอง

ก. อุปกรณ์

1. บีกเกอร์
2. ขวดปรับปริมาตร
3. Hot plate
4. เครื่องชั่ง
5. Water bath
6. ตะแกรงร่อน
7. ถาดอะลูมิเนียม
8. Hot air oven

ข. สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลลาร์
2. เปลือกสับประด

2. การเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR 3080 และ *Trichoderma reesei* TISTR 3081

เซลลูโลสถูกย่อยจากเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR 3080 และ *Trichoderma reesei* TISTR 3081 ซึ่งเชื้อราได้จากการเลี้ยงและต่อเชื้อไว้ซึ่งต้องใช้อุปกรณ์ต่อไปนี้

2.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR 3080 และ *Trichoderma reesei* TISTR 3081

ก. อุปกรณ์

1. ตู้ถ่ายเชื้อ

2. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
3. จานเพาะเชื้อ
4. หลอดทดลองชนิดมีฝาปิด
5. เข็มเย็บเชื้อ
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. เครื่องชั่ง
8. Hot air oven

ข. สารเคมี

1. เชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR 3080 และ *Trichoderma reesei* TISTR

3081

2. อาหารแข็งสูตรพีดีเอ (PDA)

2.2 ขั้นตอนการย่อยสลายเซลล์ด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา

ก. อุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู่
2. เครื่องเขย่า
3. ตู้ถ่ายเชื้อ

ข. สารเคมี

1. อาหารเหลว
2. เซลล์จากเปลือกสับปะรด
3. เชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR 3080 และ *Trichoderma reesei* TISTR 3081

2.3 การนับจำนวนเซลล์และหาความเข้มข้นของเชื้อรา

ก. อุปกรณ์

1. ปิเปต
2. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
3. กล้องจุลทรรศน์
4. Haemocytometer
5. ขวดรูปชมพู่

ข. สารเคมี

1. เชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR 3080 และ *Trichoderma reesei* TISTR 3081
2. อาหารแข็งสูตรพีดีเอ
3. น้ำกลั่น

2.4 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ก. อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)
2. เครื่องเหยียงแยกตะกอน
3. บีกเกอร์
4. กระจกน็อคน้ำกลั่น
5. หลอดทดลอง

ข. สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. สารละลายจากการย่อยเซลล์จากเปลือกสับปะรด

2.5 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีโซโมจาเย – เนลสัน

ก. อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าความดูดกลืนแสง
2. คิวเวต (cuvette)
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
4. หลอดทดลอง
5. ปิเปต
6. แท่งแก้วคนสาร
7. ขวดปรับปริมาตร

ข. สารเคมี

1. Rochelle Salt (Na K Tartrate)
2. Anhydrous Na_2CO_3
3. $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \bullet 5\text{H}_2\text{O}$
4. Anhydrous Na_2SO_4
5. NaHCO_3
6. Ammonium Molybdate
7. กรดซัลฟิวริก

8. Na_2HAsO_4

9. น้ำกลั่น

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ใช้วิธี Standard Addition ในการหาปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก

ก. อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. คิวเวต (Cuvette)
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส
4. ขวดปริมาตร 250 มิลลิลิตร
5. ปิเปตขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร
6. หลอดทดลองขนาดกลางที่มีฝาปิด
7. แท่งแก้วคนสาร

ข. สารเคมี

1. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต
2. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น
3. เอทานอลบริสุทธิ์
4. น้ำกลั่น

วิธีการทดลอง

3. การเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR 3080 และ *Trichoderma reesei* TISTR 3081

3.1. การเตรียมอาหารแข็งสูตรพีดีเอ (Potato Dextrose Agar ; PDA)

1.เตรียมอาหารแข็งสูตรพีดีเอ (Potato Dextrose Agar ; PDA) (ภาคผนวก) จากนั้นทำการเขย่าให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.นำอาหารที่ได้จากข้อ 1. ขณะที่ยังอุ่นและเหลวเทลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเย็นลงในตู้เย็นเชื้อ

3.2 การเลี้ยงเชื้อรา

1. นำเชื้อรามามาเพาะบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งในตู้ถ่ายเชื้อ โดยการนำเข็มเจาะเชื้อที่สะอาดมาลนไฟให้เข็มร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่อาจติดมากับเข็ม จากนั้นรอให้เข็มเย็นตัวลงแล้วทำการเจาะสปอร์ และเสียบใยลงบนกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งอยู่ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 – 14 วัน จนได้เชื้อราที่เขียวและกระจายเต็มจานเพาะเชื้อ

2. นำเชื้อราทำการเพาะในข้อที่ 1 โดยทำการเลือกวันที่มีอายุ 4 -5 วันมาทำการส่องกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะพื้นฐานของเชื้อรา

3.3 การนับสปอร์เชื้อรา

การนับสปอร์เชื้อราโดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ใช้เครื่องมือ Counting chamber หรือ Haemocytometer โดยการนับจำนวนสปอร์ในปริมาตรที่ทราบค่าแน่นอนแล้วคำนวณกลับจะทราบว่าในหนึ่งหน่วยปริมาตรมีจำนวนสปอร์เท่าไร

1. นำเม็ดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 8- 10 เม็ด ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อรา จากนั้นทำการเขย่าให้เม็ดแก้วกลิ้งทั่วรอบจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 5 นาที

2. เติมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพาะเชื้อราในข้อที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3. ปิเปตสารในข้อ 2 มา 10 มิลลิลิตร โดยใส่หลอดทดลอง ถ้าปริมาตรไม่ถึง 10 มิลลิลิตร ให้เติมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าโดยเครื่อง

4. นำสารในข้อ 3. ไปนับจำนวนสปอร์ (ภาคผนวก)

5. ถ้าไม่สามารถนับจำนวนสปอร์ได้ เนื่องจากมีจำนวนสปอร์หนาแน่นมาก ให้ทำการเจือจาง โดยทำการปิเปตสารในข้อ 3 มา 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าเพื่อนำไปนับจำนวนสปอร์ ถ้ายังนับไม่ได้ให้ทำการเจือจางจนนับจำนวนสปอร์ได้

4. การเตรียมเปลือกสับปะรดและอาหารเหลวสำหรับการหมัก

1. นำเปลือกสับปะรดมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆและปั่นให้ละเอียดแล้วนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมลาร์ ในอัตราส่วนเปลือกสับปะรด 1 กรัมต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 มิลลิลิตรหรือพอท่วมที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ปิดกระดาดฟอยล์ให้เรียบร้อย)

2. นำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมลาร์ ในสัดส่วนเดิมลงไปในตะกอน แล้วนำไปต้มด้วยเครื่องอังน้ำอุ่น ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที หลังจาก

นั้นทิ้งไว้ให้เย็น(เก็บโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้แล้ว แล้วนำมาใช้หมักใหม่ครั้งต่อไปในอัตราส่วนของเก่าและใหม่ 50:50)

3. นำไปกรองด้วยผ้าขาวบางจนได้ตะกอนวัตถุดิบ นำตะกอนไปล้างด้วยน้ำกลั่น จนมีค่า pH เป็นกลาง

4. นำตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสจนแห้ง ซึ่งเรียกตะกอนนี้ว่าเซลลูโลส ทำการวิเคราะห์น้ำหนักที่หายไประหว่างการปรับสภาพ และวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสที่ได้ต่อน้ำหนักสับปะรด

5. การหมักเปลือกสับปะรดขึ้นต้นเชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR 3080 และ *Trichoderma reesei* TISTR 3081

การย่อยเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR 3080 และ *Trichoderma reesei* TISTR 3081 ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้อัตราส่วนเปลือกสับปะรด 50 กรัม ต่ออาหารเหลว

5.1 การหมักเซลลูโลสแบบต่อเนื่อง

1. นำเซลลูโลสที่ปรับสภาพใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 2 ลิตร จำนวน 2 ขวด ปริมาตรขวดละ 50 กรัม แล้วนำอาหารเหลวที่เตรียมไว้ใส่ลงในขวดรูปชมพู่เดิมทั้ง 2 ขวด ปริมาตรขวดละ 1 ลิตร โดยใช้อัตราส่วนเปลือกสับปะรดต่ออาหารเหลวเป็น เปลือกสับปะรด 1 กรัม ต่ออาหารเหลว 20 มิลลิลิตร

2. นำเชื้อราที่มีอายุ 7 วัน (ที่โตเต็มที่แล้ว) มาทำเป็นวง (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยนำมาทั้งเชื้อราและอาหารแข็งฟิดีเอ) จำนวน 60 วง แบ่งใส่ลงไปในขวดที่มีเปลือกสับปะรดพร้อมอาหารเหลวแล้ว จำนวนขวดละ 30 วง

3. นำปากขวดดังกล่าวไปลงไฟและอุดปากขวดด้วยล้าเพื่อป้องกันการปนเปื้อน เช่าผสมให้เข้ากันขึ้นต้น จากนั้นดึงสารตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่า pH ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และค่าปริมาณเชื้อราที่เริ่มต้น นำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุเซลลูโลส อาหารเหลว และเชื้อรา ไปแช่ที่เครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเก็บสารตัวอย่างทุกๆ ชั่วโมง มาวัดค่า pH วิเคราะห์ปริมาณเชื้อราและน้ำตาลรีดิวซ์

หมายเหตุ ขวดรูปชมพู่ใบที่ 1 ใช้เก็บข้อมูลชั่วโมงที่ 1 -11 และ 24 – 35

ขวดรูปชมพู่ใบที่ 2 ใช้เก็บข้อมูลชั่วโมงที่ 12 – 25 และ 36 – 40

5.2 การหมักเซลลูโลสแบบต่อเนื่องเชื้อราอายุ 7 วัน กับ 9 วัน

1. นำเซลล์ูโลสที่ปรับสภาพแล้วใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 5 ลิตร จำนวน 50 กรัม จากนั้นใส่อาหารเหลวลงไปปริมาตร 1 ลิตร (สัดส่วน 1 ต่อ 20 คือเซลล์ูโลส 1 กรัม ต่ออาหารเหลว 20 มิลลิลิตร) ทำเช่นนี้ทั้งหมด 4 ขวด

2. นำเชื้อราที่มีอายุ 7 วันใส่ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุเซลล์ูโลสและอาหารเหลวทั้ง 2 ขวด โดยนำราที่มีอายุ 7 วัน จำนวน 1 จานเพาะเชื้อใส่ลูกแก้วประมาณ 10 – 15 เม็ด ใส่น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าจานเพาะเชื้อเบาๆเพื่อให้สปอร์ของเชื้อราหลุดออก เก็บตัวอย่างไปหาปริมาณเชื้อราเริ่มต้น แล้วเทลงในขวดรูปชมพู่ที่มีเซลล์ูโลสและอาหารเหลวที่เตรียมไว้แล้วเขย่าให้เข้ากัน

3. ทำตามวิธีข้างต้น แต่เปลี่ยนมาใช้เชื้อราที่มีอายุ 9 วัน

4. เก็บสารตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่า pH ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และค่าปริมาณเชื้อราที่เริ่มต้น นำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุเซลล์ูโลส อาหารเหลว และเชื้อรา ไปเขย่าที่เครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเก็บสารตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง มาวัดค่า pH วิเคราะห์ปริมาณเชื้อราและน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อเปรียบเทียบเชื้อราที่มีอายุ 7 วัน กับ 9 วัน

หมายเหตุ ขวดรูปชมพู่ขวดแรกของราทั้ง 7 วัน และ 9 วัน จะแทนชั่วโมงที่ 2 – 10 , 24 -34 และ 48

ขวดรูปชมพู่ขวดแรกของราทั้ง 7 วัน และ 9 วัน จะแทนชั่วโมงที่ 12 – 22 , และ 36 – 46