บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

1.1 จุลินทรีย์จากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ ดินจากแหล่งปลูกป่านศรนารายณ์ เศษใบแห้ง เศษต้นป่านที่ตายแล้ว น้ำคั้นจากใบป่านสด น้ำที่ขังอยู่บนพื้นดินจากโรงงานผลิตเชือก

1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมได้แก่ Candida brassicae IFO 1664 Saccharomyces cereviseae TISTR 5021 Zymomonas mobilis UQM 410 และ Trichoderma reesei QM 9414 ได้รับจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์แห่งภาคพื้นเอเชียอาคเนย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Bongkok MIRCEN)

2. กากเส้นใยป่านศรนารายณ์ ซึ่งได้จากวัสดุเหลือทิ้งของโรงงานทำเชือกป่านมะนิลาที่อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่

3.1 เครื่องวัดน้ำตาลกลูโคส YSI model 27 USA

3.2 เครื่องวัดแอลกอฮอล์ Gas liquid chromatography with flame ionization detection (Shimadzu, 7AG)

4. สารเคมี

4.1 ของ M & B (May & Baker LTD. Dagenhan England) Analyticals grade

4.3 carboxymethyl cellulose (Sigma No C-8758)

4.4 microcrystalline cellulose (Merk Art 2331)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ เก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากวัสดุต่อไปนี้

- ดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์
- เศษใบแห้งของป่านศรนารายณ์
- เศษต้นป่านศรนารายณ์ที่ตายแล้ว
- น้ำคั้นจากใบป่านสด
- น้ำที่ขังอยู่ตามพื้นดินจากโรงงานผลิตเชือก

โดยการเก็บตัวอย่าง ดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ เศษใบแห้งของป่านศรนารายณ์ เศษต้นป่านศรนารายณ์ที่ตายแล้ว น้ำคั้นจากใบป่านสด จากอำเภอโนนสูง จังหวัดนครราชสีมา และดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ เศษใบแห้งของป่านศรนารายณ์ น้ำคั้นจากใบป่านสด น้ำที่ขังอยู่ตามพื้นดินจากโรงงานผลิตเชือก จากอำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

2. การคัดแยกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ เศษใบแห้งของป่านศรนารายณ์ และเศษต้นป่านศรนารายณ์ที่ตายแล้ว

2.1 การคัดแยกขั้นที่หนึ่ง (primary screening) โดยวิธีของ Mandels และ Sternberg (1976) นำตัวอย่างดิน เศษใบแห้งและเศษต้นป่านที่ตายแล้ว อย่างละ 10 กรัม มาเขย่ากับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มล. นาน 2 นาที ดูดเอาสารแขวนลอย (suspension) 1 มล. ใส่ในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. ที่บรรจุ Czapex's dox medium 100 มล. มีกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 2.0 x 10.0 ซม. เป็นแหล่งคาร์บอนจุ่มอยู่ (ภาคผนวก ก.1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงแยกเชื้อราออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA (ภาคผนวก ก.3) เพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์เมื่อได้เชื้อราบริสุทธิ์แล้วนำมาเลี้ยงอีกครั้งบนอาหารแข็งสูตร PDA 7 วัน ตัดปลายเส้นใยให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ซม. จำนวน 2 ชิ้น ถ่ายลงสู่ agar slant สูตร PDA 2 หลอด หลอดที่หนึ่งใช้เป็น stock culture หลอดที่สองเอาไปทดสอบขั้นตอนต่อไป

2.2 การคัดแยกขั้นที่สอง (secondary screening) โดยวิธีของ Hankin และ Anagnostakis (1977) นำเชื้อราที่คัดแยกได้จากขั้นที่หนึ่ง มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน ตัดปลายเส้นใยให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ซม. นำไปเลี้ยงบน CMC agar (ภาคผนวก ก.2) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วันแล้วราดทับด้วย 0.01 % Congo red ทิ้งไว้ 10 นาที ล้างออกด้วย 1 M. NaCl แยกเอาเชื้อราที่เกิดบริเวณวงใสออกมา

2.3 การคัดแยกขั้นที่สาม (tertiary screening) โดยวิธีการของหรรษา ปุณณะพยัคฆ์ (2532) นำเชื้อราที่คัดแยกได้จากขั้นที่สอง มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน

ตัดปลายเส้นใยให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ซม. 5 ชิ้น ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. ที่บรรจุ production medium 100 มล.(ภาคผนวก ก.11) นำไปเขย่าบน เครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 7 วัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่อุณหภูมิ 30°,37° และ 45 °C แยกเอาเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดโดยเอาเอนไซม์ที่ได้มาทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี CMC assay (Mandels, 1976) โดยเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อรา Trichoderma reessei QM 9414 ที่เลี้ยงในอาหารและอุณหภูมิเดียวกัน

3. การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากดินบริเวณใต้ต้นปาล์มศรนารายณ์ เศษใบแห้งของปาล์มศรนารายณ์ และเศษต้นปาล์มศรนารายณ์ที่ตายแล้ว

3.1 การคัดแยกขั้นที่หนึ่ง โดยวิธีการของ Thayer และDavid (1978) นำตัวอย่างดินบริเวณใต้ต้นปาล์มศรนารายณ์ เศษใบแห้งของปาล์มศรนารายณ์และเศษต้นปาล์มศรนารายณ์ที่ตายแล้ว อย่างละ 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. ที่บรรจุสารละลาย physiological saline (0.9 % NaCl) 95 มล. ที่ปลอดเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน ดูดสารละลาย 1 มล. ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. ที่บรรจุ mineral salt medium 100 มล. (ภาคผนวก ก.12) มีกระดาษกรอง Whatman No.1 ที่ตัดเป็นชิ้นขนาด 1.0 x 1.0 ซม. หนัก 8 กรัม เป็นแหล่งคาร์บอนด์นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 7 วัน ดูดสารละลายมาเจือจางด้วยสารละลาย physiological saline อัตราส่วน 1:1000 นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร TSA (ภาคผนวก ก.3) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นแยกเอาโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร TSA ให้ได้โคโลนีเดี่ยวอีกครั้ง จึงแยกเอาโคโลนีเดี่ยวที่ได้ใหม่ถ่ายลงสู่ agar slant สูตร TSA 2 หลอด หลอดที่หนึ่งใช้เป็น stock culture หลอดที่สองใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.2 การคัดแยกขั้นที่สอง โดยวิธีของ Hankin และAnagnostakis (1977) นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากขั้นที่หนึ่งมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร TSB (ภาคผนวก ก.5.2) นาน 12 ชม. บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจุ่มลงไปในอาหารแล้วแทงลงใน CMC agar (ผนวก ก.2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน ราดทับด้วย 0.1 % Congo red ทิ้งไว้ 10 นาที ล้างออกด้วย 1 M.NaCl แยกเอาแบคทีเรียที่เกิดบริเวณวงใสออกมา

3.3 การคัดแยกขั้นที่สาม โดยวิธีของ Chosson และ Dupuy (1983) นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากการคัดแยกขั้นที่สองมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร TSB นาน 12 ชม. บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ถ่ายเชื้อลงฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่บรรจุ enriched medium 100 มล. (ภาคผนวก ก.13) โดยให้ทุกๆ ฟลาสก์ มีเซลล์แบคทีเรีย

2 x 10^8 เซลล์ ด้วยการนับเซลล์โดยตรง (direct count) จาก hemacytometer นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 7 วัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่อุณหภูมิ 30°,37°และ45°C แยกเอาเอนไซม์ที่ได้มาทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี CMC assay (Mandels, 1976)

4. การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์

4.1 การคัดแยกขั้นที่หนึ่ง โดยวิธีของ คำนูณและคณะ (2526) นำตัวอย่างน้ำคั้นจากใบปานสด น้ำที่ขังอยู่ตามพื้นดินโรงงานผลิตเชือก อย่างละ 1 มล. และเศษลำต้นปานสด 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุหลอดเก็บกาซ (Durham tube) และ detection medium 14 มล. (ภาคผนวก ก.6) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชม. เลือกเอาเฉพาะหลอดที่มีกาซอยู่ในหลอดเก็บกาซมากกว่าครึ่ง มาแยกเชื้อจุลินทรีย์ โดยการนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร TSA เพื่อให้ได้โคโลนีเดียว แล้วนำโคโลนีเดียวที่ได้มาเพาะเลี้ยงซ้ำอีกครั้ง เพื่อให้ได้โคโลนีเดียวจึงถ่ายลง agar slant สูตร PYA 2 หลอด (ภาคผนวก ก.15) หลอดที่หนึ่งใช้เป็น stock culture หลอดที่สองใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

4.2 การคัดแยกขั้นที่สอง โดยวิธีของ คำนูณและคณะ (2526) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากการคัดแยกขั้นที่หนึ่งมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร differential medium (ภาคผนวก ก.8) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน คัดแยกเอาโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียออกมาแล้วถ่ายลงสู่ agar slant สูตร PYA 2 หลอด หลอดที่หนึ่งใช้เป็น stock culture หลอดที่สองใช้ทดสอบขั้นตอนต่อไป

4.3 การคัดแยกขั้นที่สาม โดยวิธีของคำนูณและคณะ (2526) นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากการคัดแยกขั้นที่สองมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PYB (ภาคผนวก ก.15.2) นาน 12 ชม. ถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. ที่บรรจุ fermentation medium 100 มล. (ภาคผนวก ก.7) โดยให้แต่ละฟลาสก์มีเซลล์แบคทีเรีย 6.5x10^9 เซลล์ ด้วยการนับเซลล์โดยตรงจาก hemacytometer นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 3 วัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 30°,37°และ 45 °C นำปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นมาวัดด้วยเครื่องวัดแอลกอฮอล์ YSI model 27 เปรียบเทียบปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย <u>Zymomonas</u> <u>mobilis</u> UQM 401 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเดียวกันและที่อุณหภูมิเดียวกัน

5. การคัดแยกยีสต์ที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์

5.1 การคัดแยกขั้นที่หนึ่ง โดยวิธีของ Kumnuant และคณะ (1981) นำตัวอย่าง น้ำคั้นจากใบปานสด น้ำที่ขังอยู่ตามพื้นดินโรงงานผลิตเชือก อย่างละ 1 มล. และเศษลำต้นปานสด 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ molasses medium 10 มล. (ภาคผนวก ก.9)

นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน รินน้ำใสทิ้งเอาตะกอนยีสต์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YMA (ภาคผนวก ก.4) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวแล้วนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเพาะเลี้ยงซ้ำเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวอีกครั้งแล้วจึงถ่ายลงสู่ agar slant สูตร YMA อย่างละ 2 หลอด หลอดที่หนึ่งใช้เป็น stock culture หลอดที่สองใช้ทดสอบขั้นตอนต่อไป

5.2 การคัดแยกขั้นที่สอง โดยวิธีของ Szczodrak และTargonski (1988) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยยีสต์ที่ได้จากการคัดแยกขั้นที่หนึ่ง ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. ที่บรรจุ Basal medium 100 มล. (ภาคผนวก ก.10) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชม.ถ่ายเชื้อยีสต์ลงสู่ฟลาสก์ ขนาด 250 มล. ที่บรรจุ fermentation medium 100 มล.(ภาคผนวก ก.10.1) ให้แต่ละฟลาสก์มีเซลล์ยีสต์ 6.5×10^9 เซลล์ ด้วยการนับเซลล์โดยตรง จาก hemacytometer นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 30°, 37° และ 45°C นำปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นมาวัดด้วยเครื่องวัดแอลกอฮอล์ YSI model 27 เปรียบเทียบปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดจากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces serevisiae* TISTR 5021 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเดียวกันและที่อุณหภูมิเดียวกัน

6. การจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา

นำเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดจากเชื้อที่คัดแยกได้มาเลี้ยง โดยใช้วิธีเลี้ยงบนสไลด์ (slide culture technique)

6.1 วางสไลด์เลี้ยงเชื้อและกระจกปิดสไลด์บนแท่งแก้วรูปตัว V ในจานเพาะเชื้อที่ปิดฝาแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

6.2 การเพาะเชื้อ ตัดวุ้นเลี้ยงเชื้อให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ซม. จากอาหารสูตร PDA วางบนสไลด์ในจานเพาะเชื้อ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยของเชื้อราที่จะทำการเพาะลงบริเวณด้านข้างทั้งสี่ด้านของชิ้นวุ้น แล้วใช้กระจกปิดสไลด์วางทับบนชิ้นวุ้น ใส่ก้อนสำลีชุบน้ำที่ปราศจากเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ

เมื่อเชื้อราเจริญดีแล้วนำมาศึกษาลักษณะ ทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และจำแนกชนิดโดยอาศัยแนวของ Barnett (1972)

7. การจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย

7.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด และแบคทีเรียที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้มากที่สุดจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร TSB นาน 24 ชม.

7.2 นำเซลล์แบคทีเรียมาย้อมแบบแกรม (Gram stain) และตรวจดูการติดสีของเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

7.3 นำเซลล์แบคทีเรียมาย้อมสปอร์ด้วยสี Malachite green และตรวจดูการติดสีของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า สปอร์จะติดสีเขียวส่วนอื่น ๆของเซลล์จะติดสีแดง

7.4 การทดสอบทางชีวเคมี

นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว จากข้อ 8.1 มาใส่ในอาหารทดสอบต่างๆ ที่จัดเตรียมไว้ แล้วดูผลที่เกิดขึ้นจากสีของอาหารที่เปลี่ยนไป โดยอาศัยแนวของ Bergey 's Manual (1974)

8. การจำแนกสายพันธุ์ยีสต์

8.1 ทดสอบการสร้างเส้นใยเทียม (Pseudomycelium)

นำยีสต์ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้มากที่สุดจากที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YM นาน 7 วัน ดูลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น ดูสีของโคโลนี ดูขอบโคโลนีแล้วตัดปลายโคโลนีออกมาวางบนแผ่นสไลด์ หยดทับด้วยสี methylene blue 1 หยด กดทับด้วยแผ่นแก้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยอาศัยแนวของ Lodder (1971)

8.2 ทดสอบการสร้างสปอร์

นำยีสต์มาเลี้ยงบน potassium acetate medium (ภาคผนวก ก. 15)นาน 1 เดือน แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยยีสต์ออกมาวางบนแผ่นสไลด์หยดทับด้วยสี methylene blue 1 หยด กดทับด้วยแผ่นแก้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

9. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราโดยวิธีของ หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ (2532)

นำเชื้อราที่ให้ปฏิกริยาเอนไซม์เซลลูเลสดีที่สุดและเชื้อรา T.reessei QM 9414 ที่ใช้เป็นเชื้อมาตรฐาน มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YMA อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน ตัดปลายเส้นใยให้เป็นชิ้น ๆ ขนาด 0.5 x 0.5 ซม. 30 ชิ้น ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 500 มล. ที่บรรจุ production medium 200 มล. และ microcrytalline cellulose 6 กรัม นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน นำมาปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ นาน 5 นาที แยกเอา crude enzyme ออกมาเพื่อนำไปทดสอบต่อไป (ภาคผนวก ข.3)

10. วิธีการหมักแอลกอฮอล์แบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) (หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, 2532)

10.1 การเตรียมยีสต์ ทำโดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยยีสต์จาก slant ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร YMB นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 24 ชม.

10.2 การหมักแอลกอฮอล์แบบ SSF นำเส้นใยที่เตรียมไว้ มา 3 กรัมน้ำหนักแห้ง ใส่ลงในฟลาสก์ 250 มล. เติม 0.04 M. acetate buffer pH 5 10 มล. (ภาคผนวก ข.6) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 121 °C นาน 20 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกได้ 80 มล. และเติมเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้โดยให้มีเซลล์ยีสต์ 3×10^9 ทุก ๆ ฟลาสก์ ด้วยการนับเซลล์โดยตรงจาก hemacytometer นำไปเขย่าบน water bath shaker ที่ความเร็ว 70 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 40 °C เก็บผลการทดลองทุก ๆ 3 5 และ 7 วัน เพื่อวัดปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น