บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เชื้อรา *Phanerocheate chrysosporium* ได้รับความอนุเคราะห์จาก
   ผศ.ดร หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
   เชื้อรา *Ganoderma lucidum* 2002 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. มุกดา อูหิรัญ
2. เยื่อกระดาษทำจากไม้ยูคาลิปตัสที่ผ่านกระบวนการฟอกด้วยออกซิเจน
   จากบริษัทสยามคราฟท์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จ. ราชบุรี
3. สารเคมี
   3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
      1. น้ำตาลกลูโคส (glucose) (Fluka)
      2. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Calro Erba Reagent)
      3. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) (Calro Erba Reagent)
      4. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) (Merck)
      5. แอมโมเนียมทาร์เทรต ($C_4H_{12}N_2O_6$) (Sigma Chemical)
      6. แวลาธิว แอลกอฮอลล์ ($C_9H_{12}O_3$) (Sigma Chemical)
      7. ทวิน 80 (Tween 80) (Fluka)
      8. กรดไฮโดรคลอริก (HCL) (Mallinckrodt)
      9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Calro Erba Reagent)
   3.2 สารเคมีสำหรับวัดค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส
      1. แวลาธิว แอลกอฮอลล์ ($C_9H_{12}O_3$) (Sigma Chemical)
      2. กรดซิตริก
      3. ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ (Merck)
      4. โซเดียมซิเตรต (Calro Erba Reagent)

3.3 สารเคมีสำหรับวัดค่าดัปป่านัมเบอร์ของเยื่อ

1. โปแตสเซียม เปอร์มังกาเนต ($KmnO_4$) (Calro Erba Reagent)
2. โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) (Calro Erba Reagent)
3. โปแตสเซียม ไอโอไดด์ (KI) (Calro Erba Reagent)
4. กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) (Calro Erba Reagent)
5. น้ำแป้ง (Starch)

4. อุปกรณ์และครุภัณฑ์

4.1 ตู้บ่มเชื้อ รุ่น Memmert ของบริษัท Memmert, Western Germany

4.2 เครื่องชั่งละเอียด รุ่น U-4600P ของบริษัท Scientific Promotion Co.,Ltd

4.3 pH meter model 40YA Orion Research Incorperated Edison N.J. U.S.A

4.4 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น G-25 ของบริษัท New Brunswic Scientific Co.,INC

4.5 เครื่องเขย่าแบบธรรมดา ศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ของบริษัท Ta Chang Medical Instrument Factory Taiching Taiwan R.O.C

4.7 Shaking incubator model-010945 Scientific Instrument Development and Service Center Faculty of science Chulalongkorn University

4.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น Servall refrigerated-automatic ของบริษัท Ivan Servall, INC. Norwalk, Connecticut U.S.A

4.9 Spectrophotometer model-3V15068003 ของบริษัท Milton Roy Company

4.10 เครื่องกระจายเยื่อ Mavis Engineering Co.Ltd.

4.11 เครื่อง pressure รุ่น model-73 03-01

4.12 เครื่องวัดความขาวสว่างของเยื่อ Elrepho 2000 ของบริษัท Datacolor Ltd. Switzerland

รูปที่ 4 เชื้อรา *P. chrysosporium* เจริญบนอาหาร PDA อายุ 4 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 เชื้อรา *G. lucidum* เจริญบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 เครื่องวัดความขาวสว่าง Elrepho 2000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดในอาหาร PDB

นำเชื้อรา *Phanerocheate chrysosporium* และเชื้อรา *Ganoderma lucidum* ซึ่งเก็บไว้ใน agar slant ที่อุณหภูมิ 10 °C มาทำการเพิ่มปริมาณเส้นใย โดยทำการตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเจริญอยู่ นำไปวางบนอาหารแข็ง PDA (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน หลังจากเชื้อราเจริญเติบโตเต็มที่แล้วใช้ cork borrer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะตรงบริเวณขอบรอบนอกโคโลนีของเชื้อรา นำเส้นใยของเชื้อราซึ่งเจริญบนชิ้นวุ้นจำนวน 2 ชิ้นย้ายไปเลี้ยงในอาหาร PDB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการจดบันทึกน้ำหนักแห้งที่คงที่ของเส้นใยเฉลี่ยทุกวันเป็นเวลา 14 วัน โดยนำเส้นใยของเชื้อรามากรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้นนำเส้นใยไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 24 ชั่วโมง ในตู้อบ
นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟ เพื่อหาระยะของการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด

2. การศึกษาประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อกระดาษของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด

2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อรา *P.chrysosporium* และ *G.lucidum* จากอาหาร PDA ที่มีอายุ 7 วันมาเจาะบนขอบนอกของโคโลนีของเชื้อรา ใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อราไปเลี้ยงในอาหาร PDB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ต่อเส้นใยของเชื้อรา 5 แว่น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากผลการทดลองในข้อ 1 ทำให้ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มเชื้อ *P.chrysosporium* ต้องใช้เวลานาน 7 วัน ส่วนเชื้อรา *G.lucidum* ใช้เวลานาน 10 วัน ในแต่ละชนิดเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.2 การศึกษาภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ในอาหาร PDB 0.5% กลูโคส

เตรียมอาหาร PDB 0.5% กลูโคส (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร เติมเยื่อกระดาษที่ยังไม่ผ่านกระบวนการฟอกและมีค่าความขาวสว่างเริ่มต้นเท่ากับ 36.85% ค่าคัมปาบัมเบอร์เริ่มต้นเท่ากับ 17.47 จำนวน 10 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ลงไป จากนั้นทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในแต่ละขวดทดลองด้วยกรดไฮโดรคลอลิก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ให้ได้ระดับ pH ตามที่ต้องการศึกษาคือที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 psi เวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อรา *P.chrysosporium* และ *G.lucidum* ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 2.1 มาถ่ายลงในเยื่อหลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ใช้เวลาฟอกเยื่อนาน 7 วัน เก็บผลการทดลองโดยทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส (ภาคผนวก ข) วัดค่าความขาวสว่างของเยื่อ และค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อตามวิธี Tappi methods (ภาคผนวก ค)

2.3 การศึกษาภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดในอาหารสูตร production

เตรียมอาหารสูตร production (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร เติมเยื่อกระดาษที่ยังไม่ผ่านกระบวนการฟอกและมีค่าความขาวสว่างเริ่มต้นเท่ากับ 36.85% ค่าคัปปาบัมเบอร์เริ่มต้นเท่ากับ 17.47 จำนวน 10 กรัม (น้ำหนักแห้ง) หลังจากนั้นดำเนินการทดลองเหมือนข้อ 2.2 โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD 3 ปัจจัย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.2 และ 2.3 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติหาค่าความแปรปรวนเพื่อหาความมีนัยของแต่ละปัจจัยและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ LSD (Least significant difference test)

3 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์และการฟอกเยื่อของเชื้อรา ทั้ง2 ชนิด

เตรียมอาหารสูตร production ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร เติมเยื่อกระดาษที่ยังไม่ผ่านกระบวนการฟอกและมีค่าความขาวสว่างเริ่มต้นเท่ากับ 36.85% ค่าคัป-ปานัมเบอร์เริ่มต้นเท่ากับ 17.47 จำนวน 10 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลายอาหารสูตร production ให้เท่ากับ 5.0 ในกรณีที่ศึกษากระบวนการฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *P.chrysosporium* และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอาหารเท่ากับ 3.0 ในกรณีที่ศึกษากระบวนการฟอกเยื่อด้วยเชื้อรา *G.lucidum* (ผลการทดลองข้อ 2.3) นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 psi นาน 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำหัวเชื้อซึ่งเตรียมได้จากข้อ 2.1 มาถ่ายลงในสารละลายของอาหาร จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 4 ระดับคือ 25 ^{o}C 30 ^{o}C 35 ^{o}C และ 40 ^{o}C ตามลำดับ ทำการวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส วัดค่าความขาวสว่างและค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อทุกๆ 4 7 11 และ 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ factorial in RCB 2 ปัจจัย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติหาค่าความแปรปรวนเพื่อหาความมีนัยของแต่ละปัจจัยและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ LSD

4 . การผลิตเอนไซม์

4.1 การเตรียมเอนไซม์

นำเชื้อรา *P.chrysosporium* ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร production ที่ภาวะความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 7 วัน (ผลการทดลองจากข้อ 3) โดยทำการเพิ่มจำนวนของขวดทดลองให้มากขึ้นเพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ให้ได้ในปริมาณที่มากพอ เมื่อเกิดกระบวนการฟอกเยื่อครบ 7 วัน ทำการแยกเยื่อกระดาษออกจาก culture broth โดยการกรองผ่านผ้าขาวบางก่อนในขั้นแรก จากนั้นนำ culture broth มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C นาน 20 นาที จะได้ crude เอนไซม์ที่จะนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อการฟอกเยื่อต่อไป

4.2 การทดสอบหาภาวะความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์

ชั่งเยื่อกระดาษที่ยังไม่ผ่านกระบวนการฟอกและมีค่าความขาวสว่างเริ่มต้นเท่ากับ 36.85% ค่าคัปปาบัมเบอร์เริ่มต้นเท่ากับ 17.47 จำนวน 5 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ใส่ในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการเตรียมสารละลายโซเดียม ซิเตรท บัฟเฟอร์ ที่ระดับ pH ที่ต้องการศึกษาคือ 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ ปรับ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ด้วยกรดไฮโดรคลอลิก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เติมสารละลายโซเดียม ซิเตรท บัฟเฟอร์ในแต่ละระดับ pH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในเยื่อกระดาษที่เตรียมไว้ คนเพื่อให้ผสมเข้ากับเยื่อได้ทั่วถึง จากนั้นทำการเติม crude เอนไซม์ปริมาตร 91.24 มิลลิลิตร (25 unit ; crude เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร เท่ากับ 0.274 unit) ที่เตรียมไว้ลงไปผสมกับเยื่อกระดาษ หลังจากเติม crude เอนไซม์ลงไปแล้วความข้นของเยื่อจะลดลงเหลือ 2.5% ใช้แท่งแม่เหล็กคนให้เยื่อสัมผัสกับเอนไซม์ จากนั้นนำเยื่อที่ต้องการศึกษาในแต่ละระดับ pH มาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 150 รอบต่อวินาที ทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C 30 ^{o}C 35 ^{o}C และ 40 ^{o}C ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการบ่มนาน 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำขวดทดลองไปแช่ในน้ำเดือดนาน 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ นำเยื่อที่ได้มาวัดค่าความขาวสว่างและค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อ (ภาคผนวก ค) ใช้การวางแผนการทดลองแบบ factorial in RCB 2 ปัจจัย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติหาค่าความแปรปรวนเพื่อหาความมีนัยของแต่ละปัจจัยและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ LSD

4.3 การศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ความข้นของเยื่อที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเยื่อกระดาษจำนวน 4 8 12 และ 16 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ใส่ในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร เติม 0.5 มิลลิโมล โซเดียม ซิเตรท บัฟเฟอร์ pH 5.0 (จากผลการทดลองข้อ 3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม crude เอนไซม์ลงไปจำนวน 91.24 มิลลิลิตร (25 unit) ลงไปในแต่ละขวด ความข้นของเยื่อจะเท่ากับ 2.05% (สำหรับเยื่อ 4 กรัม) 4.02% (สำหรับเยื่อ 8 กรัม) 5.91% (สำหรับเยื่อ 12 กรัม) 7.73% (สำหรับเยื่อ 16 กรัม) บ่มที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C (จากผลการทดลองข้อ 3) ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 40 ^{o}C เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ใช้เวลาฟอกเยื่อนาน 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเดือดนาน 10 นาที นำเยื่อที่ได้มาทำการวัดค่าความขาวสว่างและค่าคัมปานัมเบอร์ของเยื่อตามวิธี Tappi methods (ภาคผนวก ค) วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ LSD