บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubate shaker) (Lab-Line, USA)
2. เครื่องนึ่งความดัน (Autoclave) (Ta Chang, Taiwan)
3. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) (Memmert, Germany)
4. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow) (ISSCO รุ่น TAB 123, Thailand)
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Eutech Cybernetics Model pH Scan 2, Singapore)
6. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม (Balance) 2 ตำแหน่ง
7. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie 2 รุ่น G-560 E Scientific Industries, INC., USA)
9. เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge) (Servall, USA)
10. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochom รุ่น LKB, England)
11. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงอินฟราเรด (Infrared spectrophotometer) (Perkin Elmer รุ่น FT-IR spectrometer 1760x, USA)
12. เครื่อง HPLC (Shimadzu รุ่น LC-3A, Japan) และ เครื่องอ่านผลการวิเคราะห์ (detector) (LDC รุ่น 4100, USA)
13. กล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast (Olympus, Japan)
14. ขวดแก้วรูปชมพู่ (Flask)
15. กระดาษกรอง (Whatman paper No1)

และอุปกรณ์มาตรฐานสำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป

เชื้อจุลินทรีย์

1. เชื้อ *Aureobasidium. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992
2. เชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023

สารเคมี

1. น้ำตาลซูโครส (sucrose) (Carlo Erba Reagent)
2. น้ำตาลกลูโคส (glucose) (Sigma Chemical, USA)
3. น้ำตาลมอลโตส (maltose) (Sigma Chemical, USA)
4. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) (Carlo Erba Reagent)
5. แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) (Fluk Chemika)
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Carlo Erba Reagent)
7. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.H_2O$) (Carlo Erba Reagent)
8. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
9. แบคโต เปบโตน (Bacto peptone) (Difco, USA)
10. ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) (Difco, USA)
11. พูลลูแลน (Pullulan) (Sigma Chemical, USA)
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Carlo Erba Reagent)
13. กรดไฮโดรคลอริค (HCl) (Mallinckrodt, USA)

สารเคมีสำหรับตกตะกอนพูลูแลน

เอทธานอล 95 % (Ethanol)

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

1. ไดโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Baker Analyzed Reagent)
2. โซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท (Na K Tartrate) (Carlo Erba Reagent)
3. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) (Carlo Erba Reagent)
4. ไดโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) (Carlo Erba Reagent)
5. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) (AJAX Chemicals)
6. ซัลฟูริค (H_2SO_4) (Carlo Erba Reagent)
7. แอมโมเนียมโมลิบเดรต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) (M&B Laboratory Chemicals)
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนอาร์จิเนต ($Na_2HASO_4.7H_2O$) (Merck)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเลี้ยงเชื้อราเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ NRRL 6992 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. T.D. Leathers (Leathers *et al.*, 1988) และสายพันธุ์ ATCC 42023 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. T.P. West (West and Hamer, 1991) ในอาหารแข็งสูตร PDA (เตรียมโดยชั่ง PDA ปริมาณ 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 20 นาที) เป็นเวลา 4 วัน ย้ายมาเลี้ยงในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร PDB (เตรียมโดยชั่ง PDB ปริมาณ 24 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 20 นาที) จำนวน 95 มิลลิลิตร โดยเตรียมเซลล์ตั้งต้นเป็นเซลล์แขวนลอยในน้ำ (cell suspension) นับเซลล์เริ่มต้นให้ได้ในช่วง 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และใส่ 5 มิลลิลิตรลงใน 95 มิลลิลิตรของอาหารเหลวสูตร PDA บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน ศึกษาการเจริญเติบโต และลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* เพื่อผลิตพูลลูแลน

2.1 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตรของ Ueda และคณะ, 1963 (ภาคผนวก ก. 1) แต่ดัดแปลงสูตรอาหารซึ่งจากเดิมมีไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) เป็นส่วนประกอบในสูตรอาหาร ดัดแปลงเป็นโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH ให้มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ โดยใส่เซลล์ของ *A. pullulans* เริ่มต้นตามวิธีข้อ 1 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน นำไปสกัดหาพูลลูแลนที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้น น้ำหนักแห้งของเซลล์ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไป ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในวันที่ 7 และการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพูลลูแลน

2.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อราในอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมตามข้อที่ 2.1 ศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม 3 ระดับ คือ 25 30 และ 35°C ตามลำดับ นำไปสกัดหาพูลลูแลนที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้น น้ำหนักแห้งของเซลล์

ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไป ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในวันที่ 7 และการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพูลลูแลน

2.3 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อราในอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมตามข้อที่ 2.2 แต่เปลี่ยนแปลงชนิดของแหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส ซูโครส และมอลโตส ที่ความเข้มข้น 5 % นำไปสกัดหาพูลลูแลนที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้น น้ำหนักแห้งของเซลล์ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไป ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในวันที่ 7 และการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพูลลูแลน

2.4 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อราในอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมตามข้อที่ 2.3 แต่เปลี่ยนแปลงชนิดของแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และเปปโตน ที่มีความเข้มข้น 0.06 % นำไปสกัดหาพูลลูแลนที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้น น้ำหนักแห้งของเซลล์ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไป ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในวันที่ 7 และการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพูลลูแลน

3. ศึกษาการสลายตัวของพูลลูแลนในธรรมชาติ

นำผลผลิตพูลลูแลนที่ได้จาก 2 สายพันธุ์ อัดเป็นแท่ง อบให้แห้ง นำไปวางบนดินสังเกตการสลายตัวของพูลลูแลนทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในแต่ละวันเป็นเวลานาน 9 วัน

4. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

4.1 การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ ใช้วิธี Direct Microscopic Count โดยใช้ Counting chamber ของ Haemacytometer (American optical) (ภาคผนวก ข. 1)

4.2 การวัด pH ใช้เครื่อง pH meter

4.3 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข. 2)

4.4 การวิเคราะห์ปริมาณพูลลูแลนตามวิธีของ West และ Hemer (1991) โดยใช้เอทธานอล 95% (ภาคผนวก ข. 3)

4.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Nelson-Somogyi (ภาคผนวก ข. 4)

4.6 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข. 6)

4.7 การวิเคราะห์ความเป็นพูลลูแลนด้วยวิธี Infrared spectroscopy (ภาคผนวก ข. 7)

5. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 4 การทดลอง

5.1 ศึกษาความเหมาะสมของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยงเชื้อรา 2 สายพันธุ์

โดยให้ ปัจจัยที่ 1 คือชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งประกอบด้วยเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ

A. pullulans สายพันธุ์ NRRL 6992 และ สายพันธุ์ ATCC 42023

ปัจจัยที่ 2 คือ ระดับ pH เริ่มต้นซึ่งประกอบด้วย 5 ระดับ คือ 4.0 5.0 6.0 6.5 และ7.0

5.2 ศึกษาความเหมาะสมของระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อในการเลี้ยงเชื้อรา 2 สายพันธุ์

โดยให้ ปัจจัยที่ 1 คือชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งประกอบด้วยเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ

A. pullulans สายพันธุ์ NRRL 6992 และ สายพันธุ์ ATCC 42023

ปัจจัยที่ 2 คือ ระดับ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ ซึ่งประกอบด้วย 3 ระดับ คือ 25 30 และ35$^{\circ}C$

5.3 ศึกษาความเหมาะสมของชนิดของแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อรา 2 สายพันธุ์

โดยให้ ปัจจัยที่ 1 คือชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งประกอบด้วยเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ

A. pullulans สายพันธุ์ NRRL 6992 และ สายพันธุ์ ATCC 42023

ปัจจัยที่ 2 คือ ชนิดของแหล่งคาร์บอนซึ่งประกอบด้วย 3 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส และมอลโตส

5.4 ศึกษาความเหมาะสมของชนิดของแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อรา 2 สายพันธุ์

โดยให้ ปัจจัยที่ 1 คือชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งประกอบด้วยเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ

A. pullulans สายพันธุ์ NRRL 6992 และ สายพันธุ์ ATCC 42023

ปัจจัยที่ 2 คือ ชนิดของแหล่งไนโตรเจนซึ่งประกอบด้วย 3 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรท และเปบโตน

6. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองแบบ Factorial in CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีทเมนท์ด้วยวิธี Duncan's multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ 95%