# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## ข้อมูลและแหล่งที่มาของข้อมูล

1. เชื้อจุลินทรีย์

ใช้เชื้อรา *T. reesei* สายพันธุ์ TISTR 3080 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

ได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในเขตจังหวัดมหาสารคาม

## ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร คือ เชื้อรา *T. reesei*

กลุ่มตัวอย่าง คือ แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ ซังข้าวโพด และชานอ้อย

## เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บข้อมูล

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 เครื่องแก้วที่จำเป็นในการทดลอง เช่น หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ

1.2 เครื่องชั่งแบบ 2 ตำแหน่ง

1.3 เครื่องชั่งแบบ 4 ตำแหน่ง

1.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส

1.5 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อระบบความดัน

1.6 ตู้อบฆ่าเชื้อ

1.7 ตู้บ่มเชื้อ

1.8 อ่างน้ำควบคุม

1.9 กล้องจุลทรรศน์

1.10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม วิทยานิพนธ์ งานวิจัย



1.11 ตู้เขี่ยเชื้อ

1.12 ครกบด

1.13 โถดูดความชื้น

**2. สารเคมี**

2.1 สารละลาย 5-dinitrosalisalic acid (DNS)

2.2 สารละลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5

2.3 สารละลาย xylan from oat spelt เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5

2.4 สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5

2.5 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.6 สารละลายฟีนอล คอตตอน บลู

2.7 กลูโคส

2.8 โปแตสเซียส-โซเดียมตาเตรท

## การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. การวัดการเจริญของเชื้อรา

เก็บข้อมูลจากทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักอาหารเหลวสังเคราะห์ PDB ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุก 2 วัน (วันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ 15) เพื่อวัดอัตราการเจริญโดยใช้วิธีการหาน้ำหนักแห้ง

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างอาหารเพื่อใช้เลี้ยงเชื้อรา *T. reesei* (ส่งวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการภายนอกโดยใช้เครื่อง Gas Chromatography, GC)

3. การวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส วัดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ทำการศึกษาทุก 7 วันเป็นเวลา 1 เดือน

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และสารประกอบอื่นๆ หลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (ส่งวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการภายนอกโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph, HPLC)

213362

## การวิเคราะห์ข้อมูล

โดยการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสจากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคสและไซโลสตามลำดับ

## ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ระยะเวลาในการทำวิจัยตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2554-เดือนมีนาคม พ.ศ.2555

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อราสายพันธุ์ *T. reesei* โดยการเพาะเลี้ยงบน slant agar ของอาหารสังเคราะห์ PDA (Potato Dextrose Agar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 – 7 วัน การเก็บรักษาจะเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารสังเคราะห์ PDA (Potato Dextrose Agar)

2.2 อาหารแข็ง (Solid culture) โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสของเชื้อ *T. reesei* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน คือ ชานอ้อย และซังข้าวโพด

3. การเตรียมแหล่งคาร์บอน

วัตถุดิบที่ใช้ในการเตรียมอาหารแข็ง ได้แก่ ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, รำ และแกลบ โดยเตรียมเป็นอาหารแข็ง 2 สูตร คือ

สูตร 1 ชานอ้อย : รำ : แกลบ = 8 : 2 : 2 = 12 กรัม

สูตร 2 ซังข้าวโพด : รำ : แกลบ = 8 : 2 : 2 = 12 กรัม

อาหารแข็งทั้ง 2 สูตรเตรียมให้มีความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที

4. วิธีการทดลอง

4.1 การวัดการเจริญของเชื้อรา

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. reesei* บนอาหารสังเคราะห์สูตร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารสังเคราะห์ PDB (Potato Dextrose Broth) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร กำหนดปริมาตร PDB ทั้งหมดเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) โดยใช้เครื่องเขย่า (Shaker) ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักในปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทุก 2 วัน (วันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ 15) เพื่อวัดอัตราการเจริญโดยใช้วิธีการหาน้ำหนักแห้ง

4.2 การเตรียมสปอร์ของเชื้อรา (เตรียมให้อยู่ในระยะ log phase)

เตรียมเชื้อรา *T. reesei* ในอาหารสังเคราะห์ PDA (เลี้ยงให้อยู่ในระยะ log phase) เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงใน slant ของเชื้อราใช้เข็มเขี่ยเชื้อราเกลี่ยสปอร์ให้กระจายตัวให้เป็น spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ไม่ต่ำกว่า $10^7$ spore/ ml จากนั้นเติม spore suspension ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารแข็งที่เตรียมไว้ (มีชานอ้อยและซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน มีรำข้าวและแกลบเป็นแหล่งไนโตรเจน) ผสมให้เข้ากันให้ทั่วถึงแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน (ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทุกๆ 7 วัน)

4.3 การสกัดเอนไซม์

นำอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการเพาะเลี้ยงตามระยะเวลาที่กำหนดมาสกัดเอนไซม์โดย :

4.3.1 เติมอะซีเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.0 ลงในอาหารแห้ง

4.3.2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

4.3.3 กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองต่อด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

4.3.4 แยกส่วนที่เป็นน้ำ (crude enzyme) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

4.3.5 เก็บ crude enzyme ส่วนที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (สุทธิพันธุ์, 2550)

ศึกษารูปแบบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากเชื้อ *T. reesei* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน โดยการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคสและไซโลส

4.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatograph)

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY