บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องบ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker , Model G25, New Brunswick Scientific Co.Inc. ; U.S.A.)

2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Servall refrigerated automatic, Ivan Servall Inc. ;U.S.A.)

3. เครื่องวัดเอทธานอล (Gas liquid chromatography , Model Shimadzu, 7AG.) แบบ flame ionization detector โดยใช้ Porapak Q column

4. counting chamber (Haemacytometer,American Optical) สำหรับนับจำนวนเซลล์ยีสต์

5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

6. เครื่องวัด pH

สารเคมี

1. Potato dextrose agar
2. Yeast extract
3. Malt extract
4. Bacto-peptone
5. D-glucose

6. $MgSO_4$

7. $CaHPO_4$

8. NH_4NO_3

9. Corn steep liquor

10. Microcrystalline cellulose

11. Casein

12. Tween 80

13. $FeSO_4$

14. $ZnSO_4$

15. $MnSO_4$

16. $CoCl_2$

17. $(NH_4)_2SO_4$

18. $MgSO_4.7H_2O$

19. $CaCl_2$

20. NaOH

21. Phenol

22. $NaHSO_3$

23. Dinitrosalicylic acid

24. Rochell salt

25. Na_2CO_3

26. $CuSO_4.5H_2O$

27. Foline phenol reagent

28. Sodium citrate

29. Acetic acid

30. HCl

31. Sodium acatate

32. Soy peptone (Marcor Development Corporation;U.S.A.)

33.Casein peptone type S (Marcor Development Corporation;U.S.A.)

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

1. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Acrophialophora* sp.

นำเชื้อรา *Acrophialophora* sp. ที่ได้รับมอบจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา พฤกษศาสตร์ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA ที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 7 วัน ตัดปลายเส้นใยให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร จำนวน 10 ชิ้น ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร Production (ภาคผนวก ก.3) จำนวน 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส และปริมาณโปรตีน แล้วนำเอนไซม์ที่ได้ไปใช้โดยตรง

2. การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Candida brassicae*

เลี้ยงเชื้อยีสต์ *C. brassicae* IFO 1664 ในอาหารเหลวสูตร YMB (ภาคผนวก ก.2) บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. การปรับสภาพเส้นใยป่านศรนารายณ์ (pretreatment)

นำเส้นใยป่านศรนารายณ์มาตัดให้มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น แล้วนำมาล้างด้วยน้ำประปาจนได้ค่า pH เท่ากับ 7 แล้วนำไปแช่ใน 0.04 M. Acetate buffer pH 5.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บไว้ในตู้เย็น ก่อนนำไปใช้

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยกระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง (ตามวิธีการของ Blotkamp และคณะ, 1981)

4.1. ศึกษาปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นที่เหมาะสม

นำเส้นใยป่านศรนารายณ์ผ่านการปรับสภาพแล้วจำนวน 3 กรัมน้ำหนักแห้งใส่ลงในพลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม F_2 medium (ภาคผนวก ก.4) จำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{o}ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเติมเชื้อยีสต์ความเข้มข้น $3x10^{8}$ เซลล์/มล. จำนวน 10 % (ปริมาตร/ปริมาตร) เติมเอนไซม์ในปริมาณแตกต่างกัน 4 ระดับ โดยคำนวณเป็นจำนวนเท่าต่อจำนวนกรัมน้ำหนักแห้งของวัสดุหมัก คือ 10 เท่า (30 มล.) 15 เท่า (45 มล.) 20 เท่า (60 มล.) และ 25 เท่า (75 มล.) บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40^{o}ซ เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ ปริมาณเอทธานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และจำนวนเซลล์ยีสต์

4.2. ศึกษาความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นที่เหมาะสม

ใช้วัสดุหมักและภาวะเหมาะสมตามข้อ 4.1. โดยเติมเชื้อยีสต์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 10^{7} 10^{8} 10^{9} และ 10^{10} เซลล์/มล. โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ตามวิธีการเตรียมหัวเชื้อยีสต์ และนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเฉพาะตัวเซลล์ไปเจือจางให้ได้ตามความเข้มข้นที่ต้องการ บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40^{o}ซ เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ ปริมาณเอทธานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และจำนวนเซลล์ยีสต์

4.3. ศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นที่เหมาะสม

ใช้วัสดุหมักและภาวะเหมาะสมตามข้อ 4.2. โดยปรับความเป็นกรด-ด่าง

เริ่มต้นแตกต่างกัน 4 ระดับคือ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ ปริมาณเอทธานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และจำนวนเซลล์ยีสต์

4.4. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ใช้วัสดุหมักและภาวะเหมาะสมตามข้อ 4.3. บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที โดยใช้อุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 37°ซ 40°ซ 43°ซ และ 45°ซ เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน นำไปวิเคราะห์ ปริมาณเอทธานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และจำนวนเซลล์ยีสต์

4.5. ศึกษาการเติมอาหารเสริม(supplement)

ใช้วัสดุหมักและภาวะเหมาะสมตามข้อ 4.4. โดยมีการเติม soy peptone และ casein peptone ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0.025% 0.05% 0.075% และ 0.1% บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ ปริมาณเอทธานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และจำนวนเซลล์ยีสต์

5.การศึกษาแนวทางในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน(co-culture)

5.1. ศึกษาอายุเริ่มต้นของเชื้อรา *Acrophialophora* sp.

เลี้ยงเชื้อราและเชื้อยีสต์ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร Production 80 มิลลิลิตร และ F_2 medium 10 มิลลิลิตร โดยมีเส้นใยป่านศรนารายณ์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว 3 กรัมน้ำหนักแห้งเป็นวัสดุหมักโดยใช้เชื้อราที่มีอายุแตกต่างกันคือ 6 9 และ 12 วัน เติมยีสต์ความเข้มข้น $3x10^8$ เซลล์/มล. จำนวน 10 เปอร์เซนต์(ปริมาตร/ปริมาตร)บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ

24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ ปริมาณเอทธานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และจำนวนเซลล์ยีสต์

5.2. ศึกษาความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นที่เหมาะสม

ใช้วัสดุหมักและภาวะเหมาะสมตามข้อ 5.1. โดยเติมเชื้อยีสต์ความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 10^7 10^8 10^9 และ 10^{10} เซลล์/มล. บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเอทธานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และจำนวนเซลล์ยีสต์

5.3. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ใช้วัสดุหมักและภาวะเหมาะสมตามข้อ 5.2. บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที โดยใช้อุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 37°ซ 40°ซ 43°ซ และ 45°ซ เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน นำไปวิเคราะห์ ปริมาณเอทธานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และจำนวนเซลล์ยีสต์

<u>การวิเคราะห์ผล</u>

1. การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยวิเคราะห์หา FPA ตามวิธีการของ Mandel และ Sternberg(1976) และ CMCase ตามวิธีการของ Acebal และคณะ (1986) (ภาคผนวก ข. 7 และ 8 ตามลำดับ)

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1ไมโครโมลในเวลา 1นาทีภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ข.10)

3. การวิเคราะห์เอทธานอล ด้วยวิธี Gas Liquid Chromatography แบบ Flame Ionization Detector โดยใช้ Porapak Q column (ภาคผนวก ข. 12)

4.การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid assay (DNS) (ภาคผนวก ข.9) ตามวิธีการของ Miller (1959)

5. การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ใช้วิธี Direct Microscopic Count (DMC) โดยใช้ Counting Chamber (Haemacytometer , American Optical) (ภาคผนวก ข. 13)

6.การวัด pH ใช้ pH meter

7.การวิเคราะห์ผลทางสถิติ วางแผนการทดลองแบบ CRD (completed randomize design) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี duncan's new multiple range test (DMRT)