บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1 อุปกรณ์

1.1 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific Supply Co. Ltd., Thailand

1.2 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น D 0601 model 500 บริษัท Memmert, U.S.A.

1.3 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Shaker) รุ่น Gyrotory G10 บริษัท New Bronswick Scientific, U.S.A.

1.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 401 บริษัท Milton Roy, U.S.A.

1.5 อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิลิตร บริษัท Boeco, Germany

1.6 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical Co. Ltd., Japan

1.7 เครื่องผสมสาร (Vortex) รุ่น Vortex -2 Genie model G-560 E บริษัท Scientific Industries, U.S.A.

1.8 เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น Cimarel 2 Barnstead/Thermotyne model 546720-26., U.S.A.

1.9 หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet lamp) รุ่น 8T51G กำลังไฟ 10 วัตต์ บริษัท Ainavlys. Etd., U.S.A.

1.10 ตู้ดูดอากาศ

1.11 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclve) รุ่น H-88L4 บริษัท Tommy., Japan

1.12 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น 2-21 บริษัท Beckman., U.S.A.

1.13 เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius., Germany

1.14 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan pH1000 บริษัท Eutech Cybernetics., Singapore

1.15 โถดูดความชื้น (Descicator)

1.16 ตู้อบ (Oven)

1.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WB/OB 7-45 WBU 45 บริษัท Memmert., Germany

1.18 บิวเรตอัตโนมัติ (Auto burnt) บริษัท Pyrex., England

1.19 หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร TL 20 W/08 F20 T12 BLB บริษัท Phillips, Holland

1.20 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High performance liquid chomatography, HPLC) รุ่น LC-3A บริษัท Shimadzu, Japan

1.21 ชุดกรองสปอร์ (glassilater)

2 สารเคมี

2.1 เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.2 อะโซเคซีน (Azocasein) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.3 เคซีน (Casein) บริษัท E Merck, Germany

2.4 ไดโปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท E Merck, Germany

2.5 โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท E Merck, Germany

2.6 โซลูเบิลสตาช (Soluble Starch) บริษัท E Merck, Germany

2.7 เฟอร์ลิกคลอไรด์ ($FeCl_3$) บริษัท BDH Chemical, England

2.8 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) บริษัท E Merck, Germany

2.9 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท E Merck, Germany

2.10 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท E Merck, Germany

วิธีดำเนินการวิจัย

1 เชื้อจุลินทรีย์

ใช้ *Aspergillus niger* WU-2223L ซึ่งเป็นสายพันธุ์ราที่มีประสิทธิภาพสูง ในการผลิตกรดมะนาวในกระบวนการหมักในอาหารเหลว (Usami และ Taketomi, 1960; Rugsaseel และคณะ, 1995; Sarangbin และคณะ, 1994) เป็นสายพันธุ์ตั้งต้น

2 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เขี่ยสปอร์ของ *A. niger* โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) บนผิวหน้าอาหารวุ้นเอียง PDA (PDA Slant, ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วันเพื่อให้เชื้อสามารถสร้างสปอร์ได้เต็มที่ จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เพื่อเก็บรักษาอีกทุกๆ 1 เดือน โดยใช้วิธีเดียวกัน

3 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของ *A. niger*

เตรียมสปอร์แขวนลอยของ *A. niger* โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ถ่ายสปอร์อายุ 9 วัน ของ *A. niger* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง PDA ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยที่ได้กรองผ่านชุดกรองสปอร์ (glass filter) ปลอดเชื้อ แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ 1×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer)

4 การเพาะเลี้ยง *A. niger* เพื่อผลิตกรดมะนาว

นำสปอร์แขวนลอยของ *A. niger* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารสูตร SL (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติม 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เมทธานอล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาว (Usami, 1978) ก่อนการเลี้ยงเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี (rotary shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 8 วัน

5 การหาน้ำหนักเส้นใยแห้ง

หาน้ำหนักเส้นใยแห้ง (dry weight) โดยนำเซลล์ที่อยู่ในน้ำหมักที่ทราบปริมาตรแน่นอน กรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนัก ล้างด้วยน้ำประปาปริมาตร 200 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ชั่งหาน้ำหนักเส้นใยแห้งจากนั้นคำนวณหาน้ำหนักเส้นใยแห้งโดยเปรียบเทียบเป็นกรัมต่อลิตร

6 การวิเคราะห์หาปริมาณกรด

นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ มาวิเคราะห์หาปริมาณกรด โดยการไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1 นอร์มัล และใช้สารละลายฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ คำนวณปริมาณกรด โดยเปรียบเทียบเป็นกรัมต่อลิตร

7 การวิเคราะห์กรดมะนาวโดยใช้เครื่อง HPLC

นำน้ำหมักที่ได้จากการทดลองในข้อ 4 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยการส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ (อรพิณ อุดมพงศ์อนันต์, 2533)

คอลัมน์	: Zorbax-C8 Dupont ยาว 25 เซ็นติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	: 20 มิลลิโมลาร์ กรดฟอสฟอริก พีเอช 2.5
อัตราการไหล	: 0.8 มิลลิลิตร/นาที
อุณหภูมิ	: อุณหภูมิห้อง
ตรวจวัด	: UV detector ที่ค่าความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

8 การวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์โปรติเอส (Protease)

นำน้ำหมักมาวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีของ Lovrien และคณะ (1985) โดยนำอะโซเคซีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมโดยการละลายใน 20 มิลลิโมลาร์ ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำหมัก 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตั้งให้ตกตะกอน จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนน้ำใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 366นาโนเมตร

1 หน่วยของเอนไซม์โปรติเอส คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตรเพิ่มขึ้น 0.01 หน่วยในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

9 การวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ย่อยแป้ง

9.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์กลูโคอะมิเลส

นำน้ำหมักมาวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ตามวิธีของ Abe และคณะ (1988) ทำโดยผสมโซลูเบิลสตาช 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ละลายใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร กับส่วนน้ำหมักที่กรองได้ 0.2 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ด้วยวิธีของ Miller (1959) โดยนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้าด้วยเครื่องปั่นผสม แล้วต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในอ่างน้ำเย็นจัด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 100-600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ง หมายเลข 1)

1 หน่วยของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส คือปริมาณเอนไซม์ที่สร้าง 1 ไมโครโมลของกลูโคสใน 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดสอบ

9.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์อัลฟาอะมิเลส (∝- amylase)

วิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์อัลฟาอะมิเลสตามวิธีการของ Murase และคณะ (1995) ทำโดยผสมน้ำหมัก 200 ไมโครลิตรกับสารละลายน้ำแป้งปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เตรียมโดยละลายโซลูเบิลสตาช 0.2 กรัมใน 100 มิลลิลิตรของ 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.9 ต้มเดือดนาน 3 นาที แล้วทำให้เย็นลงถึงอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นนำส่วนผสมปริมาตร 200 ไมโครลิตรเติมลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายไอโอดีนอยู่ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานปริมาณแป้ง (ภาคผนวก ง หมายเลข 2)

1 หน่วยของเอนไซม์อัลฟาอะมิเลส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยแป้ง 0.1 มิลลิกรัม ใน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

10 การวัดหาค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยการนำน้ำหมักที่ผ่านการกรองแล้วมาวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)

11 การหาปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิเคราะห์หาปริมาณแป้งตามวิธีการทดลองของ Mc.Dermott (1980)โดยนำน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที แล้วเติมสารละลายไอโอดีน 0.5 มิลลิลิตร (เตรียมไอโอดีน 1 เปอร์เซ็นต์ ในโปแตสเซียมไอโอไดย์ 5 เปอร์เซ็นต์) บ่มที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียสอีกครั้งหนึ่งนาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแป้งโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานปริมาณอะไมโลส (ภาคผนวก ง หมายเลข 3)

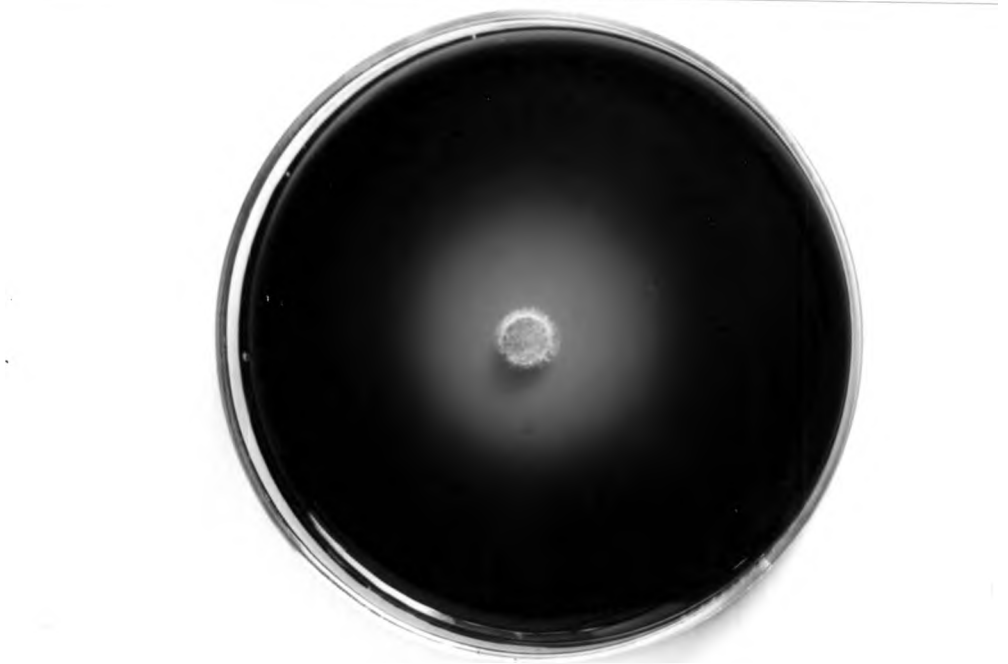
12 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งบนจานอาหารแข็ง (ดัดแปลงจากวิธีของ Rugsaseel และคณะ, 1993 และ Lefuji และคณะ,1994)

นำเชื้อที่ต้องการตรวจสอบมาเลี้ยงบนจานอาหาร SLST (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) โดยการ stab บริเวณกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

เป็นแหล่งคาร์บอน การเตรียมแป้งดิบใช้วิธีการของ Lefuji และคณะ (1987) โดยนำแป้งมันสำปะหลังแช่ในเอธิลอัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาปั่นแยกเอธิลอัลกอฮอล์ออก แล้วปั่นล้างตะกอนของแป้งด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 ครั้ง นำตะกอนของแป้งที่ผ่านการล้างแล้วมาผสมกับอาหารสูตร SL ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อโดยการตวงปริมาตร จานละ 20 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน แล้วราดจานอาหารด้วยสารละลายไอโอดีน หาอัตราส่วนระหว่าง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี

13 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดบนจานอาหารแข็ง (Rugsaseel และคณะ, 1996)

นำเชื้อที่ต้องการตรวจสอบมาเลี้ยงบนจานอาหารสูตร SL ที่มีกลูโคสเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นใช้ชุดเจาะวุ้น (cork borer) เบอร์ 3 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 มิลลิเมตร เจาะวุ้นบริเวณที่มีส่วนเส้นใยของราเจริญอยู่อย่างสม่ำเสมอย้ายไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SLBG (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) โดยวางให้ส่วนของเส้นใยสัมผัสกับผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสามารถเห็นบริเวณกรด ดังแสดงในรูปที่ 16 หาอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณกรด (acid zone) ต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี



รูปที่ 16 แสดงบริเวณกรดที่สร้างโดย *A. niger* WU-2223L บนจานอาหารสูตร SL ที่มี กลูโคส เข้มข้น 140 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้โบรโมคลีซอลกรีนเป็นอินดิเคเตอร์

14 การปรับปรุงสายพันธุ์ *A. niger* เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังด้วยสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

14.1 การกลายพันธุ์ *A. niger* ด้วยรังสี UV

14.1.1 นำสปอร์แขวนลอย ที่เตรียมตามวิธีการทดลองในข้อ 3 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคลิปหนีบกระดาษวางอยู่ภายในซึ่งปลอดเชื้อ (เพื่อใช้กวนสปอร์ตลอดเวลาเพื่อให้สปอร์โดนรังสี UV อย่างทั่วถึงกัน) วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อบนเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) นำไปฉายรังสี UV เป็นเวลา 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที

14.1.2 นำสปอร์ที่ผ่านการฉายรังสี UV มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของสปอร์ที่เหมาะสม จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร SL ที่มีกลูโคสเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

14.1.3 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ แล้วนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต โดยกำหนดให้ 1 โคโลนีมาจากสปอร์ที่รอดชีวิต 1 สปอร์ และให้สปอร์ที่ผ่านการฉายรังสี UV นาน 0 นาที มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

14.1.4 เลือกภาวะที่เหมาะสมต่อการกลายพันธุ์รา คือภาวะที่ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ (Jondo และคณะ, 1991) เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *A. niger* WU-2223L

14.1.5 นำสปอร์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสี UV ตามวิธีการทดลองในข้อ 14.1.4 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีเคซีน (casein) เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งพลังงานซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ที่หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟรอยด์ ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยชุดกรองสปอร์ (glassilator) เพื่อแยกสปอร์ที่งอกทิ้ง นำส่วนที่กรองได้ ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเก็บสปอร์ (ส่วนของตะกอน) นำสปอร์ที่ได้มาปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง เก็บสปอร์ครั้งสุดท้าย จากนั้นละลายสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร นำมาเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีเคซีนเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งพลังงานอีกครั้งหนึ่ง

14.1.6 เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำมากรอง 3 ครั้งด้วยชุดกรองสปอร์ ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เช่นเดียวกับวิธีทำการทดลองในข้อ 14.1.5 นำสปอร์ที่ได้สุดท้ายมากระจาย ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เจือจางให้มีความเข้มข้นของสปอร์ที่เหมาะสม นำ 0.1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงบนจานอาหารสูตร SL ที่มีกลูโคสเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เก็บโคโลนีเดี่ยวๆที่เจริญอย่างรวดเร็ว (น้อยกว่า 24 ชั่วโมง) โดยคาดว่าเชื้อสายพันธุ์กลายดังกล่าว เป็นเชื้อที่มีวิถีไกลโคไลซีสที่มีประสิทธิภาพในการทำงานสูง มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 9 วัน จากนั้นนำมาตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งบนจานอาหารแข็ง ตามวิธีการทดลองในข้อ 12 และตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดบนจานอาหารแข็งตามวิธีการทดลองในข้อ 13 แล้วคัดเลือกสายพันธุ์กลาย ที่มีคุณสมบัติตามต้องการไปตรวจสอบขั้นทุติยภูมิต่อไป

14.2 การกลายพันธุ์ *A. niger* ด้วยสารเคมี NTG (N-methyl-N'- nitro - N-nitrosoguanidine)

14.2.1 นำสปอร์แขวนลอยของ *A. niger* WU-2223L ซึ่งเตรียมตามวิธีทำการทดลองในข้อ 3 ให้มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น 1×10^{8} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดฝาเกลียวขนาดความจุ 25 มิลลิลิตรที่ปลอดเชื้อ ผสมกับสารละลาย NTG เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เตรียมใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (Hayashida และ Teramoto, 1986) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ตามลำดับ

14.2.2 เมื่อครบเวลา นำไปปั่นแยกสปอร์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 15 นาที นำตะกอนสปอร์ที่ได้ มาปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยการปั่นล้าง 2 ครั้ง

14.2.3 นำตะกอนสปอร์สุดท้ายที่ได้ มากระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นของสปอร์ที่แตกต่างกัน นำไปทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การรอดของสปอร์ หลังจากถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ที่เวลาต่างๆกัน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 14.1.2 ถึง 14.1.3

14.2.4 เลือกภาวะที่เหมาะสมต่อการกลายพันธุ์ *A. niger* โดยใช้ NTG คือภาวะที่ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสปอร์ในช่วง 0-50 เปอร์เซ็นต์ (Johdo และคณะ, 1991) มาใช้สำหรับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *A. niger* ต่อไป

14.2.5 นำสปอร์แขวนลอยที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มาทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 14.1.5 ถึง 14.1.6 เพื่อเก็บเชื้อจุลินทรีย์มาคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิต่อไป

15การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลัง

15.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

นำเชื้อที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มาคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ โดยตรวจสอบ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งบนจานอาหารแข็ง ตามวิธีการทดลองในข้อ 12 และความสามารถในการผลิตกรดบนจานอาหารแข็ง ตามวิธีการทดลองในข้อ 13

15.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

นำเชื้อสายพันธุ์กลายที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิมาเพาะเลี้ยง ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 จากนั้นตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆของสายพันธุ์กลายโดย วิเคราะห์หาปริมาณกรด ตามวิธีการทดลองในข้อ 6 วิเคราะห์ วิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีการทดลองในข้อ 8 และวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ย่อยแป้ง ตามวิธีการทดลองในข้อ 9 เลือกสายพันธุ์กลาย ที่ผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น และผลิตได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์กลายตัวอื่น รวมทั้งมีแอคติวิตี (activity) ของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสสูง แต่แอคติวิตี ของเอนไซม์โปรติเอสต่ำ ไปทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรม

16 การทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุ์กลาย

นำเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากขั้นทุติยภูมิ มาเลี้ยงในอาหารสูตร SL ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 และตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อสายพันธุ์กลาย โดยใช้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ผ่านการถ่ายเชื้อมาไม่ต่ำกว่า 5 รุ่น คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติต่างๆคงที่ และสามารถผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น มาเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ต่อไป นำสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดและเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงแต่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น มาศึกษาต่อ

17 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. niger* WU-2223L กับสายพันธุ์กลาย

ใช้หลอดหยดที่ปลอดเชื้อ ดูดน้ำหมักที่เลี้ยง *A. niger* WU-2223L และสายพันธุ์กลาย ตามวิธีทดลองในข้อ 4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ของการเลี้ยง มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ