บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์/ครุภัณฑ์	บริษัท/ประเทศ
ตู้เขี่ยเชื้อแบบ larminar flow	-
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น U4600P	Sartorius, Germany
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC205	Denver Instrument Company, USA
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius, Germany
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น 8453	Hewlett Packard
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น NovaSpec 4049	LKB Biochrom, England
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น G25	Grant Instrument Ltd., Cambridge, England
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)	Lab-Line
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Universal 16	Hettich, Germany
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น E5EA	OMROM
เครื่องกรอง Ultrafiltration ชนิด 10,000 NMWL	Millipore Corporation, Bedford, USA
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Steam Sterilizer/Autoclave)	Ta Chang Medical Instrument Factory, Taiching, Taiwan
เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Servall refrigerated-automatic)	Ivan Servall, INC., Norwalk, Connecticut, USA
ตู้อบความร้อนสูง (hot air oven) รุ่น U50 790,387	Memmert
ตู้อบ (oven)	Clayson, New Zealand
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ion analyzer 255	Corning, USA
เครื่องวัดค่าสี I.C.S. Macbeth	USA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Spectrophotometer (Color-eye 7000)	
เครื่อง Rotary dyeing machine & steel pots รุ่น Ahiba Polymat	Japan
ถังหมัก (Fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น Bio FLO IIC	New Brunswick Scientific Co.,Inc.,USA
ปิเปตอัตโนมัติขนาด 250 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร	Brand Gmbh + Co, Germany
เครื่องกรองแบบสุญญากาศ	Japan
ชุดเครื่องแก้ว	Pyrex, New York, USA
ชุดเครื่องแก้ว Duran Scott	Schott Duran, Germany
กระดาษกรอง Whatman NO.1	Whatman International Ltd., England
ถุงไดอะไลซีส รุ่น Spectra 1 Por moleculaporous membrane tubing	Spectrum Medical Industries, Inc. USA

ตัวอย่างผ้า

ผ้าฝ้ายถักโครงสร้าง single jersey

เอนไซม์

ชนิด	บริษัท/ประเทศ
ไลเปส EC.3.1.1.3 จาก Pancreas 15 ยูนิตต่อกรัม โปรตีเอส EC.3.4.23.6 จาก *A. niger* 14,000 ยูนิตต่อกรัม เซลลูเลส EC.3.2.1.4 จาก *A. niger* 25,000 ยูนิตต่อกรัม	Tokyo chemical Industrial, Japan

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

ชนิด	บริษัท/ประเทศ
วุ้นผงตรานางเงือก	พัฒนสินเอนเตอร์ไพรส์, กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย
Ethanol 95% (C_2H_5OH)	องค์การสุรา กรมสรรพสามิต จ.ฉะเชิงเทรา ประเทศไทย
Cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB) ($C_{19}H_{42}NBr$)	Serva, Germany
Calcium hydrogen phosphate dihydrate ($CaH_2PO_4.2H_2O$)	Scharlau
D-arabinose ($C_5H_{10}O_5$)	Eastman Kodak Company, USA
Peptone Yeast extract	Bacto Difco, USA
Ammonium molybdate $(NH_4)_6Mo7O_{24}.4H_2O$ Sodium hydroxide (NaOH)	Mallinckrodt, Mexio
D-trehalose.$2H_2O$ ($C_{12}H_{22}O_{11}.2H_2O$)	Hayashibara Co., Ltd, Japan
Aniline ($C_6H_5NH_2$)	Panreac, EU
Cobalt chloride ($CoCl_2$) Ferrous sulphate ($FeSO_4$) Manganese sulphate ($MnSO_4$) Zinc sulphate ($ZnSO_4$)	MAY & BAKER LTD. Ltd., Dagenham, England
Acetronitrile (CH_3CN) Citric acid ($C_6H_2O_7.2H_2O$) Diphenylamine ($(C_6H_5)_2NH$) Ferric nitrate nonahydrate ($(FeNO_3)_3.9H_2O$) D-Glucose $C_6H_{12}O_6$ Potassium acetate (CH_3COOK) Pyridine ($C_5H_5N_5$) Sodium lauryl sulphate ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$)	Asia Pacific Specialty Chemicals Limited, Australia

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

di-Sodium ethylendiaminetetraacetate (EDTA) dihydrate ($(CH_2.N(CH_2.COOH).CH_2.COONa)_2.2H_2O$ Sodium borate decahydrate ($Na_2B_4O_7.10H_2O$)	
Carboxymethylcellulose (Sodium salt, low viscosity) α-cellulose Cornsteep liquor D-cellobiose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 3,5-Dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$) D-fructose ($C_6H_{12}O_6$) β-lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) Maltotriose ($C_{18}H_{32}O_{16}$) L-sorbose ($C_6H_{12}O_6$) Xylan from brichwood	Sigma Chemical, St. Louis, MO. USA
Ammonium sulphate $(NH_4)_2SO_4$ Acetic acid (CH_3COOH) Congo red 2-Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoethyl ether) ($C_4H_{10}O_2$) Hydrochloric acid (HCl) Manganese sulphate ($MnSO_4$) Phenol (C_6H_5OH) Potassium permanganate ($KMnSO_4$) Silver nitrate ($AgNO_3$) Sodium hydroxide (NaOH) Sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa.3H_2O$) Sodium chloride (NaCl) di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous	Merck, Darmstadt, Germany

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(Na_2HPO_4) D-xylose ($C_5H_{10}O_5$)	
Acetone (CH_3COCH_3) Ammonium phosphate ($NH_4H_2PO_4$) Copper sulphate ($CuSO_4$) Ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$) Magnesium sulphate ($MgSO_4$) Oxalic acid dehydrate $(COOH)_2.2H_2O$ Potassium sodium tartrate $(COOK(CHOH)_2$ $COONa.4H_2O$) Potassium permanganate ($KMnO_4$) Ortho-phosphoric acid (H_3PO_4) Silver sulphate ($AgSO_4$) Sodium carbonate (Na_2CO_3) di-sodium hydrogen phosphate dihydrate ($Na_2HPO_4.2H_2O$) Sulfuric acid (H_2SO_4) Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) Urea (NH_2CONH_2)	Carlo Erba, Milan, Italy
Ammonium nitrate (NH_4NO_3) Antifoam A Bovine serum albumin (BSA) Casein Decahydronaphthalene ($C_{10}H_{18}$) 3,5-Dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$) D-galactose ($C_6H_{12}O_5$) D-mannose ($C_6H_{12}O_6$) D-Salicin ($C_{13}H_{18}O_7$) Sodium-di-hydrogenphosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$) di-Sodium hydrogen arsenate heptahydrate	Fluka AG. Buch, Switzerland

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

($AsHNa_2O_4.7H_2O$) Tween 80 tri-Sodium citrate dihydrate ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$) Xylose ($C_5H_{10}O_5$)	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. เชื้อราที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 เชื้อรา *Acrophialophora* sp.ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์โดย พรเทพ ถนนแก้ว (2538)

3.1.2 เชื้อรา *Trichoderma reesei* Rut C 30 จากห้องปฏิบัติการการใช้ประโยชน์จากชีวมวลของพืช (Plant Biomass Utilization Research Unit)

3.1.2 เชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสที่คัดแยกได้จากก้านเครือกล้วย

3.2. การคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสจากก้านเครือกล้วย

3.2.1 การคัดแยกขั้นต้น (Primary isolation)

นำก้านเครือกล้วยที่ต้องการคัดแยกเชื้อรามาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นจึงนำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร Czapex' s dox medium (ภาคผนวก ก) โดยมีกระดาษกรองเป็นแหล่งเซลลูโลส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 40 และ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อราเจริญทำการคัดแยกลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) เพื่อแยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์

3.2.2 การคัดแยกขั้นที่สอง (Secondary isolation)

นำเชื้อราที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ มาเลี้ยงบนอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) (ภาคผนวก ก) ทำการตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสของเชื้อรา โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเพื่อดูการเจริญ จากนั้นจึงนำสี Congo red ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ มาราดทับเส้นใย ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เทสีทิ้งและล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย NaCl 1 โมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที สามารถสังเกตเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลส ได้โดยดูวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นโดยวัดขนาดของวงใสมาเปรียบเทียบกับขนาดของโคโลนี (Suyama *et al.*,1993) คัดแยกเก็บเพื่อนำไปทดสอบต่อไป

3.2.3 การคัดแยกขั้นที่สาม (Tertiary isolation)

นำเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.2 มาทดสอบการผลิตเซลลูเลส โดยทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เพื่อให้เส้นใยเจริญ จากนั้นจึงใช้แท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น นำมาใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Production (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน นำมาตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสโดยการวัดแอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) (Ghose,

1987) **เอนโดกลูคาเนส** (endoglucanase)(Ghose, 1987) **เบตา-กลูโคซิเดส** (β-glucosidase) (Sternberg *et al.*,1976) **ไซแลนเนส** (xylanase) (Ghose and Bisaria, 1987) **และวัดปริมาณโปรตีน** (Gornall *et al.*,1949) **เพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอคติวิตีจำเพาะ** (Specific activity) **ตามวิธีแสดงในภาคผนวก ค**

3.3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกได้

นำเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลสที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก ข) เพื่อศึกษาโครงสร้างต่างๆ และจำแนกเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ในระดับชนิดตามวิธีของ Klich and Pitt, 1988 โดยดูลักษณะต่างๆ เช่น สีของเชื้อราบนอาหาร การเปลี่ยนสีอาหาร ลักษณะการเจริญของเส้นใยหยดน้ำที่เกาะบนเส้นใย สี ขนาด และรูปร่างของสปอร์

3.4. การผลิตเซลลูเลส

3.4.1 การศึกษาองค์ประกอบของแหล่งเซลลูโลส

นำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ ได้แก่ ก้านใบกล้วย ก้านเครือกล้วย ซังข้าวโพด และ ใบอ้อย มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ คือ Acid Detergent Fiber (ADF) Neutral Detergent Fiber (NDF) Permanganate lignin (PML) และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า (Goering and Van Soest 1970) เพื่อคัดเลือกแหล่งเซลลูโลสที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ในการผลิตเซลลูเลส

3.4.2 การศึกษาผลแหล่งเซลลูโลสชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเซลลูเลสโดย *T. reesei*

นำวัสดุทางการเกษตรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ก้านใบกล้วย ก้านเครือกล้วย ซังข้าวโพด และใบอ้อย มาเป็นแหล่งเซลลูโลสเพื่อทำการผลิตเซลลูเลสด้วย *T. reesei* ปรับความเข้มข้นของแหล่งเซลลูโลสเป็น 2.0 เปอร์เซ็นต์กรัมแห้งต่อปริมาตร ค่าความเป็นกรดและด่าง 5.0 ทำการเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม และไซแลนเนสโดยการวัดแอคติวิตี เพื่อคัดเลือกแหล่งเซลลูโลสที่ดีที่สุดสำหรับนำไปผลิตเซลลูเลส

3.4.3. การปรับสภาพแหล่งเซลลูโลส

นำแหล่งเซลลูโลสที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 มาทำการปรับสภาพโดยทำการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนวัสดุทางการเกษตร 40 กรัมต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1000 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80

องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที ล้างด้วยน้ำให้สะอาดจนกว่าวัสดุจะมีค่าความเป็นกรดและด่าง ประมาณ 7.0 บีบน้ำออก นำไปอบให้แห้งและชั่งน้ำหนักที่เหลือจากการปรับสภาพ ทำการปรับค่าความเป็นกรดและด่างโดยทำการแช่ในสารละลายโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความปืนกรดและด่าง 4.8 (ภาคผนวก ข) ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นอย่างน้อย 24 ชั่วโมง บีบน้ำออกให้แห้ง เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้เป็นแหล่งเซลลูโลสในการผลิตเซลลูเลส

3.4.4 ภาวะในการปรับสภาพวัสดุการเกษตรที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส

ทำการเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกจากข้อ 3.2 และ *Acrophialophora* sp. และ *T. reesei* บนอาหาร PDA เพื่อให้เส้นใยเจริญ จากนั้นจึงใช้แท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น นำมาใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Production medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้วัสดุทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ จากข้อ 3.4.3 เป็นแหล่งเซลลูโลส และปรับความเข้มข้นของแหล่งเซลลูโลสเป็น 2.0 เปอร์เซ็นต์กรัมแห้งต่อปริมาตร ค่าความเป็นกรดและด่าง 5.0 ทำการเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสโดยการวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม และไซแลนเนส เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัสดุการเกษตรเพื่อใช้ในการผลิตเซลลูเลส โดยเฉพาะในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

3.4.5 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน

ทำการผลิตเซลลูเลสโดยใช้ภาวะที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.4 โดยมีการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$) ยูเรีย (Urea) และ เปปโตน (Peptone) ทำการเลี้ยงเชื้อราที่ค่าความเป็นกรดและด่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสโดยการวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม และ ไซแลนเนส เพื่อหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสโดยเฉพาะในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

3.4.6 การคัดเลือกแหล่งอาหารเสริม

ทำการผลิตเซลลูเลสโดยใช้ภาวะที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.5 และมีการเติมแหล่งอาหารเสริม ได้แก่ ถั่วเหลือง (soybean) หรือ เคซีน (cesien) ปริมาณ 0.05 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร

ทำการเลี้ยงเชื้อราที่ค่าความเป็นกรดและด่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสโดยการวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม และไซแลนเนส เพื่อหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสโดยเฉพาะในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

3.4.7 **ความเข้มข้นของแหล่งอาหารเสริม**

ทำการผลิตเซลลูเลสโดยใช้ภาวะที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.6 แต่ทำการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งอาหารเสริมที่ใช้คือ 0.05 0.10 0.15 0.20 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ทำการเลี้ยงเชื้อราที่ค่าความเป็นกรดและด่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสโดยการวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม และไซแลนเนส เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสโดยเฉพาะในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

3.4.8 **อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเพื่อผลิตเซลลูเลส**

ทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 40 และ 45 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา

ทำการผลิตเซลลูเลสโดยใช้ภาวะที่คัดเลือกได้จากข้อ 3. 4.7 และมีการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เป็น 30 40 และ 45 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงเชื้อราที่ค่าความเป็นกรดและด่าง 5.0 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสโดยการวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม และไซแลนเนส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสโดยเฉพาะในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

3.4.9 **การศึกษาการขยายขนาดส่วนของการผลิตเอนไซม์**

ทำการผลิตเซลลูเลสโดยใช้ภาวะที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.8 และมีการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์คือขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 400 มิลลิลิตร และถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 3 ลิตร

ในระดับขวดรูปชมพู่ ทำการเลี้ยงเชื้อราที่ค่าความเป็นกรดและด่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน

ในระดับถังหมัก ทำการเลี้ยงเชื้อราที่ค่าความเป็นกรดและด่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วของการให้อากาศ 3 vvm ความเร็วของใบพัด 150 รอบต่อนาที ควบคุมการเกิดฟองด้วย Antifoam A

จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบการผลิตเซลลูเลสโดยวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม และไซแลนเนส

3.5. การเก็บเอนไซม์

ทำการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเซลลูเลส ตามภาวะการผลิตที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 จากนั้นเก็บเอนไซม์โดยการนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บเอนไซม์ส่วนใสเพื่อนำไปวัดค่าความเป็นกรดและด่าง ค่าแอคติวิตีของเซลลูเลส ไซแลนเนส และปริมาณโปรตีน

3.6 การศึกษาสมบัติบางประการของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

3.6.1 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดและด่างที่มีต่อการทำงานของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

นำเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราในข้อ 3.5 มาวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส โดยปรับให้ภาวะการทำงานของเอนไซม์ให้มีค่าความเป็นกรดและด่าง ต่างๆ กัน คือ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ เพื่อศึกษาค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรดและด่าง (ภาคผนวก ข) ได้แก่

โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.0

โซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6.0 7.0 และ 8.0

3.6.2 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดและด่างที่มีต่อความเสถียรของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

นำเอนไซม์จากเชื้อราทั้ง 5 ชนิด มาปรับค่าความเป็นกรดและด่างต่างๆ คือ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์จากข้อ 3.6.1 ทำการวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส จากนั้นจึงนำเอนไซม์ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดแอคติวิตีอีกครั้งหนึ่งเพื่อศึกษาความเสถียรของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนสที่ค่าความเป็นกรดและด่างต่างๆ

3.6.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

นำเอนไซม์จากเชื้อราทั้ง 5 ชนิด มาวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส โดยปรับภาวะค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 เนื่องจากเป็นค่าความเป็นกรดและด่างที่เซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนสทำงานดีที่สุด วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลสใน กลุ่มเอนโดกลูคาเนส

3.6.4 การศึกษาความเสถียรของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนสที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน

นำเอนไซม์จากเชื้อราทั้ง 5 ชนิด มาวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส โดยปรับภาวะค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 และค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อมูลจากข้อ 3.6.3 มีการแปรผันเวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์ก่อนทำปฏิกิริยา คือ 0 15 13 45 60 75 90 105 และ 120 นาที เพื่อศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

3.6.5 การศึกษาจลนศาสตร์ของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

นำเอนไซม์จากเชื้อราทั้ง 5 ชนิด มาวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส โดยปรับภาวะค่าความเป็นกรดและด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.6.1 ถึง 3.6.4 และทำการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ใช้ได้แก่ Carboxymethylcellulose (CMC) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.00 0.08 1.20 1.60 และ 2.00 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ กัน คือ 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน Lineweaver – Burk โดยใช้ค่า $1/V_0$ และ $1/S$ เพื่อหาคำนวณหาค่า K_m และ V_{max}

3.7 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

นำเอนไซม์จากเชื้อราทั้ง 5 ชนิด มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 20 30 40 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตรจากนั้นนำตะกอนเอนไซม์ที่ได้มาละลายด้วย สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง 5.0 จากนั้นนำไปไดอะไลซีส โดยใช้ถุงที่มีขนาด Molecular weight cut off เท่ากับ 12,000 ถึง 14,000 ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข) ค่าความเป็นกรดและด่าง 5.0 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยนสารละลายอะซีเตต

บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง 5.0 ใหม่ทุกๆ 12 ชั่วโมง 4 ครั้ง และนำไปวัดแอคติวิตีเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อความบริสุทธิ์และแอคติวิตีของเซลลูเลสโดยเฉพาะในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

3.8 การศึกษาน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในก้านใบกล้วย

3.8.1 การย่อยสลายด้วยกรด

นำก้านใบกล้วยที่บดละเอียดมา 1 กรัม ย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นตั้งทิ้งให้เย็นและกรองกากทิ้ง ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นจึงนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการระเหยเอาน้ำออก

3.8.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

นำก้านใบกล้วยบดละเอียด 0.1 กรัม ใส่ในสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.8 จากนั้นจึงใส่เซลลูเลส 0.1 กรัม ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 60 นาที และนำออกมาต้มในน้ำเดือด 10 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ กรองเอาสารละลายส่วนใสไว้

3.8.3 การหาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในก้านใบกล้วย

นำสารละลายน้ำตาลที่ได้จากข้อ 3.8.1 และ 3.8.2 มาหยดบนแผ่นซิลิกาเจล โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐานชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ได้แก่ อะราบิโนส ไซโลส กลูโคส ซอร์โบส ฟรุกโทส แมนโนส กาแลคโตส เทฮาโลส ซูโครส แลคโตส เซลโลไบโอส และมอลโตไตรโอส และนำไปใส่โถที่มีสารละลายผสม ซึ่งเป็นตัวพาน้ำตาล ได้แก่ ethylacetate : pyridine : water ในอัตราส่วน 100 : 35 : 25 ปริมาตรต่อปริมาตร (Chaplin and Kennedy, 1994)

เมื่อสารละลายเคลื่อนที่ไปจนเกือบสุดแผ่นเจลแล้ว นำออกมาตั้งทิ้งให้แห้ง และพ่นด้วยสารละลายตรวจสอบน้ำตาล (detection reagent) (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 30 นาที นำออกมาหาค่า R_f และสังเกตสีที่เกิดขึ้น

3.9 การนำเซลลูเลสไปประยุกต์ในการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้าย (Sangwatanaroj *et al.*, 2003)

3.9.1 การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายด้วยไลเปส

นำผ้าฝ้ายถัก (knitted fabric) แช่ในสารละลายที่ประกอบด้วยไลเปส 0.5 กรัมต่อลิตร และ Womie TE (wetting agent) 1.0 กรัมต่อลิตร ในอัตราส่วนผ้าต่อสารละลายเท่ากับ 1 ต่อ 50 (L/R 1 : 50) ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 8.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำผ้าออกมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที ล้างผ้าและบีบน้ำออกให้แห้งที่สุด

3.9.2 การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายด้วยโปรตีเอส

นำผ้าฝ้ายถัก (knitted fabric) แช่ในสารละลายที่ประกอบด้วยโปรตีเอส 0.5 กรัมต่อลิตร และ Womie TE (wetting agent) 1.0 กรัมต่อลิตร ในอัตราส่วนผ้าต่อสารละลายเท่ากับ 1 ต่อ 50 (L/R 1 : 50) ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำผ้าออกมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที ล้างผ้าและบีบน้ำออกให้แห้งที่สุด

3.9.3 การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายด้วยเซลลูเลส

นำผ้าฝ้ายถัก (knitted fabric) แช่ในสารละลายที่ประกอบด้วยเซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อราแต่ละชนิด ร่วมกับ Womie TE (wetting agent) 1.0 กรัมต่อลิตร ในอัตราส่วนผ้าต่อสารละลายเท่ากับ 1 ต่อ 50 (L/R 1 : 50) ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำผ้าออกมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที ล้างผ้าและบีบน้ำออกให้แห้งที่สุด

3.9.4 การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายด้วยไลเปสและเซลลูเลส

นำผ้าฝ้ายถัก (knitted fabric) แช่ในสารละลายที่ประกอบด้วยไลเปสตามวิธีในข้อ 3.9.1 จากนั้นนำมาบ่มร่วมกับเซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อราแต่ละชนิดตามวิธีในข้อ 3.9.3 จากนั้นนำผ้าออกมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที ล้างผ้าและบีบน้ำออกให้แห้งที่สุด

3.9.5 การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายด้วยโปรตีเอสและเซลลูเลส

นำผ้าฝ้ายถัก (knitted fabric) แช่ในสารละลายที่ประกอบด้วยโปรตีเอสตามวิธีในข้อ 3.9.2 จากนั้นนำมาบ่มร่วมกับเซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อราแต่ละชนิดตามวิธีในข้อ 3.9.3 จากนั้นนำผ้าออกมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที ล้างผ้าและบีบน้ำออกให้แห้งที่สุด

3.9.6 การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำผ้าฝ้ายถัก (knitted fabric) มาต้มในสารละลายที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร และ Womie TE (wetting agent) 1.0 กรัมต่อลิตร ในอัตราส่วนผ้าต่อสารละลายเท่ากับ 1 ต่อ 50 (L/R 1 : 50) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำผ้ามาล้างและบีบน้ำออกให้แห้งที่สุด

3.9.7 การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายด้วยไลเปสร่วมกับเซลลูเลสทางการค้า

นำตัวอย่างผ้าฝ้ายที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยไลเปสตามข้อ 3.9.1 มาแช่ในสารละลายเซลลูเลส 0.5 กรัมต่อลิตร และ Womie TE (wetting agent) 1.0 กรัมต่อลิตร ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำผ้าออกมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที ล้างผ้าและบีบน้ำออกให้แห้งที่สุด

3.10 การทดสอบการดูดซึมน้ำของผ้าฝ้ายที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรก

นำตัวอย่างผ้าฝ้ายที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแล้วไปตากให้แห้งจากนั้นจึงนำมาทดสอบการดูดซึมน้ำดัดแปลงจากวิธีของ AATCC Test Method 79 โดยนำผ้ามากางให้เรียบ จากนั้นจึงใช้หลอดหยด หยดน้ำกลั่นลงบนผ้าจำนวน 1 หยด สังเกตและจับเวลาการดูดซึมหยดน้ำลงบนผ้า

3.11 การทดสอบค่าความขาว ความเหลือง และความสว่างของผ้าฝ้ายที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรก

นำตัวอย่างผ้าฝ้ายที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแล้วไปตากให้แห้งจากนั้นจึงนำมาทดสอบค่าความขาว ความเหลือง และความสว่าง ด้วยเครื่อง I.C.S. Macbeth spectrophotometer (Color-eye 7000) โดยค่าความขาววัดตามมาตรฐานของ CIE Ganz ค่าความเหลืองวัดตามมาตรฐานของ ASTM D1925ซึ่งคำนวณผลที่ได้ตามสมการของ Kubelka Munk คือ

$K/S = (1-R)^2/2R$

K = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซึมสี

S = ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายสี

R = the reflectance of the fabric at the wavelength of the maximum absorption (λ_{max})

3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (นัยสำคัญเท่ากับ 0.05) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows version 10.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย