บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

วัตถุดิบสำหรับคัดแยกเชื้อ

1. วัสดุเหลือทิ้งประเภทต่าง ๆ เช่น กากมันสำปะหลัง มันเส้น มันแว่น จากโรงงานทรงเจริญ อ. แกลง จ. ระยอง และโรงงานสหพืชเจริญผล อ. เมือง จ. ระยอง

2. แป้งมันจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง นำมาจากโรงงานทรงเจริญ อ. แกลง จ. ระยอง

3. ดินบริเวณโรงงานแป้งมันสำปะหลัง นำมาจากโรงงานทรงเจริญ อ. แกลง จ. ระยอง

อาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก)

1. Strach medium (ยุพา ก่อเกียรตินันท์, 2521)

2. พีดีบี (PDB: Potato dextrose broth) (Analytical grade, Merck)

3. พีดีเอ (PDA: Potato dextrose agar) (Analytical grade, Merck)

จุลินทรีย์

Aspergillus oryzae TISTR3018 ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา

สารเคมี

1. แป้ง (Soluble starch) (Analytical grade, BDH)

2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) (Commercial grade, Merck)

3. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate: $(NH_4)_2SO_4$) (Analytical grade, Merck)

4. ยูเรีย (Urea: H_2NCONH_2) (Ajax)

5. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogenphosphate: KH_2PO_4) (Commercial grade, Merck)

6. แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต (Magnesium sulfate: $MgSO_4.7H_2O$) (AR grade, Merck)

7. แมงกานีสซัลเฟต-เพนตะไฮเดรต (Manganese pentahydrate: $MnSO_4.5H_2O$) (Analytical grade, BDH)

8. เฟอรัสซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต (Ferrussulfate heptahydrate: $FeSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Fisher)

9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide: NaOH) (Commercial grade, Merck)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

10. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid: HCl) (Commercial grade, Merck)
11. กรดอะซิติก (Glacial acetic acid: CH_3COOH) (AR grade, Merck)
12. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (Ethanol 95%)
13. สารละลายไอโอดีน (1 เปอร์เซ็นต์) (Gram iodine)
14. Chlorox (20 เปอร์เซ็นต์)
15. Tween 80 (0.1 เปอร์เซ็นต์)
16. อะซิติลอะซิโตน (Acetylacetone: $C_5H_8O_2$) (Carlo)
17. พารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ (ρ-dimethylamino benzaldehyde) (Carlo)
18. กลูโคซามีน-ไฮโดรเจนคลอไรด์ (Glucosamine-HCl: $C_6H_{13}NO_5.HCl$) (Carlo)
19. ฟีนอล (Phenol)
20. แอมโมเนียม อะซิเตท (Ammonium acetate)
21. อะกาโรส (Agarose) (Sigma chemical., MO, USA)
22. เอทิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide)

รีเอเจนต์และบัฟเฟอร์ (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข)

1. TAE buffer
2. Loading buffer
3. UltraClean ™15 DNA Purifition Kit (Mo bio laboratories, Inc.)
4. คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (Chloroform-isoamyl alcohol)

ยาปฏิชีวนะ

1. Penicillin G (Sigma chemical., MO, USA)
2. Streptomycin sulfate (Sigma chemical., MO, USA)
3. Ampicillin (Sigma chemical., MO, USA)

ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน

Lamda DNA/*Eco*RI and *Hind*III (Promega)

เอนไซม์

Taq DNA polymerase (GIBGO RBL®, Life & technologies, Inc., MD, USA)

ไพร์เมอร์

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาคือ NS1, NS8, 18S001 และ 18S13 (White et al., 1990) ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับบริเวณยีน 18S rRNA และ 18SR ซึ่งออกแบบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ 18S13 และ NS8 เป็นไพร์เมอร์สำหรับวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ คุณสมบัติบางประการของไพร์เมอร์ทั้งหมดแสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์

ไพร์เมอร์	Sequence 5' ⟶ 3'	Tm (^{0}C)	การนำไปใช้
NS1	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	56	PCR & Sequencing
NS8	TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA	65	PCR & Sequencing
18S001	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT	55	Sequencing
18S13	CCT TGT TAC GAC TTC ACC TTC	56	Sequencing
18SR	TCA AAG AAA TTG ACG GAA GG	50	Sequencing

อุปกรณ์

1. ฮีมาซัยโตมิเตอร์ (Haemacytometer)
2. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
3. โถดูดความชื้น (Desiccator)
4. โกร่งและแท่งบด (Mortar and pestle)
5. จานเพาะเชื้อ (Petri-dish)
6. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (Erlenmeyer flask 250 ml.)
7. ที่เจาะวุ้น (Cork borer)
8. กระดาษกรอง (Filter paper) Whatman เบอร์ 3

เครื่องมือ

1. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) รุ่น Super clean
2. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Low temperature incubator) รุ่น Sanyo
3. ตู้ดูดอากาศ (Flower) รุ่น Super Flow Fume Cupbard
4. เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated incubator shaker) รุ่น Innova 4340
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น 1001 Plus
6. เครื่องชั่งแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Automatic balance) รุ่น HR-2000
7. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) Model pH-330 รุ่น pH 330/Set-1
8. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Hot air oven) รุ่น WTB binder

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

9. ชุดเครื่องกรองเซลล์ (Vaccuum filter)

10. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น Tomy SS-325

11. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refigerated centrifuge) (Du pont Co., Wilmington, USA)

12. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV Transilluminator) รุ่น Spectorline

13. กล้องถ่ายรูปโพลารอยด์ (Polaroid corporation, St. Alban, England)

14. DNA thermal cycler (Perkin elmer corporation, Norwalk, USA)

15. Electrophoresis apparatus (Taited pico-2, Japan)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินบริเวณไร่มันสำปะหลังและวัสดุเหลือทิ้งประเภทต่าง ๆ เช่น กากมันสำปะหลัง มันเส้น มันแว่น นำมาจากโรงงานทรงเจริญ อ. แกลง จ. ระยอง และโรงงานสหพืชเจริญผล อ. เมือง จ. ระยอง ใส่ถุงพลาสติกที่สะอาด

2. การเตรียมตัวอย่างสำหรับคัดแยกราและการทำ Enrichment

2.1 นำตัวอย่างที่ใช้ในการแยกราได้แก่ กากมันสำปะหลัง มันเส้น มันแว่น มาบดให้ละเอียด

2.2 นำตัวอย่างประเภทต่าง ๆ ปริมาณ 10 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นเพื่อให้ความชื้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนพบการเจริญของรา

3. การคัดแยกราจากตัวอย่างธรรมชาติ

3.1 การคัดแยกราจากตัวอย่างดิน

3.1.1 ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ Normal saline 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

3.1.2 เขย่าให้ตัวอย่างดินกระจายตัว จากนั้นเจือจางสิบเท่าตามลำดับจากระดับการเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-3}

3.1.3 ดูดตัวอย่างดินปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar ที่ประกอบด้วยแป้ง (Soluble starch) 2.3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต 0.02 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เท่ากับ 5.6 (ยุพา ก่อเกียรตินันท์, 2521) แล้วเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจาน ชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.1.4 บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญของรา ทุกวัน

3.1.5 เมื่อพบการเจริญของรา แยกเชื้อจนกระทั่งบริสุทธิ์ ทำ Stock culture ของราแต่ละไอโซเลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar (Slant) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การคัดแยกราจากตัวอย่างมันประเภทต่าง ๆ

3.2.1 นำตัวอย่างมันประเภทต่าง ๆ ใส่ลงในจานปราศจากเชื้อ จากนั้นเท 20 เปอร์เซ็นต์ Chlorox ลงให้ท่วมตัวอย่าง ปิดฝาจานและเขย่าไปมาเบา ๆ ประมาณ 5-10 นาที แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ

3.2.2 เท Chlorox ทิ้งไป ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2-3 ครั้ง

3.2.3 ใช้ฟอร์เซ็บคีบตัวอย่างมาซับกับกระดาษซับที่สะอาดเพื่อซับน้ำส่วนเกินออก

3.2.4 นำตัวอย่างมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar ปิดฝาจานและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตรวจพบการเจริญของรา

3.2.5 แยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar จนกระทั่งบริสุทธิ์

3.2.6 ทำ Stock culture ของราแต่ละไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar (Slant) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้งของรา

4.1 นำราที่ได้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar โดยวิธี Point inoculation นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยราบริเวณรอบนอกโคโลนีนำมาวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar

4.2 บ่มเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อครบกำหนดราดด้วยสารละลายไอโอดีน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสและโคโลนี

4.3 คำนวณอัตราส่วนระหว่างขนาดโซนใสต่อขนาดโคโลนี

5. การจัดจำแนกรา

นำราที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้ดีมาจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะโคโลนีที่มีการเจริญบนอาหารแข็ง (Macroscopic characteristics) สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic characteristics) (Alexopoulos & Mims, 1979) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA (ตามวิธีในข้อ 6)

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

6.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเส้นใยรา (Donnell et al., 1997)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6.1.1 เพาะเลี้ยงราที่ศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อนำไปกรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No.3 โดยใช้เครื่องกรองสูญญากาศ จากนั้นทำให้เซลล์แห้งโดยการทำ Freeze drying

6.1.2 ชั่งเซลล์แห้ง 200 ไมโครกรัม ใส่ใน Eppendorf tube จากนั้นเติม CTAB buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex 5 วินาที บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

6.1.3 ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และนำส่วนสารละลายใส่ Eppendorf tube หลอดใหม่

6.1.4 เติม Phenol และ chloroform -isoamyl alcohol ปริมาตร 1 Volume

6.1.5 ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และนำส่วนสารละลายใส่ Eppendorf tube หลอดใหม่

6.1.6 เติม Ammonium acetate 7.5 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 volume และ 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 2.5 Volume เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

6.1.7 ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6.1.8 ล้างดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

6.1.9 ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากเก็บส่วนตะกอนดีเอ็นเอและทำให้แห้ง

6.1.10 ละลายดีเอ็นเอโดยเติมน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.2 การเพิ่มขยายยีน 18S rRNA โดยเทคนิค PCR

6.2.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาผสมองค์ประกอบต่าง ๆ ตามลำดับลงในหลอดสำหรับทำ PCR ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3-2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-2 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 18S rRNA

องค์ประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	30.4	-
10X PCR buffer	5	1 เท่า
50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$	1.5	1.5 มิลลิโมลาร์
10 มิลลิโมลาร์ dNTP mix	1	0.2 มิลลิโมลาร์
ไพร์เมอร์ NS1 (30 มิลลิโมลาร์)	0.8	0.5 ไมโครโมลาร์
ไพร์เมอร์ NS8 (30 มิลลิโมลาร์)	0.8	0.5 ไมโครโมลาร์
จีโนมิกดีเอ็นเอ (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	10	100 นาโนกรัม
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.5	2.5 ยูนิต
ปริมาตรรวม	50	-

6.2.2 นำหลอดปฏิกิริยาที่เตรียมได้จากข้อ 6.1 ไปเข้าเครื่อง DNA thermal cycler ซึ่งปฏิกิริยา PCR จะทำเป็นจำนวนทั้งหมด 35 รอบ โดยแต่ละรอบมีสภาวะดังแสดงในตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-3 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลาที่ใช้ต่อรอบ	จำนวนรอบ
Initial denaturation	96 องศาเซลเซียส	2 นาที	-
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	35 รอบ
Annealing	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	-

6.2.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยนำสารละลายที่อยู่ในหลอดปฏิกิริยาจากข้อ 6.2.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาทำอิเลคโตรโฟริซีสบนอะกาโรสเจล (Agarose gel) 1 เปอร์เซ็นต์ (ข้อ 6.3) ตรวจผลจากเครื่อง UV transilluminator เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lamda DNA/*Eco*RI and *Hind*III

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6.3 อะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟรีซีส (Agarose gel eletrophoresis)

6.3.1 เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน TAE buffer นำไปต้มในไมโครเวฟจนอะกาโรสละลาย ตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส ใส่ Ethidium bromide (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นเทลงชุดถาดเจลที่เตรียมไว้

6.3.2 เมื่ออะกาโรสเจลแข็ง ดึงหวีออกจากเจล แล้วนำเจลไปใส่ใน Eletrophoresis chamber เทบัฟเฟอร์ (TAE) ให้ท่วมเจล

6.3.3 ผสมดีเอ็นเอกับ Loading buffer (6X) และนำมาหยอดใส่ในช่องที่อยู่บนเจล

6.3.4 เปิดกระแสไฟฟ้า โดยให้มีความต่างศักย์เป็น 80 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที

6.3.5 บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

6.4 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

ใช้ UltraClean™15 DNA Purifition Kit ในการทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ภายหลังการทำ Agarose gel eletrophoresis โดยมีขั้นตอนดังนี้

6.4.1 ตัด agarose ตรงตำแหน่งของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยใบมีดที่สะอาดชิ้นวุ้นด้วยใบมีดที่สะอาด ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตบนเครื่อง UV transilluminator ใส่ใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

6.4.2 เติม ULTRA SALT ปริมาตร 3 volume (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) และผสมให้เข้ากัน

6.4.3 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เขย่าตัวอย่างเป็นช่วง ๆ เพื่อผสมจนกระทั่งอะกาโรสหลอมจนหมด

6.4.4 แขวนลอย ULTRA BINDให้ Homogenous โดยการ Vortex ที่ความเร็วสูงสุด โดยขณะทำให้วางหลอดในตำแหน่ง Horizontal (ใช้เวลาประมาณ 5 นาที)

6.4.5 เติม ULTRA BIND 5 ไมโครลิตร บวก 1 ไมโครลิตร (สำหรับการ Recover ดีเอ็นเอปริมาณ 0-1 ไมโครกรัม) ลงในสารละลายดีเอ็นเอข้อ 6.4.3

6.4.6 บ่ม 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในระหว่างนี้ให้ผสมตัวอย่างเป็นช่วง ๆ (โดยการใช้นิ้วเคาะข้างหลอด)

6.4.7 ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที แยกส่วนใสออก

6.4.8 แขวนลอยตะกอนโดยเติม ULTRA WASH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้น Vortex นาน 5-10 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6.4.9 ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที ทิ้งส่วนใส และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งนาน 5 วินาที ค่อย ๆ ดูดส่วนสารละลายทิ้ง

6.4.10 แขวนลอยตะกอนในน้ำกลั่น หรือ TE ในปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาตร ULTRA BIND Silica ที่ใช้ในข้อ 6.4.5 ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงจน Homogeneous (ห้าม Vortex)

6.4.11 บ่มประมาณ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

6.4.12 ดูดส่วนสารละลายใส่หลอดใหม่ (ทำทันที หากว่ามี Silica สีขาว ๆ ติดมาด้วย ให้ปั่นเหวี่ยงใหม่)

6.4.13 เก็บดีเอ็นเอที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส

6.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

6.5.1 เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วให้มีปริมาณ 5-10 ไมโครกรัมต่อหนึ่งปฏิกิริยา ไพร์เมอร์มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยหนึ่งปฏิกิริยาใช้ประมาณ 10 ไมโครลิตร

6.5.2 นำผลิตภัณฑ์ PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen Inc Floor 28 Yongon-Dang chongno-Go, Seoul 110-799 Korea) (http://www.macrogen.com)

6.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 6.5 มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov.com) เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank จาก National center for biotechnology information server (NCBI)

7. การเตรียมกล้าเชื้อรา

7.1 การเตรียมกล้าเชื้อราในรูปเส้นใย

7.1.1 เพาะเลี้ยงราบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar โดยวิธี Point inoculation

7.1.2 บ่มจานเพาะเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งพบการเจริญของเส้นใยรา

7.2 การเตรียมกล้าเชื้อราในรูปสปอร์

7.2.1 เก็บสปอร์ของราแต่ละไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้โดยใช้สารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 ใส่ลงในอาหารที่มีราเจริญอยู่ ทำการเขย่าเบา ๆ เพื่อให้สปอร์หลุดจากเส้นใย ดูดสปอร์แขวนลอยใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อขนาด 100 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7.2.2 ปรับปริมาณของสปอร์ด้วยสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 ปราศจากเชื้อให้เป็น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบปริมาณสปอร์ด้วย Haemacytometer นำไปใช้ทันทีภายหลังการเตรียม

8. การศึกษาการเจริญของราในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch medium

8.1 การเจริญบนอาหารแข็ง

8.1.1 ใช้ Cork borrer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยราจากจานกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 7.1 โดยเลือกตัดเส้นใยราที่อยู่บริเวณรอบนอกของโคโลนี

8.1.2 นำชิ้นราที่ตัดได้มาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

8.1.3 บันทึกการเจริญโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของราทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

8.2 การเจริญในอาหารเหลว

8.2.1 ดูดสปอร์แขวนลอยที่เตรียมในข้อ 7.2 มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีปริมาณสปอร์ในอาหารเป็น 2 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จัดชุดการทดลองเป็นแบบ Batch แต่ละชุดมี 3 ซ้ำ

8.2.2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน

8.2.3 เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อนำมากรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No.3 โดยใช้เครื่องกรองสูญญากาศ

8.2.4 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น จนสะอาด

8.2.5 อบเส้นใยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งที่คงที่ บันทึกน้ำหนักแห้งของเส้นใย

8.2.6 นำเส้นใยแห้งของราไปเก็บในเดซิเคเตอร์ เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไคตินและไคโตซาน (ตามวิธีในข้อ 9)

8.2.7 คัดเลือกราที่มีอัตราการเจริญและมีปริมาณไคตินและไคโตซานสูงเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

9. การวิเคราะห์ปริมาณไคตินและไคโตซานจากรา

ใช้วิธีการศึกษาปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Elson-morgan (Johnson, 1971)

9.1 การกำจัดโปรตีนออกจากเส้นใย

9.1.1 นำเส้นใยราที่ทำให้แห้งมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

9.1.2 ชั่งเส้นใยที่บดละเอียดแล้ว 5 กรัม นำไปย่อยเพื่อกำจัดโปรตีนโดยใส่ลงในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

9.1.3 นำสารแขวนลอยเส้นใยที่ย่อยแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนตะกอน

9.1.4 ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งน้ำที่ผ่านการกรอง (กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.3) มีค่า pH เป็น 7

9.1.5 นำตะกอนไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งที่คงที่ บันทึกน้ำหนักแห้ง จากนั้นบดให้ละเอียดเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

9.2 การย่อยด้วยกรด

9.2.1 ละลายตัวอย่างที่วิเคราะห์ 50 มิลลิกรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง

9.2.2 กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.3

9.2.3 ดูดส่วนใส 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

9.2.4 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

9.2.5 ปรับ pH ของสารละลายให้เป็นกลาง ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

9.2.6 กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.3 แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

9.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

9.3.1 ดูดสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตร เตรียม Blank (น้ำกลั่น) และสารละลายมาตรฐานกลูโคซามีนที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

9.3.2 เติม Acetylacetone reagent 1 มิลลิลิตร ทุก ๆ หลอด

9.3.4 นำหลอดทั้งหมดไปแช่ในบีกเกอร์ต้มที่มีน้ำเดือดนาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในน้ำที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที

9.3.5 เติม Absolute ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในทุก ๆ หลอด ผสมให้เข้ากัน

9.3.6 เติม Ehrlich reagent 1 มิลลิลิตร ในทุก ๆ หลอด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที

9.3.7 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

9.3.8 คำนวณความเข้มข้นของกลูโคซามีนของตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

10. การสกัดไคตินและไคโตซานจากรา (Pochanavanich & Suntornsuk, 2002)

10.1 การเตรียมเส้นใยรา

10.1.1 นำเส้นใยราที่ทำแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง

10.1.2 ชั่งเส้นใยได้น้ำหนักคงที่แล้วมาบดละเอียด ใส่ลงในสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์ NaOH (1:30 น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อทำการกำจัดโปรตีนโดยนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10.1.3 นำสารละลายเส้นใยที่ย่อยแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนตะกอนซึ่งเป็นส่วนของเซลล์ที่ไม่ละลายในด่าง (Alkali-insoluble fraction :AIF)

10.1.4 ล้างตะกอน AIF ด้วยน้ำกลั่นและนำไปปั่นเหวี่ยงทำซ้ำจนกระทั่งได้ค่า pH เป็นกลาง

10.1.5 นำตะกอน (AIF) ไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักแห้งจากนั้นบดให้ละเอียดเพื่อนำไปสกัดไคตินและไคโตซาน

10.2 การสกัดไคตินและไคโตซานจากรา

10.2.1 นำ AIF ที่ได้มาสกัดไคตินและไคโตซานโดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ acetic acid (1:40 น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

10.2.2 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บส่วนใสและตะกอนแยกจากกัน โดยส่วนของตะกอนนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง นำตะกอนที่ผ่านการล้างซึ่งเป็นไคตินไปอบจนน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักแห้ง

10.2.3 นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 11.2.2 ไปปรับค่า pH ให้เป็น 10 ด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ NaOH นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

10.2.4 เก็บส่วนตะกอนซึ่งเป็นไคโตซาน นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนได้ pH เป็นกลาง และทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่

11. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานของรา

คัดเลือกราที่มีอัตราการเจริญเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar และมีปริมาณไคตินและไคโตซานสูง (จากข้อ 10) มาใช้ในการศึกษานี้

11.1 ผลของปริมาณแป้ง (Soluble starch) ต่อปริมาณไคตินและไคโตซาน

11.1.1 ดูดสปอร์แขวนลอยที่เตรียมในข้อ 7.2 มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีการแปรผันแหล่งคาร์บอนได้แก่ แป้ง (Soluble starch) ที่มี

ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และเติมสารอาหารอื่นตามสูตรอาหารควบคุม เติมกล้าเชื้อราในรูปสปอร์โดยให้มีจำนวนสปอร์ในอาหารเป็น 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จัดชุดการทดลองเป็นแบบ Batch แต่ละชุดมี 3 ซ้ำ เขย่าความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

11.1.2 เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อนำมากรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No.3 โดยใช้เครื่องกรองสูญญากาศ

11.1.3 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น จนสะอาด

11.1.4 อบเส้นใยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งที่คงที่ บันทึกน้ำหนักแห้งของเส้นใย

11.1.5 นำเส้นใยแห้งของราไปเก็บในเดซิเคเตอร์ เพื่อนำไปสกัดไคตินและไคโตซาน (ตามวิธีในข้อ 11)

11.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณไคตินและไคโตซาน

11.2.1 ดูดสปอร์แขวนลอยที่เตรียมในข้อ 7.2 มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ starch broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนได้แก่ ยูเรีย ที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ หรือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0.25, 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แป้งเปอร์เซ็นต์ที่เหมาะสมจากข้อ 12.1 แล้วเติมสารอาหารอื่นตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อราในรูปสปอร์โดยให้มีจำนวนสปอร์ในอาหารเป็น 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จัดชุดการทดลองเป็นแบบ Batch แต่ละชุดมี 3 ซ้ำ เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

11.2.2 เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อนำมากรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No.3 โดยใช้เครื่องกรองสูญญากาศ

11.2.3 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น จนสะอาด

11.2.4 อบเส้นใยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งที่คงที่ บันทึกน้ำหนักแห้งของเส้นใย

11.2.5 นำเส้นใยแห้งของราไปเก็บในเดซิเคเตอร์ เพื่อนำไปสกัดไคตินและไคโตซาน (ตามวิธีในข้อ 11)

11.3 ผลของแมกนีเซียม แมงกานีส และเฟอรัสต่อปริมาณไคตินและไคโตซาน

11.3.1 ดูดสปอร์แขวนลอยที่เตรียมในข้อ 7.2 มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีการแปรผันธาตุแมกนีเซียม ($MgSO_4.7H_2O$) ที่มีความเข้มข้น 0.01, 0.025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันธาตุแมงกานีส ($MnSO_4.5H_2O$) และเฟอรัส

($FeSO_4.7H_2O$) ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.15 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมสารอาหารอื่นตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อราในรูปสปอร์โดยให้มีจำนวนสปอร์ในอาหารเป็น 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จัดชุดการทดลองเป็นแบบ Batch แต่ละชุดมี 3 ซ้ำ เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน

11.3.2 เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อนำมากรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No.3 โดยใช้เครื่องกรองสูญญากาศ

11.3.3 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น จนสะอาด

11.3.4 อบเส้นใยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งที่คงที่ บันทึกน้ำหนักแห้งของเส้นใย

11.3.5 นำเส้นใยแห้งของราไปเก็บในเดซิเคเตอร์ เพื่อนำไปสกัดไคตินและไคโตซาน (ตามวิธีในข้อ 10)

11.4 การศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานในอาหาร Starch medium สูตรปรับปรุง

11.4.1 ดูดสปอร์แขวนลอยที่เตรียมในข้อ 7.2 มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch broth ที่ปรับปรุงสูตรแล้ว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อราในรูปสปอร์โดยให้มีจำนวนสปอร์ในอาหารเป็น 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จัดชุดการทดลองเป็นแบบ Batch แต่ละชุดมี 3 ซ้ำ เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

11.4.2 เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อนำมากรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No.3 โดยใช้เครื่องกรองสูญญากาศ

11.4.3 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น จนสะอาด

11.4.4 อบเส้นใยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งที่คงที่ บันทึกน้ำหนักแห้งของเส้นใย

11.4.5 นำเส้นใยแห้งของราไปเก็บในเดซิเคเตอร์ เพื่อนำไปสกัดไคตินและไคโตซาน (ตามวิธีในข้อ 10)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การศึกษาการเจริญ ความสามารถในการย่อยสลายแป้ง และมีปริมาณกลูโคซามีนที่สูงของรา

การออกแบบการทดลอง

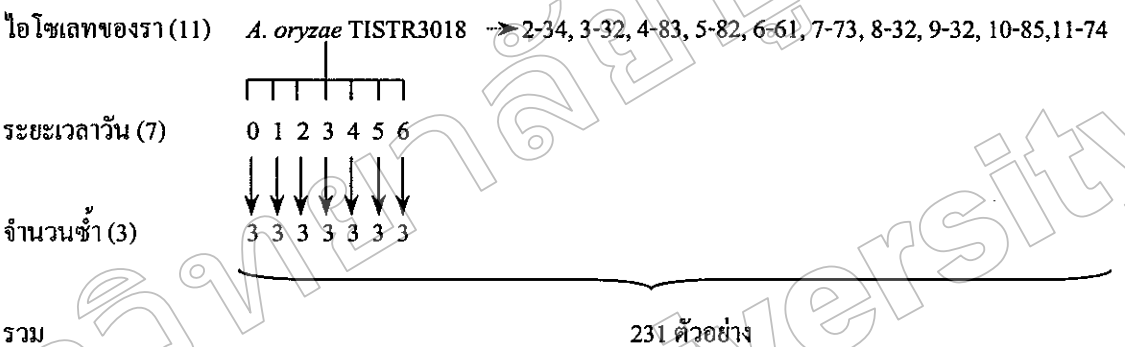
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกราที่มีการเจริญ ความสามารถในการย่อยสลายแป้ง และมีปริมาณกลูโคซามีนที่สูงของราทั้งหมด 11 ไอโซเลท และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ทั้งนี้จะวางแผนการทดลองแบบ Factorial design 11 x 7 จำนวน 3 ซ้ำ ซึ่งประกอบด้วย

ปัจจัยที่ 1 ราที่ใช้ศึกษา 11 ไอโซเลท ได้แก่ *A. oryzae* TISTR3018, 2-34, 3-32, 4-83, 5-82, 6-61, 7-73, 8-32, 9-32, 10-85 และ 11-74 ตามลำดับ

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงรา 7 วัน ได้แก่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน ตามลำดับ

สำหรับแผนผังการทดลองแสดงดังภาพที่ 3-1



ภาพที่ 3-1 แผนผังการทดลองเพื่อคัดเลือกราที่มีอัตราการเจริญ ความสามารถในการย่อยสลายแป้ง และมีปริมาณกลูโคซามีนที่สูง

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานสูงของรา

การออกแบบการทดลอง

2.1 ผลของปริมาณแป้ง (Soluble starch)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นของแป้ง (Soluble starch) ที่เหมาะสมของราแต่ละ 3 ไอโซเลท เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ทั้งนี้จะวางแผนการทดลองแบบ Factorial design 3 x 6 x 7 จำนวน 3 ซ้ำ ซึ่งประกอบด้วย

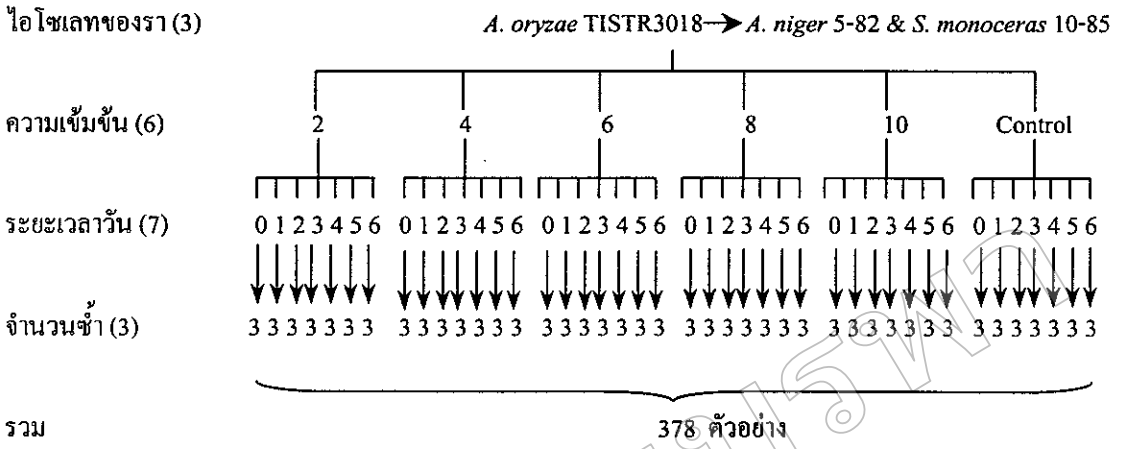
ปัจจัยที่ 1 ราที่คัดเลือกแล้ว 3 ไอโซเลท

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของแป้ง (soluble starch) จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ และชุดควบคุม

ปัจจัยที่ 3 ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงรา 7 วัน ได้แก่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน ตามลำดับ

สำหรับแผนผังการทดลองแสดงดังภาพที่ 3-2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3-2 แผนผังการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมของรา

2.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน

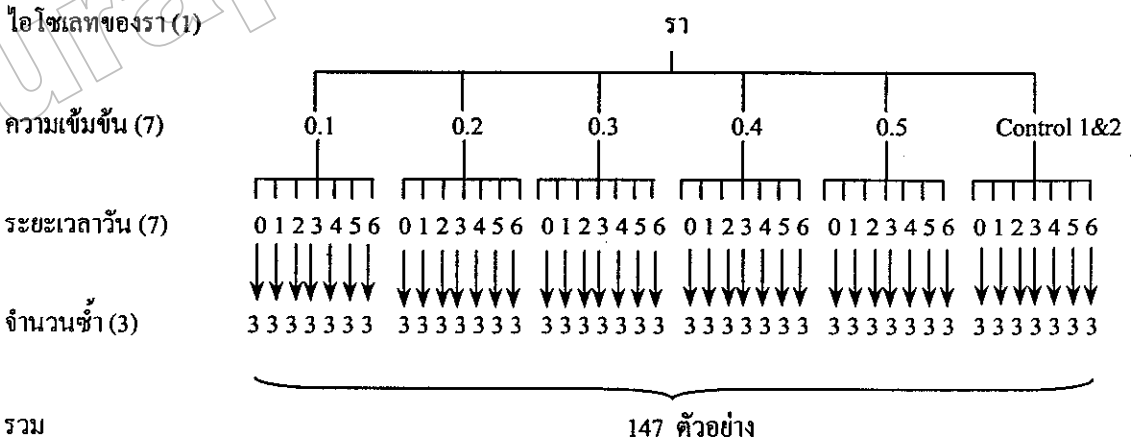
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของราแต่ละไอโซเลท เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ทั้งนี้จะวางแผนการทดลองแบบ Factorial Design 7 x 7 จำนวน 3 ซ้ำ ซึ่งประกอบด้วย

2.2.1 ยูเรีย (Urea)

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน จำนวน 7 ระดับ ได้แก่ ยูเรีย (Urea) ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชุดควบคุม 1 และ 2

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงรา 7 วันได้แก่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน ตามลำดับ

สำหรับแผนผังการทดลองแสดงดังภาพที่ 3-3



ภาพที่ 3-3 แผนผังการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (ยูเรีย) ที่เหมาะสมของรา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

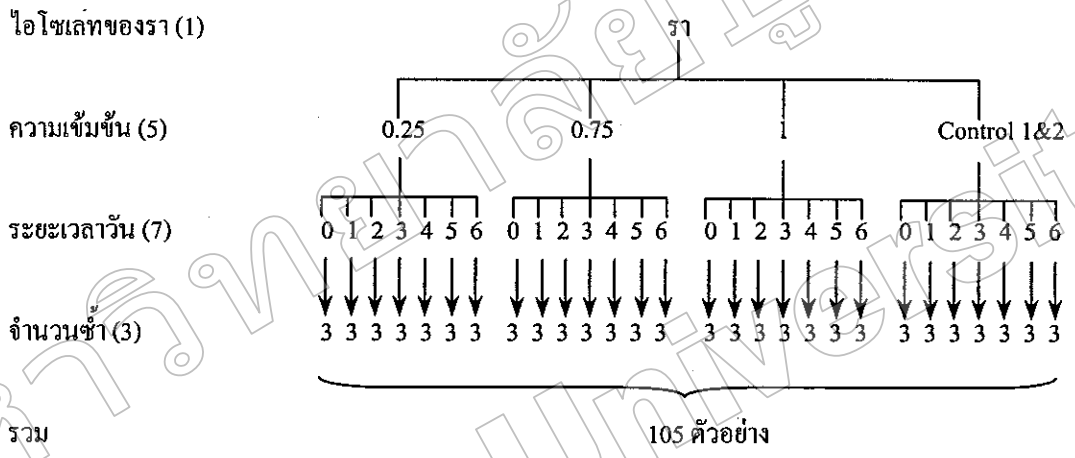
2.2.2 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

วางแผนการทดลองแบบ Factorial design 5 x 7 จำนวน 3 ซ้ำ

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน จำนวน 5 ระดับ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ความเข้มข้น 0.25, 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชุดควบคุม 1 และ 2

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงรา 7 วัน ได้แก่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน ตามลำดับ

สำหรับแผนผังการทดลองแสดงดังภาพที่ 3-4



ภาพที่ 3-4 แผนผังการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต) ที่เหมาะสมของรา

2.3 ผลของธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นของแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอรัสที่เหมาะสมของราที่คัดเลือกแล้ว เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ทั้งนี้จะวางแผนการทดลองแบบ Factorial design 2 x 3 x 5 x 7 จำนวน 3 ซ้ำ ซึ่งประกอบด้วย

ปัจจัยที่ 1 คัดเลือกราที่มีปริมาณไคตินและไคโตซานสูง

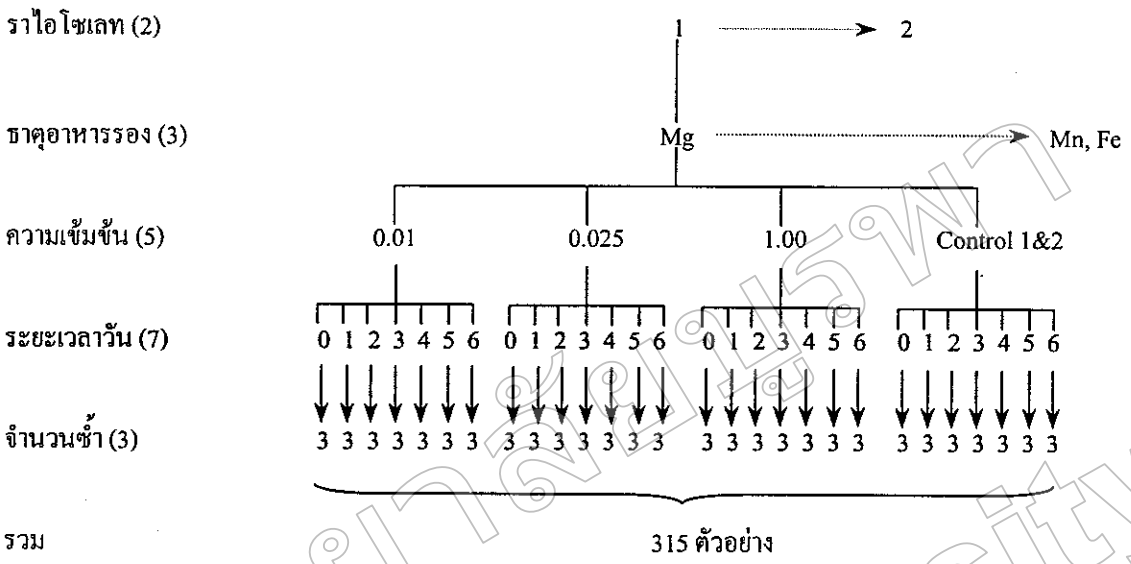
ปัจจัยที่ 2 ธาตุอาหารรอง 3 ระดับได้แก่ แมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส

ปัจจัยที่ 3 ความเข้มข้นของแมกนีเซียม จำนวน 3 ระดับ ได้แก่ 0.01, 0.025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นแมงกานีสและเฟอร์รัส จำนวน 3 ระดับ ได้แก่ 0.05, 0.15 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชุดควบคุม 1 และ 2

ปัจจัยที่ 4 ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงรา 7 วัน ได้แก่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำหรับแผนผังการทดลองแสดงดังภาพที่ 3-5



ภาพที่ 3-5 แผนผังการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส ที่เหมาะสมของรา

2.4. การศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานในอาหาร Starch medium สูตรปรับปรุง

การออกแบบการทดลอง

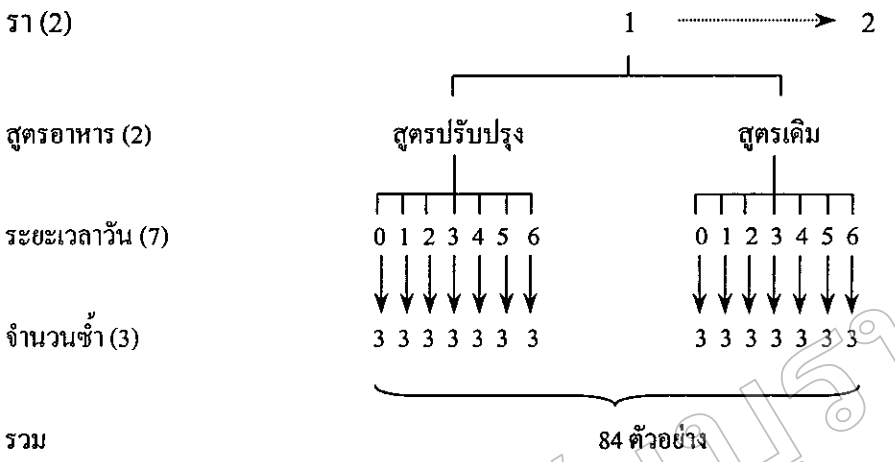
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานในอาหาร Starch medium สูตรปรับปรุง โดยเปรียบเทียบกับอาหาร Starch medium สูตรดั้งเดิม โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ทั้งนี้จะวางแผนการทดลองแบบ Factorial design 2 x 7 จำนวน 3 ซ้ำ ซึ่งประกอบด้วย

ปัจจัยที่ 1 สูตรอาหาร 2 ระดับ ได้แก่ สูตรปรับปรุงและสูตรเดิม

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงรา 7 วัน ได้แก่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน ตามลำดับ

สำหรับแผนผังการทดลองแสดงดังภาพที่ 3-6

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3-6 แผนผังการทดลองเพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานในอาหาร Starch medium สูตรปรับปรุง

วิเคราะห์ผลการทดลอง ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลใน Randomized complete block design (RCBD) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window version 10.5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University