บทที่ 3
วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างพืชสมุนไพร

ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่จะนำมาแยกราเอนโดไฟท์ได้ทำการเก็บจาก 1. ส่วนพฤกษศาสตร์ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ กวาวเครือ (*Butia superba*) เพกา (*Oroxylum indicum* (L.) Vent.) สมอไทย (*Terminalia chebula* Retz.) สมอพิเภก (*Terminalia bellirica* (Gaertn) Roxb.) เหมือดคน (*Heliciopsis terminalis* Sleum.) 2. หน่วยพิทักษ์อุทยานแห่งชาติ ศรีลานนาที่ 5 (แม่ระงอง) อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ กระพี้เขาควาย (*Dalbergia cultrate* Grah. ex benth.) ข้าวสารดอกใหญ่ (*Raphistemma pulchellum* (Rox.) Wall.) ตะแบก (*Lagerstroemia calyculata* Kurz.) มะกอกพราน (*Canarium bengalense* Roxb.) มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* Linn.) ยอป่า (*Morinda elliptica* Ridl.) รางจืดดอกม่วง (*Thunbergia Laurifolia* Linn.) ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria* Linn.) อินทนิลน้ำ (*Legerstroemia speciosa* Pers.) 3. สำนักงานป่าไม้เขตเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ กระแจะ (*Ochna wallichii* Planch.) กำลังเสือโคร่ง (*Betula alnoides* Buch Ham.) กาสามปีก (*Polyalthia cerasoides* (Roxb.) Benth. Bedd.) กำยาน (*Styrax benzoides* Craib.) แข้งกวาง (*Wendlandia tinctoria* A. DC.) คัดลิ้น (*Walsur trichostemon* Miq.) ทับทิม (*Punica granatum* Linn.) เปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) มะกา (*Bridelia ovata* Deone.) มะเม่า (*Antidesma velutimun* Tulas.) ราชาวดีป่า (*Buddieia asiatica* Lour.) อูนป่า (*Viburnum inopinatum* Craib.) (รายละเอียดดู ภาคผนวก ก)

2. การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร

2.1 ทำการเลือกตัวอย่างพืชสมุนไพรโดยเลือกในต้นที่มีใบและกิ่งที่สมบูรณ์ไม่มีการรบกวนหรือถูกเข้าทำลายโดยเชื้อโรคหรือแมลง โดยใบและกิ่งที่เลือกนั้น จะต้องไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป

2.2 ตัดส่วนใบและกิ่งของตัวอย่างพืชสมุนไพร

2.3 รีบนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ หรือถ้ามีความจำเป็นที่ไม่สามารถจะกลับมายังห้องปฏิบัติการได้ในทันที ให้ทำการปิดบริเวณบาดแผลของกิ่งด้วยแผ่นพาราฟิล์มหรือวัสดุอย่างอื่น แล้วเก็บในถุงพลาสติกอีกชั้นหนึ่ง เพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้นของส่วนของพืชตัวอย่าง

3. การแยกฟังไจจากตัวอย่างพืชสมุนไพร

3.1 นำตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ได้มาล้างเอาเศษดิน ฝุ่น และสิ่งสกปรกต่าง ๆ ออกด้วยน้ำสะอาด โดยใช้มือถูเพียงเบา ๆ

3.2 จากนั้นทำการตัดแยกส่วนของตัวอย่างพืชสมุนไพร โดยจะแยกเป็นส่วนของกิ่งโดยทำการตัดเป็นท่อน ๆ ละประมาณ 1 เซนติเมตร เป็นจำนวน 5 ท่อน ในส่วนของใบ ทำการตัดใบในตำแหน่งต่าง ๆ เป็นจำนวน 5 ชิ้น เช่นกัน

3.3 นำส่วนของใบและกิ่งที่ตัดโดยตัวอย่างพืชสมุนไพร 1 ชนิด ตัด 10 ชิ้น แบ่งเป็น จากใบ 5 ชิ้น และ ใบ 5 ชิ้น และเจาะเรียบร้อยแล้วไปทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิว โดยใช้วิธี triple surface sterilization โดย

ก. แช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที

ข. แช่ใน 5.25 %sodium hypo chloride เป็นเวลา 3 นาที

ค. แช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที

3.4 นำมาทำให้แห้งโดยวางลงในจานที่มีกระดาษซับที่ทำการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว เพื่อซับเอาสารละลายในส่วนที่เกินออกไป

3.5 นำไปวางบนอาหาร ME agar ที่มีส่วนผสมของ 0.03% rose bengal และ 0.12% chloramphenicol

3.6 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

3.7 หลังจากที่เชื้อเจริญขึ้นมาแล้ว ให้ทำการแยกเชื้อทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยทำการเขี่ยเชื้อลงในจานอาหารที่มี PDA แล้วแยกเก็บใน PDA slant เพื่อใช้เป็น stock culture

4. การทดสอบความสามารถในการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ของฟังไจบนอาหารแข็ง (plate assay) (Gulati *et al.*, 1997)

4.1 นำตัวอย่างฟังไจทั้งหมดที่แยกได้นั้นจาก stock culture มาทดสอบความสามารถในการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA

4.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.3 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญ บริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แต่ละชนิดจำนวน 2 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหาร modified Czapek dox's agar ที่มี แอล-แอสพาราจีน เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมี phenol red เป็นอินดิเคเตอร์

4.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.5 ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีชมพูที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของฟังไจที่สามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้โดยใช้ไม้โปรแทคเตอร์

5. การทดสอบความสามารถในการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ของฟังไจในอาหารเหลว (nesslerization)

5.1 คัดเลือกฟังไจที่สามารถสร้างวงสีชมพูในการทดสอบความสามารถในการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ของฟังไจบนอาหารแข็ง (plate assay) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุดจำนวน 4 ไอโซเลท คือ LcSlTw1-3 จากส่วนของกิ่งของต้นตะแบก (*Lagerstroemia calyculata* Kurz.), BaRfTw2-4 และ BaRfTw2-5 จากส่วนของกิ่งของต้นราชาวดีป่า (*Buddieia asiatica* Lour.), และ HtQsTw2-9 จากส่วนของกิ่งของต้นเหมือดคน (*Heliciopsis terminalis* Sleum.) จาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร PDA

5.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5.3 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญบริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหาร modified Czapek dox's broth ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

5.4 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

5.5 เมื่อครบกำหนด นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวใสที่เป็น crude enzyme ไปตรวจวัด enzyme activity (ภาคผนวก จ)

5.6 เลือกฟังไจที่สามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้ปริมาณสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

6. การตรวจสอบอนุกรมวิธานของฟังไจที่ผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้สูงสุด

6.1 การตรวจสอบลักษณะการเจริญของฟังไจบนอาหารแข็ง

6.1.1 เตรียมกล้าเชื้อ BaRfTw2-4 จาก stock culture โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

6.1.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6.1.3 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญบริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำมาวางบนอาหารที่ใช้ทดสอบลักษณะการเจริญชนิดต่าง ๆ 4 ชนิด คือ Czapek-dox agar, ME agar, modified Czapek dox's agar, PDA

6.1.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6.1.5 นำมาตรวจสอบดูการเจริญ วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง และลักษณะการกระจายของเชื้อบนอาหารแข็งนั้น ๆ

6.2 การตรวจสอบการสร้างสปอร์ของฟังไจบนอาหารแข็ง

6.2.1 เตรียมกล้าเชื้อ BaRfTw2-4 จาก stock culture โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

6.2.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6.2.3 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญบริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำมาวางบนอาหารที่ใช้ทดสอบลักษณะการเจริญชนิดต่าง ๆ 4 ชนิด คือ Czapek-dox agar, ME agar, modified Czapek dox's agar, PDA จำนวน 2 ชุด

6.2.4 ชุดแรกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ภายใต้สภาวะแสงปกติ

6.2.5 อีกชุดหนึ่ง นำไปไว้ภายในตู้อบเชื้อที่มีหลอด near UV เป็นเวลา 30 วัน

6.2.6 นำอาหารทั้ง 2 ชุด มาตรวจสอบดูการสร้างสปอร์ของเชื้อบนอาหารแข็งนั้น ๆ

7. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ของฟังไจในอาหารเหลว

7.1 การศึกษาหาชนิดของกล้าเชื้อ (seed medium) ที่เหมาะสมในการเตรียมเป็นกล้าเชื้อ

7.1.1 เตรียมกล้าเชื้อ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 จาก stock culture โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

7.1.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.1.3 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญบริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหารที่ใช้เป็น seed medium ชนิดต่าง ๆ คือ Czapek dox's medium, ME broth, PDB, และ pharmamedia โดยใช้อาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

7.1.4 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องและที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.1.5 นำมาตรวจสอบดูการเจริญ น้ำหนักแห้งและการกระจายของเชื้อในอาหารเหลวนั้น ๆ

7.2 การศึกษาหาปริมาณของกล้าเชื้อ (seed medium) ที่เหมาะสมในการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส

7.2.1 เตรียมกล้าเชื้อ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 จาก stock culture โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

7.2.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.2.3 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญบริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหาร PDB ซึ่งใช้เป็น seed medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

7.2.4 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.2.5 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตรต่างๆ กัน คือ 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, และ 3.0 มิลลิลิตร ลงในอาหาร modified Czapek dox's medium ที่ใช้เป็น cultivation

medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

7.2.6 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

7.2.7 เมื่อครบกำหนด นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวใสที่เป็น crude enzyme ไปตรวจวัด enzyme activity (ภาคผนวก จ)

7.2.8 เลือกปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

7.3 การศึกษาหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส

7.3.1 เตรียมกล้าเชื้อ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 จาก stock culture โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

7.3.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.3.3 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญบริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหาร PDB ซึ่งใช้เป็น seed medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

7.3.4 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.3.5 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร modified Czapek dox's medium ที่ใช้เป็น cultivation medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด คือ carboxymethyl cellulose (CMC), galactose, glucose, manitol, soluble starch, sorbitol, และ sucrose โดยเติมในปริมาณ 0.2% (w/v)

7.3.6 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

7.3.7 เมื่อครบกำหนด นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวใสที่เป็น crude enzyme ไปตรวจวัด enzyme activity (ภาคผนวก จ)

7.3.8 เลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

7.4 การศึกษาหาปริมาณของคาร์บอน (กลูโคส) ที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส

7.4.1 เตรียมกล้าเชื้อ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 จาก stock culture โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

7.4.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.4.3 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญบริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหาร PDB ซึ่งใช้เป็น seed medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

7.4.4 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.4.5 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร modified Czapek dox's medium ใช้เป็น cultivation medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยใช้กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0% (w/v)

7.4.6 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

7.4.7 เมื่อครบกำหนด นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวใสที่เป็น crude enzyme ไปตรวจวัด enzyme activity (ภาคผนวก จ)

7.4.8 เลือกปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

7.5 การศึกษาหาปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (แอล-แอสพาราจีน) ที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส

7.5.1 เตรียมกล้าเชื้อ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 จาก stock culture โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

7.5.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.5.3 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญบริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหาร PDB ซึ่งใช้เป็น seed medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

7.5.4 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.5.5 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร modified Czapek dox's medium ที่ใช้เป็น cultivation medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในปริมาตร 0.4% (w/v) เติม แอล-แอสพาราจีน ในปริมาตรต่าง ๆ กันคือ 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0% (w/v)

7.5.6 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

7.5.7 เมื่อครบกำหนด นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวใสที่เป็น crude enzyme ไปตรวจวัด enzyme activity (ภาคผนวก จ)

7.5.8 เลือกปริมาณของ แอล-แอสพาราจีน ที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

7.6 การศึกษาหาค่า พี เอ็ช เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส

7.6.1 เตรียมกล้าเชื้อ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 จาก stock culture โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

7.6.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.6.2 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญบริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหาร PDB ซึ่งใช้เป็น seed medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

7.6.3 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.6.4 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร modified Czapek dox's medium ที่ใช้เป็น cultivation medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในปริมาตร 0.4% (w/v) แล้วเติม แอล-แอสพาราจีน ปริมาตร 0.6 % (w/v) โดยทำการปรับค่า พี เอ็ช ต่าง ๆ กัน คือ 3, 5, 7, 9, และ 11

7.6.5 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

7.6.6 เมื่อครบกำหนด นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวใสที่เป็น crude enzyme ไปตรวจวัด enzyme activity (ภาคผนวก จ)

7.6.7 เลือก พี เอ็ช ที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

7.7 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส

7.7.1 เตรียมกล้าเชื้อ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 จาก stock culture โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

7.7.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.7.3 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญบริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหาร PDB ซึ่งใช้เป็น seed medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

7.7.4 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.7.5 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร modified Czapek dox's medium ที่ใช้เป็น cultivation medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในปริมาตร 0.4% (w/v) เติม แอล-แอสพาราจีน ปริมาตร 0.6 % (w/v) โดยทำการปรับค่า พี เอ็ช เป็น 7

7.7.6 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ ที่อุณหภูมิห้อง, 30, 37, และ 45 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

7.7.7 เมื่อครบกำหนด นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวใสที่เป็น crude enzyme ไปตรวจวัด enzyme activity (ภาคผนวก จ)

7.7.8 คัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ไปใช้ในการทดลองต่อไป

7.8 การศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส

7.8.1 เตรียมกล้าเชื้อ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 จาก stock culture โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

7.8.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.8.3 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญบริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหาร PDB ซึ่งใช้เป็น seed medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

7.8.4 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.8.5 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร modified Czapek dox's medium ที่ใช้เป็น cultivation medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในปริมาตร 0.4% (w/v) แล้วเติม แอล-แอสพาราจีน ปริมาตร 0.6 % (w/v) โดยทำการปรับค่า pH เป็น 7

7.8.6 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 วัน

7.8.7 เมื่อครบกำหนด นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวใสที่เป็น crude enzyme ไปตรวจวัด enzyme activity และ specific activity ของทั้ง แอล-แอสพาราจิเนส และ แอล-กลูตามิเนส (ภาคผนวก จ)

7.8.8 เลือกจำนวนวันที่เหมาะสมต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

8. การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบค่า enzyme activity (IU/ml) และ specific activity (IU/mg) ของ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 กับ *Fusarium* KLICRb9-1

8.1 เตรียมกล้าเชื้อ เตรียมกล้าเชื้อ *Xylaria* sp. BaRfTw2-4 และ *Fusarium* KLICRb9-1 จาก stock culture โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

8.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

8.3 ทำการเจาะโคโลนีของฟังไจที่เจริญบริเวณขอบของโคโลนี โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหาร PDB ซึ่งใช้เป็น seed medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

8.4 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

8.5 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร modified Czapek dox's medium ที่ใช้เป็น cultivation medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในปริมาตร 0.4% (w/v) เติม แอล-แอสพาราจีน ปริมาตร 0.6 % (w/v) โดยทำการปรับค่า pH เป็น 7 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

8.6 เมื่อครบกำหนด นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวใสที่เป็น crude enzyme ไปตรวจวัด enzyme activity และ specific activity ของทั้ง แอล-แอสพาราจิเนส และ แอล-กลูตามิเนส (ภาคผนวก จ)

8.7 เปรียบเทียบค่า enzyme activity และ specific activity ของ *Xylaria* sp. BaRfTw 2-4 กับ *Fusarium* KLICRb9-1