วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา *Xylaria* sp.BL25 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ โดยทำการเก็บเป็น stock culture ในอาหาร PDA slant เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการ subculture ทุกๆ 2 สัปดาห์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้การทดลองมีดังนี้ สำหรับองค์ประกอบและวิธีเตรียมดูจากภาคผนวก

Malt yeast broth (MY)

Minimal salt medium (MM)

Peptone yeast extract glucose medium (PYGM)

Potato dextrose broth (PDB)

Sabouraud dextrose broth (SDB)

Potato dextrose agar (PDA)

3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1 Boric acid buffer ใช้สำหรับการละลาย bovine fibrinogen และ thrombin

3.2 Bovine fibrinogen (Sigma)

3.3 Thrombin (Sigma)

3.4 Ammonium sulfate

3.5 0.2 M phosphate buffer

4. อุปกรณ์และเครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

5. การเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว

นำเส้นใยเห็ดสายพันธุ์ต่างๆ จาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว เจาะเส้นใยราจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเหลว บรรจุอยู่ 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์วางบนเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเส้นใยออกจากอาหาร โดยใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5. การทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์

การเตรียม fibrin plate ดัดแปลงจากวิธีของ Astrup และ Mullertz (1952) ซึ่งสรุปได้ดังนี้ ดูดสารละลาย bovine fibrinogen (0.8% bovine fibrinogen ใน 0.18 M Boric acid buffer) 4 มิลลิลิตร และสารละลาย

thrombin (10 units/ml ใน 0.18 M Boric acid buffer) 2 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จะเกิดการแข็งตัวของไฟบริน

การหากิจกรรมของเอนไซม์ แบ่งพื้นที่บน fibrin plate เป็น 4 ส่วน หนึ่งส่วนเก็บไว้เป็น control อีกสามส่วนหยดส่วนใสที่เก็บไว้จากการทดลองปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในแต่ละส่วน นำ fibrin plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นจากการสลายไฟบริน แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่าของพื้นที่วงกลม

6. **การหาน้ำหนักแห้ง**

นำเส้นใยที่ได้จากการปั่นแยกเอาอาหารเหลวออกไปแล้ว ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำส่วนของเส้นใยใส่ในภาชนะที่อบจนได้น้ำหนักคงที่และทราบค่า นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 18 ชั่วโมง หรือจนได้น้ำหนักคงที่อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำออกจากตู้อบไปวางไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนัก ผลต่างของน้ำหนักที่ได้ทั้งสองครั้งนำมาคำนวณหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ รายงานผลเป็นกรัมต่อลิตร