บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psychrotherm Incubator Shaker) รุ่น innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) รุ่น HA-26 ของบริษัท Hirayama Manufacturing ประเทศญี่ปุ่น

มาตรวัดค่าความเป็นกรด ด่าง (pH meter) รุ่น HI 8424 ของบริษัท Hanna Instruments ประเทศอิตาลี

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic-21 ของบริษัท Bausch&Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ (Evaporator) รุ่น RE 52 เครื่องดูดให้เป็นสูญญากาศ (vacuum aspirator) รุ่น BP-51 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องกำเนิดคลื่นอัลตราโซนิค (Sonicator) ยี่ห้อ Delta รุ่น Ultrasonic Cleaner D 200 ของบริษัท D.S.C. group ประเทศไทย

ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น IN-81 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟฟี (HPLC) รุ่น LC-8A และเครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (Fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300-5L ใบพัดแบบ 6 blade turbine ตัวควบคุมสภาวะ (Bioprocess Controller) รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องอัดอากาศ (Air Compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (Circulation Type) รุ่น TRC-108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

ตู้อบแห้งสุญญากาศ (Vacuum Drying Oven) รุ่น DP-41 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น Vortex-Genie NO.2 ของบริษัท Scientific Industries, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) รุ่น TE-8D ยี่ห้อ Tempette ของบริษัท Techne ประเทศอังกฤษ

เตาอบไมโครเวฟ รุ่น NE-7670 ยี่ห้อ National ประเทศไทย

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรดมะนาวชนิดปราศจากน้ำ	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไอโซซิทริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดทาร์ทาริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดฟอสฟอริก	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
กรดซัลฟิวริก	รวมเคมี	ประเทศไทย
กรดไดไนโทรซาลิไซลิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไฮโดรคลอริก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กากมันสำปะหลัง	ไทยวา	ประเทศไทย
แคลเซียมคาร์บอเนต	ศิลาทิพย์	ประเทศไทย
โซเดียมซัลเฟต	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เพปโทน	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
พี.จี.โอ.เอนไซม์	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เมทานอล	J.T. BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปทาไฮเดรต	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
สารสกัดจากมอลต์	เนสท์เล่	ประเทศไทย
สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ประเทศไทย
ออโท-ไดอะนิซิดีน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แอมโมเนียมคลอไรด์	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

2.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นยีสต์ *Candida oleophila* สายพันธุ์กลาย ได้แก่ NNU-48, U33-13, UN33-24, UNN33-3 ซึ่งทำการกลายพันธุ์โดยสมเกียรติ (2539) และ NN-39 เป็นสายพันธุ์ที่สินีนาถ (2539) ศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากกากมันสำปะหลัง สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

2.3.1 การเก็บรักษาเชื้อ

ถ่ายเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) ลาก (streak) บนอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) สูตรอาหาร YM (ภาคผนวก ก 1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เก็บเชื้อในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

2.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็งลาดเอียงสูตร YM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำที่ขจัดไอออนซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรลงในอาหารแข็งลาดเอียงดังกล่าว ปิเปตต์เซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ(ภาคผนวก ก 1.1) ซึ่งวิธีนี้จะทำให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น วัดโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.05 เลี้ยงหัวเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม (rotary shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที นาน 15 ชั่วโมง

2.3.2.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร

ปิเปตต์หัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.1 ลงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก 2) ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นประมาณ 0.7 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบวงกลมควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

2.3.2.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.1 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาณอาหารเริ่มต้น 2.7 ลิตร ปริมาตรรวมในถังหมักเท่ากับ 3 ลิตร คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นประมาณ 0.7 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมตามภาคผนวก ก 2.7 ควบคุมภาวะในการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตรากวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

2.4 วิธีวิเคราะห์

2.4.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ใช้มาตรวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

2.4.2 การละลายเกลือแคลเซียมซิเทรตในน้ำหมัก (ตามวิธีของ Nakanishi และคณะ, 1972)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งจะต้องทำการละลายเกลือแคลเซียมซิเทรตที่เกิดขึ้นก่อน โดยการทดลองในระดับขวดเขย่าเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 โมลาร์ลงในแต่ละขวดทดลองซึ่งมีน้ำหมักอยู่ 25 มิลลิลิตรจนได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 1.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว ส่วนการทดลองในระดับถังหมัก 5 ลิตร นำน้ำหมักมา 5 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ประมาณ 1.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว

2.4.3 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตต์สารละลายที่ได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนโดยใช้เครื่องกรองอย่างละเอียด (Millipore Filter) และเครื่องสูบสูญญากาศ ล้างเซลล์ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว 50 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองที่มีเซลล์อยู่นี้ไปอบในตู้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์

แล้วนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งหน่วยเป็นกรัมต่อลิตรด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด ส่วนสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองเอาเซลล์ออกแล้ว นำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิทริก และหาน้ำตาลที่เหลือต่อไป

2.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิทริกโดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟฟี (HPLC) (สมศักดิ์, 2537)

ปิเปตต์สารละลายตัวพาปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการกรองในข้อ 2.4.3 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสแอซีเทต ฉีดสารละลายที่เตรียมได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะดังนี้

คอลัมน์	Selectosil 5 C18 ขนาด (I.D.) 4.6 มิลลิลิตร ยาว 25 เซนติเมตร
สารละลายตัวพา	ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH4)_2HPO_4$) 5 กรัมต่อลิตรในน้ำที่ปราศจากไอออน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0 ด้วยกรดฟอสฟอริก (ภาคผนวก ค 1)
สารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน	กรดทาร์ทาริกเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ในน้ำปราศจากไอออน
อุณหภูมิที่ใช้	40 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	คลื่นอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร
ความไวของเครื่องตรวจวัด	0.04 AUFS (absorbtion unit full scale)

โดยใช้สภาวะดังกล่าว เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดมะนาวประมาณ 5.8 นาที และกรดไอโซซิทริกประมาณ 3.6 นาที คำนวณหาปริมาณกรดมะนาว และกรดไอโซซิทริกจากกราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 5.0 กรัมต่อลิตร และกราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิทริกในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 1.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งกราฟมาตรฐานที่ใช้นั้นเป็นกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดมะนาวหรือกรดไอโซซิทริกกับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของกรดต่อสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบใน (ภาคผนวก ง 1 และภาคผนวก ง 2)

2.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีกรดไดไนโทรซาลิไซลิก (ดัดแปลงจากวิธี Bernfeld, 1955)

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโทรซาลิไซลิก 1.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค 2) ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็น 5 นาที เติมน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำที่กำจัดไอออนแล้วและผ่านขั้นตอนข้างต้นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 1.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ง 3)

2.4.6 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ พี.จี.โอ. เอนไซม์ (Huggett and Nixon, 1957)

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย พี.จี.โอ เอนไซม์ (ภาคผนวก ค 3) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ใช้น้ำที่กำจัดไอออนออกแล้วและผ่านขั้นตอนต่างๆเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่างเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยมีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตรจากกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0.0-0.2 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ง 4)

2.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก

อบกระทงอลูมิเนียมฟอยล์ในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ ชั่งและบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ ใส่สารละลายน้ำตาลตัวอย่าง ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ลงในกระทงนำไปอบในตู้อบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ ชั่งหาน้ำหนักแห้งแล้วนำไปหักค่าน้ำหนักของกระทง จะได้ปริมาณของแข็งทั้งหมดในสารละลายน้ำตาล มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร