บทที่2

วิธีการทดลอง

2.1 ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1. ครุภัณฑ์

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัท/ประเทศที่ผลิต
ถังหมักขนาด 5 ลิตร (Fermentor)	Bio FLO IIC	บริษัท New Brunswick Scientific สหรัฐอเมริกา
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm incubator shaker)	G-27	บริษัท New Brunswick Scientific สหรัฐอเมริกา
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	DU 650	บริษัท New Brunswick Scientific สหรัฐอเมริกา
เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave)	HA-30	บริษัทHirayama Manufacturing ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องปั่นแยก (Centrifuge)	J - 21C	บริษัท New Brunswick Scientific สหรัฐอเมริกา
เครื่องผสม (Vortex Mixer)	Vortex-Genie2	บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัท/ประเทศที่ผลิต
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH Meter)	pH-M 83	บริษัท Radiometer ประเทศเดนมาร์ค
ตู้อบ (Oven)	B-80	บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
เครื่องวัดความหนืด(Viscometer)	RVI 230 V	บริษัทBrookfield Synchro-Lectric
กระดาษกรอง	GF/C	ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.2. เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
โซดียมอัลจิเนต	Sigma chemicals
แคลเซียมคลอไรด์	Merck Damstadt
แคลเซียมคาร์บอเนต	Fluca
เฮปเทน	Mallinkordt
โปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต	Farmitatia Carloerba
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	Merck Damstation
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	May&Baker
กลูโคส	Fluca
สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	Merck Damastadt

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
สารสกัดมอลต์ (malt extract)	Difco
เปปโตน (peptone)	Difco
วุ้นผง (agar)	Difco
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรท	BHD Chemicals
($MgSO_4 . 7H_2O$)	
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรท	Merck Damastadt
($MnSO_4.H_2O$)	
โปตัสเซียมโบรไมด์ (KBr)	Farmitalia Carloerba
ซิดริคโมโนไฮเดรท	Sigma Chemicals
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไวด์	Merck Damastadt
โซเดียมเตตระโบเรต	BDH Chemicals
ไทโอยูเรีย	BDH Chemicals
โซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต	May&Baker
พีจีโอ เอนไซม์ (PGO-enzyme)	Sigma Chemicals
เอนไซม์ BAN 240L	Novo Nordisk
เอนไซม์ AMG	Novo Nordisk
สารเอนตี้โฟม (Antifoam A)	Fluca
โอ-ไนอะนิซิดีน (O-dianisidine)	Sigma chemicals
แป้งมันสำปะหลัง	ตราปลามังกร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2. วิธีการทดลอง

2.2.1. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นยีสต์สายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 ซึ่งผ่านการคัดเลือกแล้วจากการศึกษาของเรวดี เลิศไตรรักษ์ (2535)

2.2.2 การเก็บรักษาเชื้อยีสต์

ถ่ายเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้วลาก (streak)ลงบนอาหารแข็งสกัดเอียง (ภาคผนวก ก)บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.3 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อยีสต์

เลี้ยงเชื้อยีสบนอาหารสกัดเอียง (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทำเซลล์แขวนลอยด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร

2.2.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโต (หัวเชื้อ)

ปิเปตสารละลายของเชื้อยีสต์ที่เตรียมได้ในข้อ 3.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญ (ภาคผนวก ก) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

2.2.5 วิธีการตรึงเซลล์ *C. oleophila* C-73

เลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโต ตามข้อ 2.2.3 นาน 15 ชั่วโมง นำมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นแยก ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที แยกส่วนใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง เก็บเซลล์ไว้ทำการตรึงเซลล์ต่อไป

2.2.5.1 วิธีตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (Kuatola *et al.* 1991)

ผสมเซลล์ยีสต์ 4.0 กรัม น้ำหนักแห้งกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ กวนเบาๆตลอดเวลาและตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์ตรึงด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

2.2.5.2 วิธีการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยมีน้ำมันถั่วเหลืองเป็น Oil phase (Rymowicz *et al.*,1993)

ผสมเซลล์ยีสต์ 4.0 กรัม (น้ำหนักแห้ง)กับสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร เทลงในน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 500 มิลลิลิตร อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ทำการกวนจนกระทั่งได้เซลล์ตรึงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 มิลลิลิตร แล้วเทสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว กวนต่อไปประมาณ 1-2 ชั่วโมง ล้างเซลล์ตรึงด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.2.6 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวจากเซลล์อิสระ *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.4 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้มีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 0.7 กรัม(น้ำหนักแห้ง)ต่อลิตร (ปริมาตรร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก) ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. นอก

จากระบุเป็นอย่างอื่น

2.2.7 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง C. *oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายเซลล์ตรึงลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพื่อผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก)เริ่มต้น 3.5 ลิตร โดยใช้เซลล์ตรึง 10 กรัมเม็ดเจลต่อลิตร ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น

2.2.8 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง C. *oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการหมักแบบ Fed-batch fermentation

ถ่ายเซลล์ตรึงลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพื่อผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก)เริ่มต้น 3 ลิตร โดยใช้เซลล์ตรึง 10 กรัมเม็ดเจลต่อลิตร ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ทำการเติมกลูโคสใหม่ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เข้าไปในถังหมักที่ชั่วโมงที่ 48 หลังจากการหมัก

2.2.9 วิธีการวิเคราะห์

2.2.9.1 น้ำหนักแห้ง

ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญที่ผ่านการเพาะเลี้ยง *C. oleophila* C-73 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman แบบGF/C ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนด้วยเครื่องสูบสุญญากาศ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำเซลล์ที่ได้ไปบนกระดาษกรองไปอบด้วยเครื่องไมโครเวฟด้วยความร้อนระดับดีฟรอสเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้หน่วยเป็นกรัมลิตร

2.2.9.2 ละลายเกลือแคลเซียมในน้ำหมัก (Nakanishi *et al.*, 1972)

ก่อนการวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในน้ำหมัก จะต้องนำเอาน้ำหมักที่ต้องการวิเคราะห์มาทำการละลายเกลือแคลเซียมที่เกิดขึ้นในน้ำหมักโดยเติมสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ลงในน้ำหมักจนเกลือแคลเซียมละลายหมด ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0 ปรับปริมาตรเป็น 2 เท่าด้วยน้ำกลั่นและมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0

2.2.9.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน (Pentabromoacetone Method) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Stern (1957)

นำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการละลายเกลือแคลเซียมและกรองผ่านกระดาษกรองแวมาวิเคราะห์หากรดมะนาวตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.2.9.3.1 ขั้นตอนการเปลี่ยนกรดมะนาวเป็นเพนตะโบรโมอะซิโตน

ปิเปตสารละลายที่ผ่านการเจือจางให้เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาเกลียว เติมกรดซัลฟุริคความเข้มข้น 2.0 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโปตัสเซียมโบร์ไมด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ลงไป 5 หยด เติมสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)ลงไป 10 หยด ทันทีเขย่าเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

2.2.9.3.2 ขั้นตอนการสกัดเพนตะโบรโมอะซิโตนด้วยเฮบเทน

นำหลอดทดลองที่เปลี่ยนกรดมะนาวเป็นเพนตะโบรโมอะซิโตนแล้วแช่ลงในอ่างน้ำแข็ง หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในหลอดทดลองจนสารละลายใส ปิเปตเฮปเทนปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ปิดฝา

ให้สนิท สกัดโดยใช้เครื่องผสมนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

2.2.93.3 ขั้นตอนการสกัดด้วยไทโอยูเรีย

ปิเปตส่วนบน (ชั้นเฮปเทน) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียวที่มีสารละลายไทโอยูเรีย (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิทสกัดโดยใช้เครื่องผสมนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

2.2.9.3.4 นำสารละลายชั้นล่าง (ชั้นไทโอยูเรีย) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 430 นาโนเมตร ใช้ไทโอยูเรียเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณกรดมะนาวจากกราฟมาตราฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0-0.2 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค)

2.2.9.4 วิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสโดยวิธีพีจีโอเอนไซม์(Huggett and Nixon, 1957)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้เหมาะสมปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลายพีจีโอเอนไซม์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 425 นาโมเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้จากกราฟมาตราฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0-0.2 กรัมต่อลิตร (ภาค ผนวก ง) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.2.9.5 วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิค โดยวิธีของBernfeld (1957)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้เหมาะสม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิคปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูด

กลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จากกราฟมาตราฐานของน้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.5 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ง)

2.2.9.6. ค่าความเป็นกรด-ด่าง

นำเอาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการหมักในระยะเวลาต่างๆ ไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักโดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

2.2.9.7 ค่าความหนืด

นำเอาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการหมักในระยะเวลาต่างๆ ปริมาตร 30 มิลลิลิตรไปวัดค่าความหนืดของน้ำหมักด้วยเครื่องวัดค่าความหนืด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย