บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

- แป้งมันสำปะหลังตราปลามังกร โรงงานแป้งมันไทยทำ จังหวัดชลบุรี
- กากมันสำปะหลังชนิดแห้งจากบริษัทสำปะหลังพัฒนาจำกัดนำมาบดด้วยเครื่องปั่น

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 อุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น ASTELL บริษัท ASTELL SCIENTIFIC ประเทศอังกฤษ
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ยี่ห้อ LAB - LINE ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องเขย่า (rotary shaker) รุ่น G2-033 & G50 series บริษัท NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น SUPER - MIXER 1291 บริษัท LAB - LINE INSTRUMENTS ประเทศสหรัฐอเมริกา
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ BIBBY รุ่น SBS 30 บริษัท STUART SCIENTIFIC ประเทศอังกฤษ
- เตาไมโครเวฟ ยี่ห้อ Litton "Futura" รุ่น AH 15610.A ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH - meter) ยี่ห้อ Schott รุ่น CG 840 ประเทศเยอรมัน
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ SARTORIUS รุ่น BP 2215 ประเทศเยอรมัน
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี (colony counter) รุ่น CWN - 334 บริษัท GALLENKAMP ประเทศเยอรมัน
- เครื่องวัดความหนืด (viscosimeter) ยี่ห้อ Brookfield รุ่น LVDV-I+ CP Version 4.1 บริษัท Brookfield Eng Labs Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องวัดความหนืด (viscosimeter) ยี่ห้อ Brookfield รุ่น LVDV-II+ Version 3.2 บริษัท Brookfield Eng Labs Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ถังหมักเชื้อ (fermenter) ยี่ห้อ B.Braun รุ่น BIOSTAT® B บริษัท B.Braun Biotech International ประเทศเยอรมัน
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น IEC Multi RF บริษัท Thermo IEC ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ HETTICH รุ่น EBA 12
- เครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) ยี่ห้อ BUCHI รุ่น R-200 บริษัท Buchi Labortechnik AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- ตู้อบแห้ง รุ่น WTB binder ประเทศเยอรมัน
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Jassco V-530
- ชุด Gel Permeation Chromatography (Sephacryl® 200 HR) บริษัท Amersham Phamacia Biotech Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น BVT 123 บริษัท Dryer Instruments, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
- กรดซิตริก	MERCK	เยอรมัน
- กรดซัลฟิวริก	MERCK	เยอรมัน
- กรดบอริก	MERCK	เยอรมัน
- กรดไฮโดรคลอริก	MERCK	เยอรมัน
- กรดอะซิติก	MERCK	เยอรมัน
- กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	FLUKA	สวิตเซอร์แลนด์
- แอมโมเนียมซัลเฟต	UNIVAR	ออสเตรเลีย
- เฟอร์ริกคลอไรด์	MERCK	เยอรมัน
- แคลเซียมคาร์บอเนต	FLUKA	สวิตเซอร์แลนด์
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอตเฟต	UNIVAR	ออสเตรเลีย
- ซิงค์ออกไซด์	UNIVAR	ออสเตรเลีย
- วุ้นผง	DIFCO	อังกฤษ
- เปปโตน	MERCK	เยอรมัน

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
- กลูโคส	Scharlan	สเปน
- ยีสต์เอ็คแทรกซ์	MERCK	เยอรมัน
- มอลต์เอ็คแทรกซ์	DIFCO	อังกฤษ
- คอปเปอร์ซัลเฟต	UNIVAR	ออสเตรเลีย
- โซเดียมคลอไรด์	LAB SCAN	ไอร์แลนด์
- โซเดียมไฮดรอกไซด์	UNIVAR	ออสเตรเลีย
- เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (BAN®™ 480L)	NOVO NORDISH	เดนมาร์ก (ภาคผนวก ค)
- เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (AMG®™ E)	NOVO NORDISH	เดนมาร์ก (ภาคผนวก ค)
- โซเดียมโพแทสเซียมทราเทต	UNIVAR	ออสเตรเลีย
- แอนตี้โฟม (Silicon Antifoaming Agent)	MERCK	เยอรมัน
- แคลเซียมคลอไรด์	MERCK	เยอรมัน
- ฟีนอล	MERCK	เยอรมัน
- โซเดียมคาร์บอเนต	UNIVAR	ออสเตรเลีย
- โบวีน ซีรัม อัลบูมิน	MERCK	เยอรมัน
- เอธานอล 95 เปอร์เซนต์	เมธากรุ๊ป	ประเทศไทย
- โซเดียมอะซิเตท	Carlo Erba	อิตาลี
- เดกซแทรนมาตรฐาน (standard dextran)	FLUKA	สวิตเซอร์แลนด์

3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Xanthomonas campestris* TISTR 840 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.4 การเก็บรักษาเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการทดลองทำได้โดยถ่ายเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ลงในหลอดอาหารแข็งลาดเอียงสูตร Yeast Malt Extract (YM) (ภาคผนวก ก 2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น หัวเชื้อตั้งต้นในการทดลองโดยทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 14 วัน

3.5 การเตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยกากมันหรือแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

3.5.1 การเตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

3.5.1.1 การเตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เตรียมแหล่งคาร์บอนโดยการเตรียมกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ดัดแปลงวิธีจากกล้าณรงค์ ศรีรอต และคณะ, 2540) ในโซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.8 นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำผสมกากมันสำปะหลังและเติมแคลเซียมคลอไรด์ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อน้ำผสมกากมันสำปะหลัง 1 ลิตร นำน้ำผสม กากมันสำปะหลังกวนให้เข้ากันโดยใช้ใบพัดที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที 30 นาที และ 60 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที

3.5.1.2 การเตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับกลูโคอะไมเลส

เตรียมแหล่งคาร์บอนจากกากมันสำปะหลังเช่นเดียวกับวิธีข้างต้นโดยย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.1-4.3 ด้วยกรดอะซิติก นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 1 เปอร์เซนต์ของปริมาตรน้ำผสมกากมันสำปะหลัง และกวนให้เข้ากันโดยใช้ใบพัดที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที และทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว แล้วนำไฮโดรไลเซทจากการย่อยกากมันสำปะหลังทั้ง 4 แบบมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการกรอง และเก็บตัวอย่างมาวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้สารละลาย 3,5 Dinitrosalicylic acid (DNSA) (Robyt and Whelan, 1965) (*ภาคผนวก ข 1*), ปริมาณ Total carbohydrate ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric Reagent (Dobois et al., 1956) (*ภาคผนวก ข 2*) และหาค่า DE ของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ก่อนนำไปเก็บในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ –5 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ ธันยาภรณ์ นาวินวรรณ (2542) ที่ได้ปรับปรุงจาก Roseiro et al. (1992) (*ภาคผนวก ก 3*)

3.5.2 การเตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

3.5.2.1 การเตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เตรียมแหล่งคาร์บอนจากแป้งมันสำปะหลังโดยย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 15, 30, 60 นาที เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.5.1.1

3.5.2.2 การเตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับกลูโคอะไมเลส

เตรียมแหล่งคาร์บอนจากแป้งมันสำปะหลังโดยย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 60 นาที ต่อด้วยกลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 120 นาทีเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.5.1.2 และทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว แล้วนำไฮโดรไลเซทจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังทั้ง 4 แบบมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการกรอง และเก็บตัวอย่างมาวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้สารละลาย 3,5 Dinitrosalicylic acid (DNSA) (Robyt and Whelan, 1965) (ภาคผนวก ข 1), ปริมาณ Total carbohydrate ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric Reagent (Dobois et al., 1956) (ภาคผนวก ข 2) และหาค่า DE ของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ก่อนนำไปเก็บในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -5 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ ธันยาภรณ์ นาวินวรรณ (2542) ที่ได้ปรับปรุงจาก Roseiro et al. (1992) (ภาคผนวก ก 3)

3.6 ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันต่อการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

3.6.1 ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกากมันหรือแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์โดยใช้วิธี Gel Permeation Chromatrography

นำไฮโดรไลเซทจากข้อ 3.5 มาทำการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธี Gel Permeation Chromatrography ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด Sephacryl® 200 HR และใช้สารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.8 เป็นสารละลายตัวพา ฉีดไฮโดรไลเซทเข้มข้นในช่วง 3-6 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 15 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ไหลผ่านคอลัมน์ออกมาทุก ๆ 2 มิลลิลิตรมาทำการตรวจหาปริมาณ total carbohydrate (Dobois et al., 1956) (ภาคผนวก ข 2) เทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากสมการ

$$y = -1234.9x + 116635$$

ซึ่งหาได้จากการใช้สารเดกซแทรนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข 7) และหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของไฮโดรไลเซทได้จากปริมาณคาร์โบไฮเดรตสะสมที่ 0.5 (ภาคผนวก ข 7) โดยปริมาณสะสมของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดหาได้จากพื้นที่ใต้กราฟหรือปริมาณ total carbohydrate ของแต่ละปริมาตรที่ออกมาจากคอลัมน์หารด้วยพื้นที่ทั้งหมดหรือปริมาณ total carbohydrate ทุกปริมาตรรวมกัน แล้วนำมาบวกกันโดยเรียงลำดับตามเวลาที่ไหลออกมา

3.6.2 ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันต่อการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

3.6.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

ถ่ายเชื้อ 1 loop จากข้อ 3.4 ลงอาหารเหลวสูตร YM (ภาคผนวก ก 1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซนต์โดยปริมาตรลงในอาหารเหลวสูตร YM (ภาคผนวก ก 1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรขวดใหม่อีกครั้งหนึ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อโดยใช้อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตแซนแทนกัม

3.6.2.2 แหล่งคาร์บอนที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันต่อการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

เลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 โดยใช้หัวเชื้อจากข้อ 3.6.2.1 ปริมาณ 10 เปอร์เซนต์โดยปริมาตรหัวเชื้อต่อปริมาตรน้ำหมัก เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของธันยาภรณ์ นาวินวรรณ (2542) ที่ได้ปรับปรุงจาก Roseiro et al. (1992) (ภาคผนวก ก 3) ใช้แหล่งคาร์บอนซึ่งเลือกได้จากข้อ 3.5 มา 6 น้ำหนักโมเลกุล เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับกลูโคสบริสุทธิ์ ใช้อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ติดตามการเจริญของเชื้อโดยหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักโดยวิธี DNSA (ภาคผนวก ข 1) และ ปริมาณของแซนแทนกัม (ภาคผนวก ข 6) เมื่อสิ้นสุดการหมัก

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ ความแตกต่างโดยวิธี Duncan ' s new multiple range test

3.7 ศึกษาการผลิตแซนแทนกัมแบบต่อเนื่องของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.7.1 ผลของอัตราการเจือจางต่อการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

เลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 โดยใช้หัวเชื้อจากข้อ 3.6.2.1 ปริมาณ 10 เปอร์เซนต์โดยปริมาตรหัวเชื้อต่อปริมาตรน้ำหมัก เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ ธันยาภรณ์ นาวินวรรณ (2542) ที่ได้ปรับปรุงจาก Roseiro et al. (1992) (ภาคผนวก ก 3) ปริมาตร 2 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.6.2.2 มีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเริ่มทำการป้อนอาหารใหม่เข้าไปในถังหมักด้วยอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.06 ชั่วโมง$^{-1}$ และดึงน้ำหมักในถังหมักออกด้วยอัตราการเจือจางที่เท่ากัน

ติดตามการเจริญของเชื้อโดยหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักโดยวิธี DNSA (ภาคผนวก ข 1) และ ปริมาณของแซนแทนกัม (ภาคผนวก ข 6) สิ้นสุดการหมักเมื่อปริมาณเซลล์, ปริมาณแซนแทนกัม และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักมีค่าคงที่

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ ความแตกต่างโดยวิธี Duncan ' s new multiple range test

3.7.2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

เลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 โดยใช้หัวเชื้อจากข้อ 3.6.2.1 ปริมาณ 10 เปอร์เซนต์โดยปริมาตรหัวเชื้อต่อปริมาตรน้ำหมัก เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ ธันยาภรณ์ นาวินวรรณ (2542) ที่ได้ปรับปรุงจาก Roseiro et al. (1992) (ภาคผนวก ก 3) ปริมาตร 2 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.6.2.2 มีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเริ่มทำการป้อนอาหารใหม่เข้าไปในถังหมักด้วยอัตราการเจือจางที่เหมาะสมซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.7.1 ที่อุณหภูมิ 27, 30 และ 33 องศาเซลเซียส

ติดตามการเจริญของเชื้อโดยหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักโดยวิธี DNSA (ภาคผนวก ข 1) และ ปริมาณของแซนแทนกัม (ภาคผนวก ข 6) สิ้น

สุดการหมักเมื่อปริมาณเซลล์, ปริมาณแซนแทนกัม และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักมีค่าคงที่

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ ความแตกต่างโดยวิธี Duncan ' s new multiple range test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย