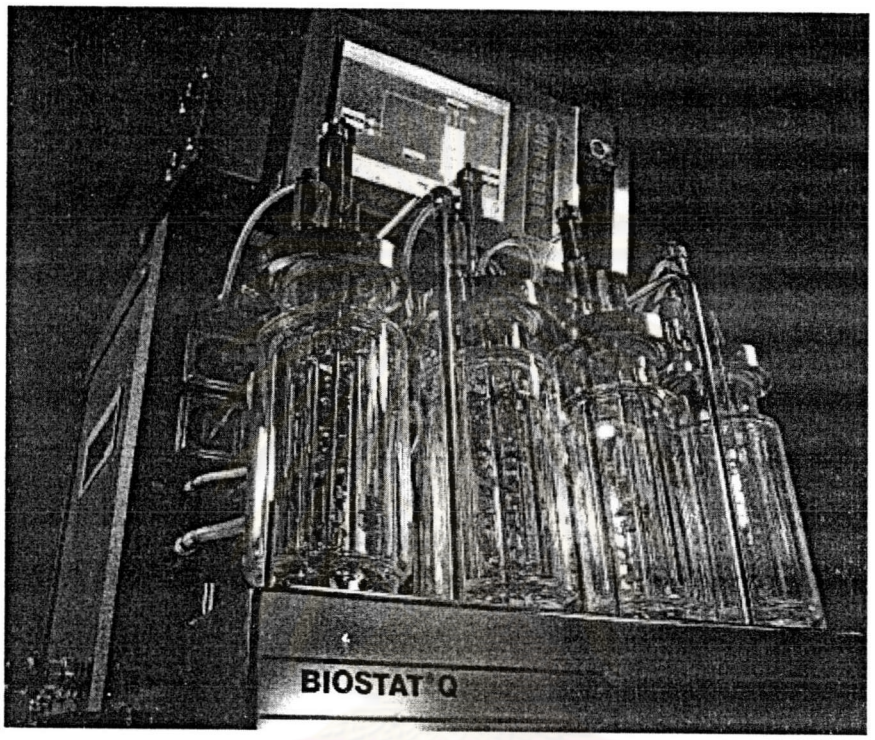
บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ วิธีและขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-S และ รุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น Cyberscan 1000 และ รุ่น Cyberscan 2000 บริษัท Eutech Cybernetics, สิงคโปร์, รุ่น Professional Meter PP-50 บริษัท Sartorius AG Göttingen, เยอรมันนี
3. เครื่องกวนแม่เหล็ก รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, U.S.A
4. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co, Ltd., ญี่ปุ่น, รุ่น MLS-3020 บริษัท Sanyo Electrics, ญี่ปุ่น และ รุ่น AMA240 บริษัท Astell Scientific, อังกฤษ
5. ฮีมาไซโทมิเตอร์ ของบริษัท Schott Duran, เยอรมันนี
6. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, ญี่ปุ่น
7. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Larminar flow รุ่น HS-124 บริษัท ISSCO, สหรัฐอเมริกา
8. เครื่องเขย่า รุ่น G-10, รุ่น G-2100 และรุ่น G-2300 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., สหรัฐอเมริกา
9. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น G-27 และ รุ่น innova 4300 บริษัท New Brunswick Scientific, สหรัฐอเมริกา, รุ่น Gyromax 707R และ รุ่น Gyromax 737 บริษัท Amerex Instruments, Inc., สหรัฐอเมริกา
10. เครื่องผสมสาร รุ่น vortex-genies 2 G560E บริษัท Scientific Industries Inc., สหรัฐอเมริกา
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Temppet บริษัท T-80 Tokyo Rikakikai, ญี่ปุ่น และ รุ่น W 760 บริษัท Memmert, เยอรมันนี
12. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง รุ่น 4001/4 บริษัท Thermo Spectronic, สหรัฐอเมริกา และรุ่น Spectronic 401 บริษัท Milton Roy, สหรัฐอเมริกา
13. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง รุ่น FS 4000 บริษัท Decan Ultrasonic, อังกฤษ
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น Avanti Centrifuge J-30I บริษัท Beckman, เยอรมันนี
15. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น 2-21 Beckman, สหรัฐอเมริกา
16. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 100, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, ฝรั่งเศส
17. เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน บริษัท Gerhardt, เยอรมันนี

18. ถังหมัก รุ่น Biostat Q, บริษัท B. Braun, เยอรมันนี ประกอบติดด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดออกซิเจนละลายน้ำ (DO Sensor) รุ่น InPro 6900 Series บริษัท Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์ และ อุปกรณ์ตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในถังหมัก (pH-Electrode) รุ่น InPro 3030 บริษัท Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์ (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 ถังหมักรุ่น Biostat Q, บริษัท B. Braun, เยอรมันนี ซึ่งประกอบติดด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดออกซิเจนละลายน้ำ และอุปกรณ์ตรวจวัดความเป็นกรด-ด่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เคมีภัณฑ์

1. เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (industrial grade dextran) จากเชื้อรา *Penicillium* sp. น้ำหนักโมเลกุล 5-40 x10^6 บริษัท Sigma Chemical, สหรัฐอเมริกา
2. เดกซ์แทรนที-2000 น้ำหนักโมเลกุล 2 x10^6 บริษัท Amersham Biosciences, สวีเดน
3. เอทานอล (C_2H_5OH) กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย
4. กรดไตรคลอโรอะซิติก (CCl_3COOH) บริษัท Merck, เยอรมันนี
5. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, เยอรมันนี
6. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Carlo Erba Regenti, อิตาลี
7. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo Erba Regenti, อิตาลี
8. เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Unilab, สหรัฐอเมริกา
9. ทวีน 80 (Tween 80) บริษัท Fluka, เยอรมันนี
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, เยอรมันนี
11. กรดเกลือ (HCl) บริษัท J.T. Baker, สหรัฐอเมริกา
12. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
13. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) บริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
14. ทริปโตน (Tryptone) บริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
15. พอลิเปปโทน บริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
16. กากถั่วเหลืองป่นละเอียด
17. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)บริษัท Unilab, สหรัฐอเมริกา
18. แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3)บริษัท Fluka, เยอรมันนี
19. โซเดียมไนเทรต ($NaNO_3$) บริษัท Fluka, เยอรมันนี
20. โพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) บริษัท May & Baker, อังกฤษ
21. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) บริษัท Merck, เยอรมันนี
22. ซีลีเนียม (Se) บริษัท Fluka, สิงคโปร์
23. กรดบอริก (H_3BO_3)บริษัท Merck, เยอรมันนี
24. เมทธิลเรดอินดิเคเตอร์ (C.I. 13020) บริษัท Merck, เยอรมันนี
25. เมทธิลลีนบลู ($C_{16}H_{18}ClN_3S$)บริษัท Fluka, สิงคโปร์
26. เมทธิลออเรนจ์ [$(CH_3)NC_6H_4N{:}NC_6H_4SO_3Na$]
27. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) บริษัท Merck, เยอรมันนี

28. โบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน (bovine serum albumin) บริษัท Sigma Chemicals, สหรัฐอเมริกา
29. กลูโคสโมโนไฮเดรต ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) บริษัท Merck, เยอรมันนี
30. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) บริษัท Merck, เยอรมันนี
31. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$)บริษัท Merck, เยอรมันนี
32. ไดโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)บริษัท Merck, เยอรมันนี
33. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)บริษัท Merck, เยอรมันนี
34. โซเดียมอะซิเนต ($Na_2HAsO_4 \cdot 5H_2O$) บริษัท Ajax Chemicals, ออสเตรเลีย
35. แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_2MoO_4 \cdot 5H_2O$) บริษัท May & Baker, อังกฤษ
36. โฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin-Ciocalteu's phenol) บริษัท Merck, เยอรมันนี
37. ฟีนอล (Phenol) บริษัท Merck, เยอรมันนี
38. น้ำกลั่น (distilled water)
39. แก๊สออกซิเจน บริษัท ไทยอินดัสเตรียล แก๊ส จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย
40. แก๊สไนโตรเจน บริษัท ไทยอินดัสเตรียล แก๊ส จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่นๆเป็นเคมีภัณฑ์เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade) จากบริษัทต่างๆ ซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การเก็บและเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Penicillium sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เป็นเชื้อที่ได้รับการกลายสายพันธุ์ เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส โดย สุวรรณา นพพรพันธ์ (2538) จากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่คัดแยกโดย เอก แสงวิเชียร (2531)

3.3.1.2 อาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อตั้งต้นในการผลิตเดกซ์แทรนเนสระดับขวดเขย่า

เลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารสูตรปรับปรุงจาก Fukumoto สูตรปรับปรุง (เอก แสงวิเชียร, 2531) (ภาคผนวก ก)

3.3.1.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

- การเก็บรักษาระยะสั้น

ลากสปอร์ของเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ลงบนอาหารแข็งเอียงตามข้อ 3.3.1.2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จนสปอร์เจริญเต็มที่แล้ว เททับอาหารแข็งเอียงด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 15% (โดยปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ทุก 3 เดือน

- การเก็บรักษาระยะยาว

เขี่ยสปอร์และเลี้ยงเชื้อตามวิธีตามข้อ 3.3.1.4 แล้วจึงนำมาขูดสปอร์ออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อโดยใช้โดยใช้ทวีน 80 0.05% (โดยปริมาตร) ที่ฆ่าเชื้อแล้วเพื่อละลายสปอร์ จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยออกมากรองผ่านชุดกรองสปอร์ (ภาคผนวก ง) เพื่อกำจัดสายใย และนำสปอร์ที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป จากนั้นแขวนลอยสปอร์ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 30% (โดยปริมาตร) ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

นำสปอร์จากการเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.3.1.4 มาทำการระเหิดแห้ง (lyophilization) และเก็บเชื้อในรูปสปอร์แห้ง โดยใช้บริการของหน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

3.3.1.4 การเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ตั้งต้นเพื่อผลิตสปอร์

เขี่ยสปอร์ของเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ลงบนอาหารแข็งเอียงตามข้อ 3.3.1.2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จนสปอร์เจริญเต็มที่แล้ว นำไปใช้เป็นสปอร์ตั้งต้นในการผลิตเดกซ์แทรนเนส ควรใช้สปอร์ที่ได้ในทันที โดยไม่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ เพื่อคงความสามารถสูงสุดของเชื้อราในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

3.3.1.5 การเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ในระดับขวดเขย่า

ขูดสปอร์ของเชื้อราที่ได้จากข้อ 3.3.1.4 ออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อโดยใช้โดยใช้ทวีน 80 0.1% (โดยปริมาตร) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว (ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) เพื่อละลายสปอร์ ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาแขวนลอยในทวีน 80 นับสปอร์ให้ได้ความเข้มข้น 2 x 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโทมิเตอร์ ถ่ายสปอร์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ลงในในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ Fukumoto สูตรปรับปรุง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างมาแล้ว ทำการเลี้ยงเชื้อโดยแปรผันความเร็วรอบในการเขย่า อุณหภูมิ ตามภาวะที่ใช้ในการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ

3.3.2 <u>วิธีการวิเคราะห์</u>

3.3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนโดยวิธีตกตะกอน (ปรับปรุงจาก Sarkar และ Day, 1986)

นำตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัดมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนการวิเคราะห์ โดยใช้เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม 1% (โดยน้ำหนัก) เป็นตัวควบคุมเชิงบวกและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมเชิงลบ ปิเปตตัวอย่างหรือตัวควบคุมลงไปในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมเอธานอล 95% (โดยน้ำหนัก) ลงไป 75 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก 10% (โดยน้ำหนัก) ลงไป 10 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งข้ามคืนประมาณ 16 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อตกตะกอน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรวบรวมตะกอน ทิ้งส่วนน้ำใสออกจนหมด ละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร โดยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman หมายเลข 1 โดยเก็บส่วนน้ำใสไว้แล้วตกตะกอนเอธานอลซ้ำอีก 2 รอบตาม

วิธีดังกล่าว แล้วจึงเก็บตะกอนเพื่อชั่งน้ำหนัก วิธีการนี้มีค่าสัมประสิทธิ์การแปรผันจากการทดลองเท่ากับ 0.0208

3.3.2.2 การวิเคราะห์การเจริญของเซลล์

โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ดูดตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ได้จากข้อ 3.3.1.5 (หรือ 5 มล. จากถังหมัก) นำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman หมายเลข 1 เพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ล้างเซลล์ที่กรองได้ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เซลล์ที่ได้ นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักแห้งและคำนวณน้ำหนักแห้งของเซลล์ ส่วนน้ำหมักที่ถูกกรองแยกออกจากเซลล์นำไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีและโปรตีนต่อไป วิธีการนี้มีค่าสัมประสิทธิ์การแปรผันจากการทดลองเท่ากับ 0.0170

3.3.2.3 การตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส (Fukumoto และคณะ, 1971)

นำส่วนผสมของปฏิกิริยา 0.9 มิลลิลิตร (ประกอบด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลต่อลิตร ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับเดกซ์แทรน ที-2000 0.625% (โดยน้ำหนัก) ละลายในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 4.5 ซึ่งเป็นสับสเทรตปริมาตร 0.4 มล.) โดยเติมตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร (ที่เจือจางด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (ภาคผนวก ข) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างมาต้มในน้ำเดือด 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา ทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายเนลสัน (Nelson reagent) (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งเอาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสความเข้มข้น 0 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) ตามวิธีข้อ 3.3.2.4 วิธีการนี้มีค่าสัมประสิทธิ์การแปรผันจากการทดลองเท่ากับ 0.0038

1 หน่วย (Unit) ของเดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเดกซ์แทรนที-2000 แล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

3.3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นเติมสารละลายเนลสัน (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งเอาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และทำการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ใช้ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) วิธีการนี้มีค่าสัมประสิทธิ์การแปรผันจากการทดลองเท่ากับ 0.0005

3.3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จึงเติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข) 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนที่ได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้โบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค.) วิธีการนี้มีค่าสัมประสิทธิ์การแปรผันจากการทดลองเท่ากับ 0.0019

คำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะ ทำโดยนำค่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) หารด้วยปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่าแอคติวิตีจำเพาะมีหน่วยเป็น หน่วย (Unit) ของเดกซ์แทรนเนสต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.3.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen)

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) โดยวิธี Kjeldahl (Bremner, 1970)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 0.10 กรัม (สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อทริปโทน พอลิเปปโทน และกากถั่วเหลืองป่น) เทลงในขวด Kjeldahl flask แล้วชั่งส่วนผสมของสารเร่งปฏิกิริยา (ภาคผนวก ข) 0.60 กรัม แล้วเติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไป เขย่าผสมกันเบาๆแล้วนำไปย่อยด้วยความร้อนจนได้สารสะลายใสไม่มีสี (ประมาณ 45 -60 นาที) ตั้งทิ้งจนเย็น

ลง หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 20 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน หลังจากนั้นทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายที่ผสมดังกล่าวมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดกลั่น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลต่อลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นตามลงไป 150 มิลลิลิตร แล้วนำไปกลั่นต่อบนชุดต้มกลั่น Kjeldahl โดยใช้ขวดรูปชมพู่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสารละลายกรดบอริก 2% (ภาคผนวก ข) 10 มิลลิลิตร และสารละลายอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข) 2-3 หยด เป็นภาชนะรองรับของเหลวที่ควบแน่นออกมาจากชุดกลั่น ทำการกลั่นจนได้ของเหลวปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำของเหลวที่กลั่นได้ไปไทเทรตด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น 0.01 นอร์มัล (ภาคผนวก ข) โดยสังเกตสีจุดยุติของสารละลายที่เปลี่ยนจากเขียวไปเป็นม่วงอ่อน บันทึกปริมาตรของกรดที่ใช้เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน

การคำนวณปริมาณไนโตรเจน

$$\text{ไนโตรเจน (\%)} = \frac{(V_1 - V_2)\, N \times 0.014 \times 100 \times D}{W}$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดกำมะถันที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรของกรดกำมะถันที่ใช้ในการไทเทรต Blank (มิลลิลิตร)

N = นอร์มัลลิตี (Normality) ของกรดกำมะถันที่ใช้

D = ค่าความเจือจาง (ในการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ 5)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

Blank คือน้ำกลั่นปลอดประจุ 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Kjeldahl flask แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกันกับตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3 การปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14

3.3.3.1 ศึกษาปริมาณเดกซ์แทรนที่เจือปนในกากน้ำตาลจากโรงงานน้ำตาลอ้อย

นำกากน้ำตาลจากอ้อยแต่ละแหล่ง (กาญจนบุรี สิงห์บุรี และนครปฐม) เจือจางด้วยน้ำกลั่น 20 เท่า (5% โดยปริมาตร) เพื่อลดความหนืดจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman หมายเลข 1 เพื่อกำจัดกากที่ไม่ต้องการออกไป จากนั้นนำส่วนที่กรองแล้วมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาทีเพื่อแยกเอาตะกอนขนาดเล็กออกไป นำส่วนน้ำที่แยกออกมาได้ 25 มิลลิลิตร ผสมกับเอธานอล 75 มล. และกรดไทรคลอโรอะซิติกร้อยละ 10 (โดยน้ำหนัก) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อรวบรวมตะกอนและทิ้งส่วนน้ำใส ชั่งน้ำหนักตะกอนเดกซ์แทรนที่ได้ เพื่อคำนวณหาปริมาณเดกซ์แทรนที่เจือปนในกากน้ำตาลจากอ้อยเปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่เป็นเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมร้อยละ 1 (โดยน้ำหนัก)

3.3.3.2 ศึกษาหาแหล่งของกากน้ำตาลจากอ้อยที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนส

นำตัวอย่างกากน้ำตาลจากอ้อย นำมาวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนที่มีอยู่ตามวิธีการข้อ 3.3.3.1 ทำการเจือจางกากน้ำตาลจากอ้อยทุกแหล่งด้วยความเข้มข้นเดียวกันคือ 1% (โดยปริมาตร) จากนั้นปรับปริมาณเดกซ์แทรนในทุกแหล่งให้เท่ากันหมดคือ 1% (โดยน้ำหนัก) ด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม จากนั้นเติมส่วนประกอบอื่นๆตามสูตรอาหาร Fukumoto สูตรปรับปรุง (ภาคผนวก ก) เลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที และ อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีเดกซ์แทรนเนส และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

3.3.3.3 ศึกษาหาการเจือจางกากน้ำตาลอ้อยที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนส

นำแหล่งกากน้ำตาลจากอ้อยที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.2 ทำการแปรผันการเจือจางเป็น 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 5% และ 10% (โดยปริมาตร) ตามลำดับ จากนั้นเติมส่วนประกอบอื่นๆตามอาหาร Fukumoto สูตรปรับปรุง (ภาคผนวก ก) ปรับปริมาณเดกซ์แทรนสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับร้อยละ 1.0 (โดยน้ำหนัก) ด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม เลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบการเขย่า

200 รอบต่อนาที และ อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

3.3.3.4 ศึกษาหาปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ในอาหาร Fukumoto สูตรปรับปรุง (ภาคผนวก ก) ที่มีการเสริมกากน้ำตาลจากอ้อยปริมาณที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.3.3 ที่มีการแปรผันปริมาณเดกซ์แทรนสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.5%, 0.75%, 1.0%, 1.25% และ 1.50% (โดยน้ำหนัก) ด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม เลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์แทรนเนส และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

3.3.3.5 การศึกษาความสำคัญของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14

เลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ในอาหารที่มีไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2% (โดยน้ำหนัก), โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.05% (โดยน้ำหนัก), แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05% (โดยน้ำหนัก) และ เฟอร์รัสซัลเฟต 0.0009% (โดยน้ำหนัก) ที่มีการเจือจางกากน้ำตาลปริมาตรที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.3.3 โดยทำการทดลองแบ่งออกเป็น 4 ชุด ดังนี้คือ ชุดที่ 1 ปรับด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมจนมีปริมาณ 1% (โดยน้ำหนัก) และมีการเติมแหล่งไนโตรเจน (สารสกัดจากยีสต์ 0.2% (โดยน้ำหนัก) และ $NaNO_3$ 0.2 % (โดยน้ำหนัก) ชุดที่ 2 มีการเติมแหล่งไนโตรเจน (สารสกัดจากยีสต์ 0.2% (โดยน้ำหนัก) และ $NaNO_3$ 0.2 % (โดยน้ำหนัก) ชุดที่ 3 ปรับด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมจนมีปริมาณ 1% (โดยน้ำหนัก) เพียงอย่างเดียว และชุดที่ 4 ไม่มีการปรับปริมาณเดกซ์แทรนและไม่เสริมแหล่งไนโตรเจนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที และ อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีเดกซ์แทรนเนส

3.3.3.6 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14

เลี้ยงเชื้อโดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนชนิดไนโตรเจนอินทรีย์ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์, สารสกัดจากเนื้อ, พอลิเปปโทน, ทริปโทน และ กากถั่วเหลืองป่น ชนิดไนโตรเจนอนินทรีย์ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเทรต, โซเดียมไนเทรต และ โพแทสเซียมไนเทรต เมื่อใช้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากันคือ 0.05373% (โดยน้ำหนัก) เลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบการเขย่า 200

รอบต่อนาที และ อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์แทรนเนส

3.3.3.7 การศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

จากการทดลองข้อ 3.3.3.6 เมื่อได้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดแหล่งละ 1 อย่างเพื่อนำมาใช้สำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนสแล้ว จึงทดลองหาปริมาณการใช้และการผสมที่เหมาะสม โดยเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ตามอาหารสูตร Fukumoto สูตรปรับปรุง (เอก แสงวิเชียร, 2531) แต่แปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์และโซเดียมไนเทรตเริ่มต้นเป็นดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์เริ่มต้น

ปริมาณแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (%) *	ปริมาณแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (%) *				
	0 (0 กรัม/ลิตร)	25 (0.134 กรัม/ลิตร)	50 (0.269 กรัม/ลิตร)	75 (0.403 กรัม/ลิตร)	100 (0.537 กรัม/ลิตร)
0 (0 กรัม/ลิตร)	0:0	0:25	0:50	0:75	0:100
25 (0.134 กรัม/ลิตร)	25:0	25:25	25:50	25:75	25:100
50 (0.269 กรัม/ลิตร)	50:0	50:25	50:50	50:75	50:100
75 (0.403 กรัม/ลิตร)	75:0	75:25	75:50	75:75	75:100
100 (0.537 กรัม/ลิตร)	100:0	100:25	100:50	100:75	100:100

* หมายเหตุ : % ของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดเมื่อเทียบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (100% ไนโตรเจนมีค่าเท่ากับ 0.537 กรัม/ลิตร)

เลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที และ อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

3.3.3.8 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14

จากอาหารสูตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.7 ทำการแปรผันปริมาณสัดส่วนเป็น 0.25, 0.5, 1, 2 และ 4 เท่าตามลำดับ เลี้ยงเชื้อความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที และ อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

3.3.3.9 ศึกษาการศึกษาหาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ในอาหารสูตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.8 มาทำการแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเริ่มต้นเป็น 0, 0.025, 0.050, 0.075 และ 0.010% (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที และ อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส

3.3.3.10 การศึกษาหาปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ในอาหารสูตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.9 มาทำการแปรผันปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟตเริ่มต้นเป็น 0, 0.00025, 0.00050, 0.00075 และ 0.00100% (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที และ อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส

3.3.3.11 ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

3.3.3.11.1 การศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

โดยนำเชื้อรามาเลี้ยงในอาหารสูตรที่ได้จากข้อ 3.3.3.10 มาทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3.0-8.0 แล้วทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28-32

องศาเซลเซียส) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ใช้สปอร์ตั้งต้นตามหัวข้อ 3.3.1.5 แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

3.3.3.11.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เมื่อทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.10 และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจาก 3.3.3.11.1 แล้ว มาทำการแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อโดย ทำการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอุณหภูมิเป็น 25, 30, 37, 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ที่มีความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ใช้สปอร์ตั้งต้นตามหัวข้อ 3.3.1.5 แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

3.3.3.11.3 การศึกษาอัตราความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเดกซ์แทรนเนสในสูตรอาหารที่เหมาะสม และภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.11.2 โดยทำการแปรผันความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที ใช้สปอร์ตั้งต้นตามหัวข้อ 3.3.1.5 แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

3.3.3.12 การศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14

จากสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.10 และภาวะต่างๆทางกายภาพที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.11 ทำการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อ หาระยะเวลา (วัน) ที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เพื่อผลิตเดกซ์แทรนเนส เลือกจากช่วงกลางของการเจริญแบบทวีคูณของเชื้อ (mid-log phase) โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักตั้งแต่วันที่ 0-10 ใช้สปอร์ตั้งต้นตามหัวข้อ 3.3.1.5 แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ปริมาณโปรตีน การเจริญของเชื้อ และการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง

3.3.4 การศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสในระดับขยายขนาดในถังหมัก (ถังหมักรุ่น Biostat Q, บริษัท B Braun, เยอรมันนี)

3.3.4.1 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนสในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยมีปริมาตรการหมัก 0.5 ลิตร

หลังจากที่ได้ข้อมูลรูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงใหม่ และระยะเวลาช่วงกลางของระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณแล้ว คือชั่วโมงที่ 36 ทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก โดยมีปริมาตรรวม 0.5 ลิตร ใช้เชื้อตั้งต้นปริมาตรร้อยละ 5 (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีอัตราเร็วในการปั่นกวนด้วยใบพัด 200 รอบต่อนาที และให้อากาศเข้าสู่ถังหมัก 1 vvm เป็นเวลา 7 วัน โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างคงที่ที่ 4.0, 5.0, 6.0, เริ่มต้นที่ 4.0, เริ่มต้นที่ 5.0 ตามลำดับ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักจากถังหมักวิเคราะห์การเจริญของเชื้อรา แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ปริมาณโปรตีน การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

3.3.4.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนสในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยมีปริมาตรการหมัก 0.5 ลิตร

จากข้อ 3.3.4.1 เมื่อได้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของการอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก โดยมีปริมาตรรวม 500 มล.ใช้เชื้อตั้งต้นปริมาตรร้อยละ 5 (โดยปริมาตร) ความเป็นกรด-ด่างคงที่ที่ 5.0 มีความเร็วในการปั่นกวนด้วยใบพัด 200 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 7 วัน โดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียสทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักจากถังหมักวิเคราะห์การเจริญของเชื้อรา แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ปริมาณโปรตีน ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลง และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

3.3.4.3 การศึกษาปริมาณอากาศที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนสในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยมีปริมาตรการหมัก 0.5 ลิตร

นำอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4.1 และ 3.3.4.2 ทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักปริมาตรรวม 500 มล. ใช้เชื้อตั้งต้นปริมาตรร้อยละ 5 (โดยปริมาตร) โดยใช้เชื้อตั้งต้นอายุ 36 ชั่วโมง ที่เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงตามข้อ 3.3.3.10 ปริมาณ 5% (โดยปริมาตร) มีความเร็วในการปั่นกวนด้วยใบพัด 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยแปรผันปริมาณอากาศที่ให้สู่ถังหมักเป็น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.00 vvm โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักในทุกๆวันเพื่อทำการ

วิเคราะห์ การเจริญของเชื้อ แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ปริมาณโปรตีน การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

3.3.4.4 การศึกษาอัตราความเร็วรอบของใบพัดกวนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนสในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยมีปริมาตรการหมัก 0.5 ลิตร

เลี้ยงเชื้อในถังหมักปริมาตรรวม 500 มล. โดยใช้เชื้อตั้งต้นอายุ 36 ชั่วโมง ที่เลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุงตามข้อ 3.3.3.10 ปริมาณ 5% (โดยปริมาตร) เลี้ยงโดยใช้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4.1 และ 3.3.4.2 เป็นเวลา 7 วัน โดยแปรผันอัตราเร็วการกวนผสมเป็น 200, 300, 400 และ 500 รอบต่อนาที ตามลำดับ โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักในทุกๆวัน เพื่อทำการวิเคราะห์ การเจริญของเชื้อ แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ปริมาณโปรตีน การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย