หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

น้ำมะพร้าวแก่ ได้จากตลาดสดมหานาค เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร
น้ำตาลทราย ตรา วังขนาย โรงงานน้ำตาลวังขนาย จังหวัด ลพบุรี .

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่า (rotary shaker) รุ่น G-33 & G-50 series ของบริษัท NEW BRUNSWICK SCIENCE ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น MS-1 ของบริษัท IKA- work, INC ประเทศสหรัฐอเมริกา

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น BT-1 ของบริษัท Heto lab equipment ประเทศเดนมาร์ก

เครื่องบ่ม (incubator) รุ่น Modell 500 ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น

ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น AH 15610A ของบริษัท Litton ประเทศสหรัฐอเมริกา

มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น pH-meter CG840 ของบริษัท SCHOTT ประเทศเยอรมนี

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-320 ของบริษัท TOMY SEICO ประเทศญี่ปุ่น

มาตรวัดออกซิเจน (portable oxygen meter) รุ่น oxi320 ของบริษัท WTW ประเทศเยอรมนี

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB204 ของบริษัท METTLER TOLEDO ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

เครื่องดูดอากาศ (suction pump) รุ่น Model xx5522656 ของบริษัท Millipore ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องนับจำนวนโคโลนี (colony counter) รุ่น CWN334 ของบริษัท Gallenkamp ประเทศเยอรมนี

เครื่องวัดความหนืด (brookfield viscosity) รุ่น LDV II+cp ของบริษัท Brookfield eng labs inc ประเทศสหรัฐอเมริกา

เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์

ภาชนะบรรจุพาสติกทนความร้อน

กระดาษหนังสือพิมพ์

3.2.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรดฟอสฟอริก	MERCK	ประเทศเยอรมนี
กรดกลูโคนิก	MERCK	ประเทศเยอรมนี
ฟีนอฟทาลีน	MAY&BAKER	ประเทศอังกฤษ
โซเดียมไฮดรอกไซด์	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
โพแทสเซียมพาทาเลต	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนทะไฮเดรต	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
กรดไฮโดรคลอริก	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
เมทิลีนบลู	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
ซูโครส (A.R grade)	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
กรดแอซีติก	J.T. BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แมกนีเซียมซัลเฟต	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
เอทิลแอลกอฮอล์	เมธากรุ๊ป	ประเทศไทย
กลูโคส	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
ยีสต์สกัด	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แคลเซียมคาร์บอเนต	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
วุ้นผง	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส	รวมเคมี	ประเทศไทย
แซนแทนกัม	รวมเคมี	ประเทศไทย
คาร์ราจีแนน	รวมเคมี	ประเทศไทย

3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Acetobacter sp.* TISTR 975 ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย

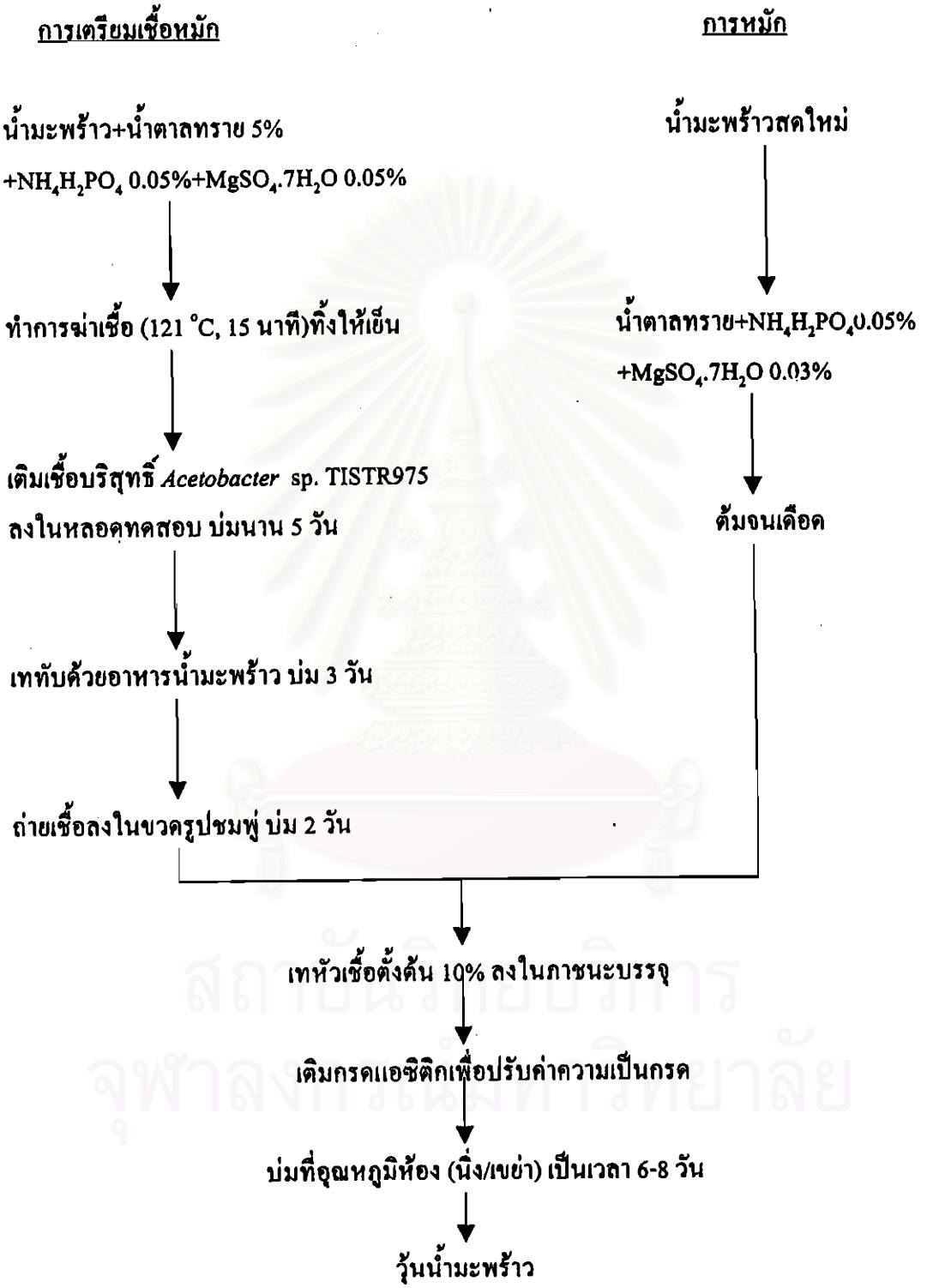
3.4 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เขี่ยเชื้อ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แล้วลาก (streak) บนอาหารแข็ง(ภาคผนวก ก 1.1) ในหลอดแก้ว ลักษณะลาดเอียง (agar slant) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในระหว่างทำการทดลองควรถ่ายเชื้อทุกๆ 2 สัปดาห์

3.5 การหมักเพื่อผลิตเซลลูโลสในภาวะนิ่ง

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR 975

ในการเตรียมหัวเชื้อ ประกอบด้วย การเตรียมอาหารน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก.2) ใส่ลงในหลอดทดสอบ 5 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น แล้วถ่าย *Acetobacter* sp. TISTR 975 1 โคโลนี จากหลอดแก้วที่มีอาหารลาดเอียง ลงในหลอดทดสอบ บ่มนาน 5 วัน เททับด้วยอาหารน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก.2) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 5 มิลลิลิตร เพื่อกระตุ้นการเจริญ บ่มนาน 3 วัน จึงถ่ายใส่ขวดรูปชมพู่วางนิ่ง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตเซลลูโลสต่อไป



รูปที่ 7 สรุปขั้นตอนการหมัก *Acetobacter* sp. TISTR 975 เพื่อผลิตเซลลูโลส

3.5.2 ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง และ น้ำตาลทราย (%w/v) ต่อ ปริมาณเซลลูโลส

นำน้ำมะพร้าวมากรองด้วยผ้าขาวบาง เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 %w/v แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 %w/v นำไปต้มให้เดือด ช้อนไขมันออก แล้วจึงเติมน้ำตาลทราย ที่ความเข้มข้นต่างๆ รอให้อุ่นเติมเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 2 และกรดแอซีติก (ร้อยละ 5) เพื่อปรับค่าความเป็นกรด ใส่หัวเชื้อตั้งต้นที่เตรียมไว้ 10 %v/v นำส่วนผสมทั้งหมดถ่ายใส่ภาชนะบรรจุที่ทำความสะอาดด้วยน้ำร้อนแล้ว ปิดด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ประเมินผลโดยการหาปริมาณเซลลูโลส (ภาคผนวก ข) ออกแบบการทดลองโดย Central Composite Design ทั้งหมด 13 การทดลอง ดังต่อไปนี้

ตัวแปร	สัญลักษณ์	-1.414	-1	0	+1	+1.414
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	X_1	1.172	4	5	6	6.828
น้ำตาลทราย (%w/v)	X_2	2.171	3	5	7	7.828

การทดลองที่	X_1	X_2
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	-1.414	0
6	1.414	0
7	0	-1.414
8	0	1.414
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิเคราะห์ข้อมูลโดย Multiple Regression Analysis และเลือกภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโดยใช้ Response Surface Methodology (Mason, et. al., 1989) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป STATGRAPHIC Version 5 ของ Graphic Software System, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.5.3 ศึกษาผลความสูงของน้ำหมักจากก้นภาชนะบรรจุ และพื้นที่ผิวหน้าของภาชนะบรรจุที่เหมาะสม

เตรียมหัวเชื้อ ตามวิธีการข้อ 3.5.1 และวิธีการเตรียมอาหารน้ำมะพร้าว โดยใช้สูตรที่เหมาะสมตามข้อ 3.5.2 ใส่หัวเชื้อ ร้อยละ 10 ถ่ายใส่ภาชนะบรรจุ ที่มีพื้นที่ผิวหน้าของภาชนะบรรจุ 5 ขนาด แล้วแปรความสูงของน้ำหมักจากก้นภาชนะจากนั้นปิดภาชนะด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ประเมินผลโดยการหาปริมาณเซลลูโลส (ภาคผนวก ข) ออกแบบการทดลองโดย Central Composite Design ทั้งหมด 13 การทดลอง ดังนี้

ตัวแปร	สัญลักษณ์	-1.414	-1	0	+1	+1.414
ความสูงของน้ำหมักจากก้นภาชนะ (ซ.ม)	X_1	1.086	1.5	2.5	3.5	3.914
พื้นที่ผิวหน้าของภาชนะบรรจุ (ซ.ม^2)	X_2	93.7	114.66	165.33	216	237

การทดลองที่	X_1	X_2
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1.414	0
6	1.414	0
7	0	-1.414
8	0	1.414
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิเคราะห์ข้อมูลโดย Multiple Regression Analysis และเลือกภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโดยใช้ Response Surface Methodology (Mason, et. al., 1989) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป STATGRAPHIC Version 5 ของ Graphic Software System, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.5.4 ศึกษาผลของออกซิเจนที่ละลายในอาหารน้ำมะพร้าวในภาวะนิ่ง

3.5.4.1 แปรผันปริมาตรอาหารน้ำมะพร้าว โดยให้พื้นที่ผิวหน้าภาชนะคงที่

เตรียมหัวเชื้อ ตามวิธีการข้อ 3.5.1 และวิธีการเตรียมอาหารน้ำมะพร้าว โดยใช้สูตรที่เหมาะสมตามข้อ 3.5.2 ใส่หัวเชื้อ ร้อยละ 10 ถ่ายใส่ภาชนะบรรจุ ที่มีพื้นที่ผิวหน้า 165.33 ตารางเซนติเมตร แล้วใช้แปรผันความสูงของน้ำหมักจากก้นภาชนะ เป็น 2.5 และ 7.5 ตารางเซนติเมตร จากนั้นปิดภาชนะด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์

จากนั้นติดตามการเจริญโดยการหาปริมาณเซลลูโลส, ปริมาณกรดกลูโคนิก, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก, จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในน้ำหมัก และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข)

3.5.4.2 แปรผันพื้นที่ผิวหน้าภาชนะบรรจุ โดยให้ความสูงของอาหารน้ำมะพร้าวจากก้นภาชนะคงที่

เตรียมหัวเชื้อ ตามวิธีการข้อ 3.5.1 และวิธีการเตรียมอาหารน้ำมะพร้าว โดยใช้สูตรที่เหมาะสมตามข้อ 3.5.2 ใส่หัวเชื้อ ร้อยละ 10 ถ่ายใส่ภาชนะบรรจุ ที่มีพื้นที่ผิวหน้า 165.33 และ 359.12 ตารางเซนติเมตร โดยมีความสูงของอาหารน้ำมะพร้าวจากก้นภาชนะบรรจุเท่ากับ 2.5 เซนติเมตร จากนั้นปิดภาชนะด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์

จากนั้นติดตามการเจริญโดยการหาปริมาณเซลลูโลส, ปริมาณกรดกลูโคนิก, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก, จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในน้ำหมัก และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข)

3.5.5 ศึกษาลักษณะการสร้างเซลลูโลส

เตรียมหัวเชื้อ ตามวิธีการข้อ 3.5.1 และวิธีการเตรียมอาหารน้ำมะพร้าว โดยใช้สูตรที่เหมาะสมตามข้อ 3.5.2 ใส่หัวเชื้อ ร้อยละ 10 ถ่ายใส่บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นปิดภาชนะด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ติดตามการสร้างเซลลูโลสโดยใช้แผ่นพลาสติกสีเพื่อเป็น marker บอกตำแหน่ง

3.6 <u>การหมักเพื่อผลิตเซลลูโลสในกาวะเขย่า</u>

3.6.1 ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง , ปริมาณน้ำตาลทราย และความเร็วรอบในการเขย่า ที่เหมาะสมต่อปริมาณเซลลูโลส

นำน้ำมะพร้าวมากรองด้วยผ้าขาวบาง เติมแมกนีเซียมซัลเฟต ร้อยละ 0.05 แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ร้อยละ 0.05 นำไปต้มให้เดือด ช้อนไขมันออก แล้วจึงเติมน้ำตาลทราย ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 , 5 และ 10 รอให้อุ่นเติมเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 2 แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4 , 5 และ 6 ตามลำดับ ใส่หัวเชื้อตั้งต้นที่เตรียมไว้ ร้อยละ 10 นำส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายใส่ขวดรูปชมพู่ที่ทำความสะอาดด้วยน้ำร้อนแล้ว นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 , 125 และ 200 รอบต่อนาที ประเมินผลโดยการหาปริมาณเซลลูโลส (ภาคผนวก ข) ออกแบบการทดลองโดย Box-Behnken Design ทั้งหมด 15 การทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวแปร	สัญลักษณ์	-1	0	+1
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	X_1	4	5	6
น้ำตาลทราย (%w/v)	X_2	0	5	10
ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบ/นาที)	X_3	50	125	200

การทดลองที่	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0
2	-1	+1	0
3	+1	-1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	+1
7	+1	0	-1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	-1	+1
11	0	+1	-1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

วิเคราะห์ข้อมูลโดย Multiple Regression Analysis และเลือกภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโดยใช้ Response Surface Methodology (Mason, et. al., 1989) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป STATGRAPHIC Version 5 ของ Graphic Software System, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 ศึกษาผลของออกซิเจนที่ละลายในอาหารน้ำมะพร้าวในภาวะเขย่า

3.7.1 ศึกษาผลของออกซิเจนที่ละลายในอาหารน้ำมะพร้าวโดยแปรผันความเร็วรอบในการเขย่า

เตรียมหัวเชื้อ ตามวิธีการข้อ 3.5.1 และวิธีการเตรียมอาหารน้ำมะพร้าว โดยใช้สูตรที่เหมาะสมตามข้อ 3.6.1 ใส่หัวเชื้อ ร้อยละ 10 นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า rotary shaker ด้วยความเร็วรอบ 50 ,100 และ 150 รอบต่อนาที

ประเมินผลโดยการหาปริมาณเซลลูโลส, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก, จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในน้ำหมัก, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความหนืดของน้ำหมัก (ภาคผนวก ข)

3.7.2 ศึกษาของชนิดและปริมาณให้ความหนืด ที่เหมาะสม

เตรียมหัวเชื้อ ตามวิธีการข้อ 3.5.1 และวิธีการเตรียมอาหารน้ำมะพร้าว โดยใช้สูตรที่เหมาะสมตามข้อ 3.6.1 แยกฆ่าเชื้อแซนแทนกัม 0.01%w/v , คาร์ราจีแนน 0.02%w/v และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) 0.2%w/v จากนั้นนำทั้งสองส่วนมาผสมให้เข้ากัน ใส่หัวเชื้อร้อยละ 10 นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสม ตามข้อ 3.7.1 เมื่อได้สารให้ความหนืดที่เหมาะสมแล้วก็นำมาแปรปริมาณสารให้ความหนืด ประเมินผลโดยการหาปริมาณเซลลูโลส, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก, จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในน้ำหมัก, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความหนืดของน้ำหมัก (ภาคผนวก ข)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย