หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 การแยกเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้ง

นำตัวอย่างแป้งเชื้อ, เม็ดเกาเหลียงที่เก็บจากโรงงานสุรา มาตัวอย่างละประมาณ 1 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงไป 5 มล. ปั่นให้เข้ากัน ใช้ห่วง (loop) จุ่มสารแขวนลอย (suspension) ที่ได้ลากบนอาหารแข็งชนิด โพเทโท เดกซ์โทรส เอการ์ (potato dextrose agar, ภาคผนวกหมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในตู้บ่ม (control environmental incubator shaker, New Brunswich Scientific Co, Inc. USA รุ่น G 27) จนมีการเจริญของเชื้อ (ประมาณ 2 วัน)

นำเชื้อที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยแยกเชื้อบนอาหารแข็งอีกครั้งหนึ่ง แล้วเก็บเชื้อบนอาหารแข็งเอียงชนิด โพเทโท เดกซ์โทรส เอการ์

2.2 การแยกสปอร์เพื่อใช้ในการตรึงสปอร์

นำเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็งเอียงชนิด โพเทโท เดกซ์โทรส เอการ์ อายุ 7 วัน เติมน้ำกลั่นที่ผสม 0.1 เปอร์เซ็นต์ทวีน 80 (tween 80) และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 5 มล. ใช้ห่วงเขี่ยให้สปอร์หลุดออกจากสายใย (mycelium) กรองผ่านผ้าโปร่งที่ซ้อนกันหลาย ๆ ชั้น เพื่อแยกส่วนสายใยออก (68) นำสารแขวนลอยของสปอร์มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมล. โดยวัดด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer, ภาคผนวกหมายเลข 2)

2.3 การตรึงสปอร์ในแคลเซียมอัลจิเนต

ตรึงสปอร์ของราในแคลเซียมอัลจิเนตตามวิธีของ Ohlson และคณะ (68) โดยเติม 1 มล. สารแขวนลอยของสปอร์จากข้อ 2.2 ลงในโซเดียมอัลจิเนต [300 centripois (cps.) Nakarai Co, Ltd. Japan] ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ 100 มล. เขย่าให้ทั่วกัน แล้วดูดสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่มีสปอร์อยู่ด้วย ผ่านเครื่องปั๊มแบบเพอริสตอลติก (peristaltic, Buchler Multi-Staltic Pump, U.S.A รุ่น 2-6201) ไปตามสายยาง สารละลายจะ

ผ่านปลายเข็มขนาด 0.4 x 13 มล. (sterile disposable terumo needle ขนาด $27\frac{1}{2}$ G) ด้วยความเร็ว 50 มล.ต่อชั่วโมง และหยดลงใน 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ซึ่งถูกกวนอยู่ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน (stir plate ชนิด 100 ของ Thermolyne sybron coroperation, U.S.A) ก็จะได้เม็ดเจล (gel bead) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-2.0 มม. เก็บเม็ดเจลไว้ที่อุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2.4 การชักนำให้เกิดการงอกของสปอร์ในแคลเซียมอัลจิเนต

นำสปอร์ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต มากรองบนกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 2) ชั่งมา 2.0 กรัมในสภาพปลอดเชื้อ ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 (ภาคผนวกหมายเลข 3) ที่เติม 0.05 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ด้วย เขย่าบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswich Scientific., Co, Inc, U.S.A. รุ่น G-27) ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที 30 องศา-เซลเซียส 36 ชั่วโมง

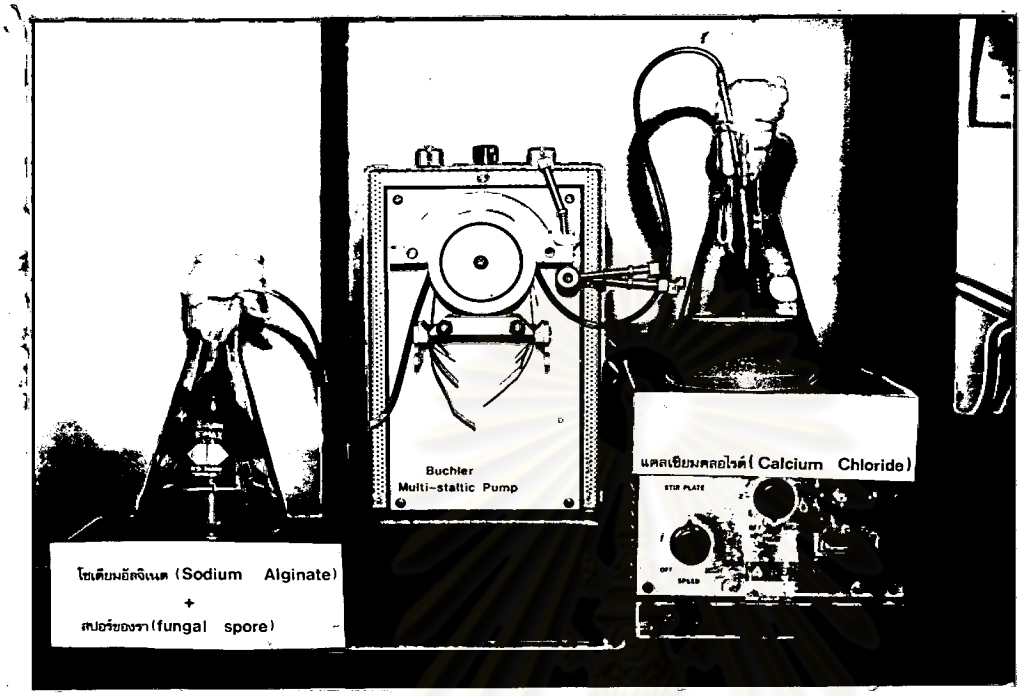
2.5 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อราที่ถูกตรึง

นำเชื้อราที่ถูกตรึงทั้งหมดตามวิธีในข้อ 2.4 มาบ่มใน 100 มล. ของสารละลายแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวกหมายเลข 4) ที่เติม 0.05 โมลาร์-แคลเซียมคลอไรด์ เขย่า 150 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้น้ำ (aquaterm waterbath shaker ของ New Brunswich Scientific. Co, Inc. U.S.A) เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง นำมาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ก่อนและหลังการบ่มโดยวิธี Somogyi-Nelson (69, ภาคผนวกหมายเลข 5) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวกหมายเลข 6) คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดจากการย่อยแป้งสุกที่เวลาต่าง ๆ

สำหรับการย่อยแป้งดิบ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดิบแทน

2.6 การคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งสูงสุด

ตรึงเซลของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ตามข้อ 2.1 ในแคลเซียมอัลจิเนต แล้วหาความสามารถในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึงตามวิธีในข้อ 2.5 โดยเปรียบเทียบกับ Aspergillus oryzae AHO-1 เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยแป้งสูงสุดในสภาพที่ถูกตรึง



รูปที่ 2.1 แสดงวิธีการตรึงสปอร์ของราในแคลเซียมอัลจิเนต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7 การหาความสามารถในการย่อยแป้งของเอนไซม์

นำเอนไซม์ตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมผสมด้วยสารละลายอซิเตต บัฟเฟอร์ (acetate buffer) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (molar) ที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 มา 0.5 มล. ผสมกับสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 2.0 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มล. บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำต้มเดือด 5 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (15) แล้วหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในสารละลายก่อนและหลังการบ่ม โดยวิธี Somogyi-Nelson (69, ภาคผนวกหมายเลข 5) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวกหมายเลข 6)

ความสามารถในการย่อยแป้งของเอนไซม์ 1 หน่วย หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะการตรวจสอบข้างต้น

2.8 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อราที่ถูกตรึงเพื่อให้มีความสามารถในการย่อยแป้งสูงสุด

นำสปอร์ที่ถูกตรึงมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีในข้อ 2.4 และทุก ๆ 4 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมากรองแยกเซลที่ถูกตรึง และของเหลวออกจากกัน ส่วนที่เป็นของเหลวนำมาหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (69, ภาคผนวกหมายเลข 5), ความสามารถในการย่อยแป้งของเอนไซม์ (enzyme activity) ตามวิธีในข้อ 2.7, ความเป็นกรดด่าง (Ø 70 pH meter ของ Beckman, Irvine, U.S.A) สำหรับเซลที่ถูกตรึงนำมาหาค่าน้ำหนักเปียก (wet weight) โดยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Boeckel Scientific Equipment Co, Ltd, รุ่น P-20) และความสามารถในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึงตามวิธีในข้อ 2.5

2.9 การทดลองใช้เชื้อราที่ถูกตรึง 2 ชนิดร่วมกันในการย่อยแป้ง

ตรึงสปอร์ Aspergillus orzyae และ Rhizopus sp. ในแคลเซียมอัลจิเนต แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.4 เป็นเวลา 52 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลที่ถูกตรึงมีความสามารถในการย่อยแป้งสูงสุด นำเซลที่ถูกตรึงมาหาความสามารถในการย่อยแป้งสุก ตามวิธีในข้อ 2.5 และหาความสามารถในการย่อยแป้งดิบโดยวิธีเดียวกัน ในการทดลองนี้เก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมง เพื่อหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (ภาคผนวกหมายเลข 6) และ

013201

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นโดยใช้กลูโคสออกซิเดส-เปอร์ออกซิเดส รีเอเจนต์ (glucose oxidase. peroxidase reagent, Diacolor, Toyo Spining Co, Japan) (70, ภาคผนวกหมายเลข 7) ในการทดลองนี้ใช้เซลของ Aspergillus oryzae ที่ถูกตรึง, Rhizopus sp. ที่ถูกตรึง และเซลที่ถูกตรึงของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ผสมกันในอัตราส่วน 1 : 1 โดยใช้ปริมาณเซลที่ถูกตรึงในแต่ละการทดลอง 5 กรัม

2.10 การทดลองใช้เอนไซม์จากเชื้อรา 2 ชนิดร่วมกันในการย่อยแป้ง

2.10.1 การเตรียมเอนไซม์

เตรียมเอนไซม์จาก Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. โดยเลี้ยงเชื้อบนข้าวเจ้าที่นึ่งให้สุกแล้วประมาณ 500 กรัม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 3 วัน สกัดแยกเอนไซม์โดยแช่ใน 50 มิลลิโมลาร์ อซิเตตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 5.0 ที่มี 3 เปอร์เซนต์ โซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 12 ชั่วโมง ตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 75 เปอร์เซนต์ แล้วแยกเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกโดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเดกซ์ ซี-50 นำเอนไซม์มาศึกษาคุณสมบัติต่อไปนี้

2.10.2 การย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์

บ่มเอนไซม์จาก Aspergillus oryzae 0.5 มล. ซึ่งมีเอนไซม์อยู่ 1.1 หน่วยต่อ มล. กับแป้งมันสำปะหลังสุก ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์อย่างละ 0.5 มล.ต่อ 1 หลอด ทั้งหมด 8 หลอด และทำเช่นเดียวกันโดยใช้เอนไซม์จาก Rhizopus sp. 0.5 มล. ซึ่งมีเอนไซม์อยู่ 1.16 หน่วยต่อ มล. และเอนไซม์ผสมจาก Aspergillus oryzae Rhizopus sp. อย่างละ 0.25 มล. บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง 1 หลอด ทุก ๆ 1 ชั่วโมง นำมาหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ

สำหรับการย่อยแป้งดิบ ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับแป้งสุก โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดิบแทน

2.10.3 การหาชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังของเอนไซม์

นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ที่ชั่วโมงที่ 24 ตามข้อ 2.10.2 เพื่อให้

การย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และสารละลายน้ำตาลกลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส มาตรฐานความเข้มข้น 1 มก.ต่อ มล. ตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษ (Whatman Chromatography paper) เป่าให้แห้ง แล้วนำมาใส่ในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยสารละลายผสมของบิวทานอล : ไพริดีน : น้ำ อัตราส่วน 9:7:4 ให้ส่วนปลายของกระดาษแช่อยู่ในตัวทำละลายสูง 1.5 ซ.ม. เมื่อสารละลายซึมถึงตำแหน่งที่ห่างจากจุดเริ่มต้น 23 ซ.ม. นำมาทำให้แห้ง แล้วนำมาทำให้เกิดสีโดยใช้วิธีอัลคาไล ซิลเวอร์ ไนเตรต (71) (alkali silver nitrate, ภาคผนวกหมายเลข 8)

2.11 <u>การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์</u>

2.11.1 <u>การหาชนิดของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์</u>

ตรึงสปอร์ของเชื้อราตามวิธีในข้อ 2.3 โดยแปรผันชนิดของโซเดียมอัลจิเนตเป็นชนิด 300 cps. และ 500 cps. นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.4 เป็นเวลา 52 ชั่วโมง นำเซลที่ถูกตรึงทั้ง 2 ชนิดมาหาความสามารถในการย่อยของเซลที่ถูกตรึงที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 2.5

2.11.2 <u>การหาความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์</u>

ตรึงสปอร์ของราในโซเดียมอัลจิเนตชนิด 300 cps. ตามวิธีในข้อ 2.3 โดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตเป็น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 เปอร์เซนต์ นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.4 เป็นเวลา 52 ชั่วโมง นำเซลที่ถูกตรึงมาหาความสามารถในการย่อยของเซลที่ถูกตรึงที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 2.5

2.11.3 <u>การหาปริมาณสปอร์ที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์</u>

ตรึงสปอร์ของราในโซเดียมอัลจิเนต ชนิด 300 cps. ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ตามวิธีในข้อ 2.3 แต่แปรผันปริมาณสปอร์ที่ใช้เป็น 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10} สปอร์ต่อ 100 มล.ของโซเดียมอัลจิเนต นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.4 เป็นเวลา 52 ชั่วโมง นำเซลที่ถูกตรึงมาหาความสามารถในการย่อยแป้งที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 2.5

2.12 <u>การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลที่ถูกตรึงให้มีคุณภาพสูง</u>

2.12.1 การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสม

ตรึงสปอร์ยองราในโซเดียมอัลจิเนตชนิด 300 cps. ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 2.3 โดยใช้ปริมาณสปอร์ 10^8 สปอร์ต่อ 100 มล. ของโซเดียม-อัลจิเนต นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีในข้อ 2.4 เป็นเวลา 32 ชั่วโมง โดยแปรผันชนิดของไนโตรเจนอนินทรีย์ต่อไปนี้ แทนที่เปปโตนในสูตรอาหารที่ 1 คือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมซีเตรต, แอมโมเนียมมอซีเตต โดยเติมและไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ เขย่า 250 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส 52 ชั่วโมง นำเซลที่ถูกตรึงมาหาความสามารถในการย่อยแป้งที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 2.5

2.12.2 การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสม

นำสปอร์ที่ถูกตรึงมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 ที่แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อไปนี้คือ รำข้าวสาลี, รำข้าวเจ้า, ทริปโตน (tryptone), โปรติโอส-เปปโตน (proteose peptone), เปปโตน, กากถั่วเหลือง, สารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แทนเปปโตนและสารสกัดจากยีสต์ในสูตรอาหาร เขย่า 250 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส 52 ชั่วโมง นำเซลที่ถูกตรึงมาหาความสามารถในการย่อยแป้งที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 2.5

12.3 การหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสม

นำสปอร์ที่ถูกตรึงมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 ที่แปรผันปริมาณกากถั่วเหลืองที่เติมลงไปในสูตรแทนเปปโตนและสารสกัดจากยีสต์ ดังนี้ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 2.4 เป็นเวลา 52 ชั่วโมง นำเซลที่ถูกตรึงมาหาความสามารถในการย่อยแป้งตามวิธีในข้อ 2.5

12.4 การหาปริมาณแป้งมันสำปะหลังซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

นำสปอร์ที่ถูกตรึง มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 ที่เติมกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน แทนเปปโตนและสารสกัดจากยีสต์ โดยเติมกากถั่วเหลือง 1.0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอาหารที่เลี้ยงเซลที่ถูกตรึงเพื่อย่อยแป้งสุก และ 4.0 เปอร์เซ็นต์สำหรับเซลที่ถูกตรึงที่ใช้ในการย่อยแป้งดิบ แปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนดังนี้คือ 1.0, 2.0, 3.0,

4.0, 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 52 ชั่วโมง ตามวิธีในข้อ 2.4 นำเซลที่ถูกตรึงมาหาความสามารถในการย่อยแป้งที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 2.5

2.12.5 การหาปริมาณไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสม

ดำเนินการวิจัยตามข้อ 2.12.4 โดยแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซิเตรตที่เติมลงไปเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับกากถั่วเหลืองดังนี้ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเซลที่ถูกตรึง

2.12.6 การหาปริมาณเกลือแร่ที่เหมาะสม

2.12.6.1 การหาปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสม

ดำเนินการวิจัยตามข้อ 2.12.5 โดยแปรผันปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตดังนี้ 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกตรึง

2.12.6.2 การหาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสม

ดำเนินการวิจัยตามข้อ 2.12.6.1 โดยแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตดังนี้คือ 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกตรึง

2.12.7 การหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

ดำเนินการวิจัยตามข้อ 2.12.6 โดยแปรผันความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้คือ 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเซลที่ถูกตรึง

2.13 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึง

2.13.1 การหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึง

ดำเนินการวิจัยเช่นเดียวกับข้อ 2.12.7 แล้วนำเซลที่ถูกตรึงมาหาความสามารถในการย่อยแป้งที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยแปรผันความเป็นกรดด่างของสารละลายแป้งมันสำปะหลัง ดังนี้คือ 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.13.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความสามารถในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึง

ดำเนินการวิจัยตามข้อ 2.13.1 แล้วนำเซลที่ถูกตรึงมาหาความสามารถในการย่อยแป้งที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเซลที่ถูกตรึงกับสารละลายแป้งมันสำปะหลังดังนี้คือ 30, 37, 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2.14 การทดลองใช้เชื้อราที่ถูกตรึง 2 ชนิดร่วมกันในการย่อยแป้ง

นำเซลของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ซึ่งถูกตรึงไว้ในโซเดียมอัลจิเนต และนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.12.7 มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 และหาความสามารถในการย่อยแป้งเทียบกับการใช้เชื้อเดี่ยว ตามวิธีในข้อ 2.9

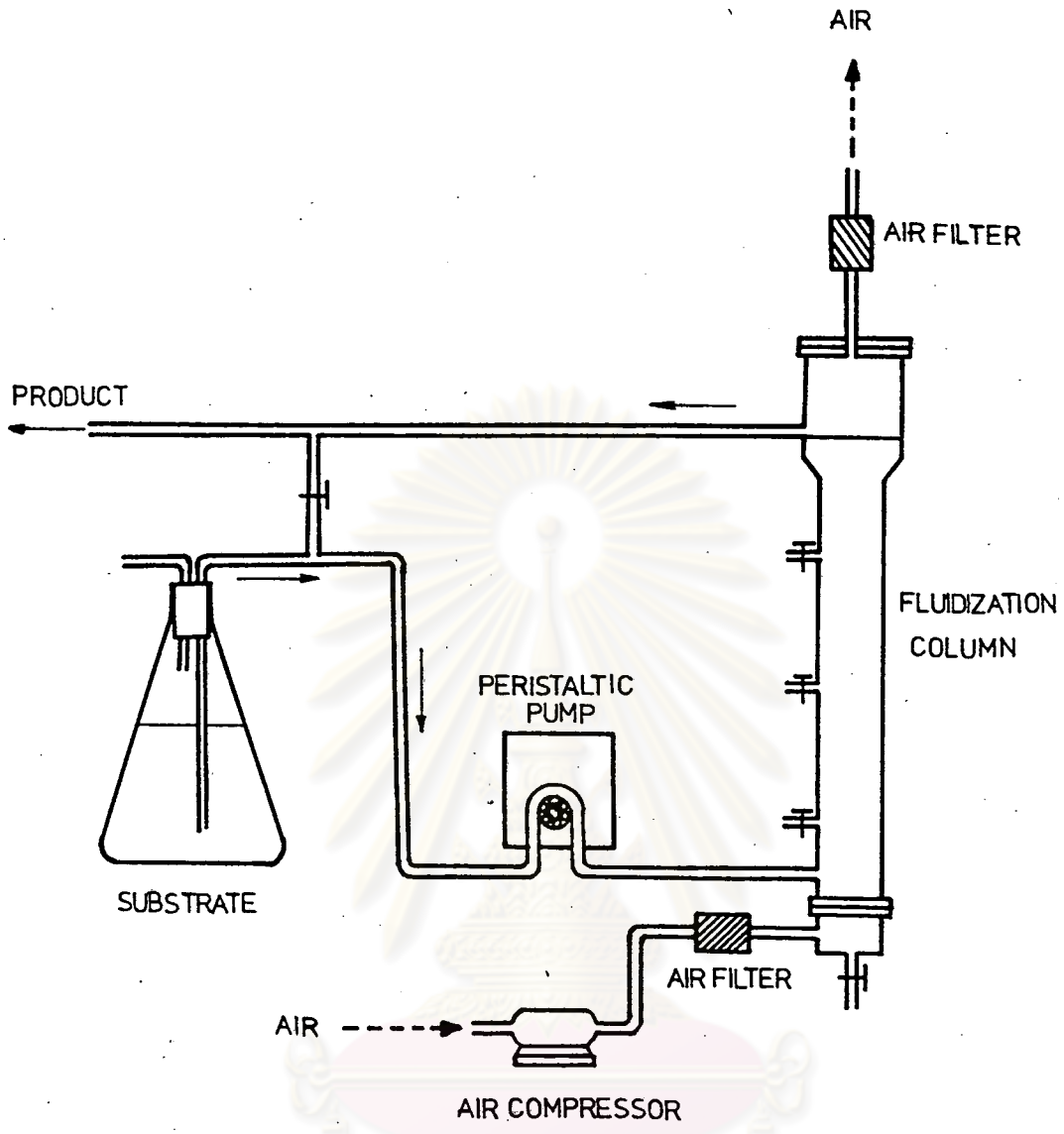
2.15 การศึกษาการใช้เซลที่ถูกตรึงในการย่อยแป้งสุกโดยการนำเซลกลับมาใช้ใหม่

ดำเนินการวิจัยตามข้อ 2.13 และหาความสามารถในการย่อยแป้งตามวิธีในข้อ 2.5 โดยทุก ๆ 24 ชั่วโมงจะถ่ายน้ำแป้งที่ใช้ในการย่อยออก แล้วเติมน้ำแป้งใหม่แทน และทำการทดลองเช่นเดียวกัน

2.16 การศึกษาการย่อยแป้งในหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเซชั่นโดยใช้เซลที่ถูกตรึง

2.16.1 การเตรียมหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเซชั่น

หอปฏิกิริยามีรูปทรงกระบอกทำด้วยพลาสติกโปร่งใส (plexiglass) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.2 เซนติเมตร สูง 60 เซนติเมตร ส่วนบนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ขึ้นเป็น 9.9 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร ซึ่งเป็นส่วนให้ผลิตภัณฑ์หลังจากผ่านการหมักแล้วไหลออก ปริมาตรที่ใช้งาน 1200 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้านล่างของหอปฏิกิริยามีช่องทางให้อากาศผ่าน โดยอากาศจากคอมเพรสเซอร์ (Cheq Yaun Industrial Ltd, Taiwan) ผ่านเข้ากระเปาะแก้วซึ่งบรรจุสำลีปลอดเชื้อเพื่อช่วยกรองอากาศจากภายนอก (air filter) แล้วเข้าสู่หอปฏิกิริยา ผ่านแผ่นตะแกรงซึ่งทำหน้าที่เป็นที่รองรับเซลที่ถูกตรึง ซึ่งบรรจุอยู่ในหอปฏิกิริยาและเป็นตัวกระจายอากาศ (air distributer) เข้าสู่หอปฏิกิริยาพร้อมกัน อากาศหลังจากผ่านหอปฏิกิริยาแล้ว ก็จะออกทางด้านบนของหอปฏิกิริยาออกสู่บรรยากาศภายนอก ช่องถัดจากทางให้อากาศเข้าเหนือแผ่นกระจายอากาศ จะมีช่องทางให้น้ำแป้งซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการย่อยของเซลที่ถูกตรึงไหลเข้าสู่หอปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะไหลออกทางด้านบนสู่ภาชนะรองรับ



รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเซชั่น ทิศทางการไหลเข้าออกของน้ำแป้งที่เป็นสารตั้งต้น, ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น และอากาศที่ไหลเข้าออก

——— น้ำแป้ง

---- อากาศ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.3 แสดงภาพถ่ายของหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเซชั่นที่บรรจุเซลของ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึง และทิศทางการไหลเข้าออกของน้ำแป้งที่เป็นสารตั้งต้น, ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น และอากาศที่ไหลเข้าออก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้ทางด้านข้างของหอปฏิกิริยาจะมีช่องเปิด 3 ช่อง เพื่อใช้เก็บตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งที่ความสูงของหอปฏิกิริยาขนาดต่าง ๆ กัน

2.16.2 การทดลองย่อยแป้งแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเซชั่น

นำเซลที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตที่เตรียมได้ตามข้อ 2.12.7 ปริมาตรประมาณ 600 มล. ใส่ในหอปฏิกิริยาที่ล้างฆ่าเชื้อด้วย 70 เปอร์เซนต์เอธิลแอลกอฮอล์ แล้วเปิดให้น้ำแป้งไหลเข้าสู่หอปฏิกิริยาทางด้านล่างด้วยความเร็ว 100 มล.ต่อชั่วโมง โดยใช้ปั๊มแบบเพอริสตอลติก (peristaltic) (perista mini pump 87-121 ของ ATTA, Japan) เปิดให้อากาศไหลเข้าสู่หอปฏิกิริยาจนเม็ดเซลที่ถูกตรึงหมุนเวียนตลอดทั้งหอทดลองในลักษณะที่เรียกว่าฟลูอิดไดเซชั่น ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยแป้งโดยเซลที่ถูกตรึงไหลออกจากหอปฏิกิริยาทางด้านบน สู่ภาชนะรองรับ เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทางช่องเปิดนี้และช่องเปิดทางด้านข้างของหอปฏิกิริยาทุก ๆ 2 ชั่วโมง นำมาหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยของเซลที่ถูกตรึงในแต่ละวัน คำนวณเป็นเปอร์เซนต์การย่อย (ภาคผนวกหมายเลข 9)

2.16.3 การย่อยแป้งแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเซชั่นโดยเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนและเกลือแร่ให้แก่เซล

ดำเนินการวิจัยเช่นเดียวกับข้อ 2.16.2 โดยเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนและเกลือแร่ให้แก่เซลตามสูตรที่ใช้ในการเลี้ยงเซลที่ถูกตรึง โดยเติมในปริมาณที่ทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารในหอปฏิกิริยาเท่ากับสารอาหารตามสูตร โดยทดลองเติม 2 แบบคือ

2.16.3.1 หลังวันที่ 3 ของการทดลองย่อยแป้งแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยา เติมสารอาหารไนโตรเจนและเกลือแร่ให้แก่เซล ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นปล่อยของเหลวที่อยู่ในหอปฏิกิริยาออกให้หมด แล้วดำเนินการทดลองต่อไป

2.16.3.2 หลังวันที่ 3 ของการทดลองย่อยแป้งแบบต่อเนื่อง เติมสารอาหารไนโตรเจนและเกลือแร่ให้แก่เซล แล้วทำการทดลองต่อไป

2.16.4 การแปรผันคุณสมบัติของเซลที่ถูกตรึงที่บรรจุในหอปฏิกิริยา

2.16.4.1 การแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงสปอร์

ดำเนินการวิจัยตามข้อ 2.16.3.2 โดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงสปอร์ดังนี้ 0.75, 1.0, 2.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

2.16.4.2 การแปรผันความเข้มข้นของน้ำแป้งที่ใช้ในการย่อย

ดำเนินการวิจัยตามข้อ 2.16.3.2 โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำแป้งที่ใช้ในการย่อยเป็น 1.5 เปอร์เซนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย