บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การแยกยีสต์ที่สังเคราะห์ไวตามินจากผลไม้

นำผลไม้สุกงอมแต่ละชนิด ได้แก่ สับปะรด, ส้ม, กล้วย, เงาะ และฝรั่ง มาบดให้ละเอียดใส่ในฟลาสค์ขนาด 50 มล. ปิดด้วยผ้าขาวบาง บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 วัน ใช้ลูปจุ่มลงในเนื้อผลไม้ แล้วนำมาขีดลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไวตามิน(vitamin-free medium)(ภาคผนวก ก ข้อ 1) (Barnett et al.,1983) เลี้ยงโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ตามสูตรอาหารที่มีในภาคผนวก ก ข้อ 4 นำโคโลนีที่คาดว่าเป็นยีสต์มาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ทำโคโลนียีสต์ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์บน YM agar และเก็บเชื้อไว้ใน YM agar slants ที่อุณหภูมิ 4°ซ แยกยีสต์ทางอนุกรมวิธานเบื้องต้น โดยใช้ key ของ Lodder & Kreger-Van Rij,1974 ซึ่งอยู่ในภาคผนวก จ

3.2 การจำแนกยีสต์ทางอนุกรมวิธานตามวิธีที่รายงานโดย Kern,1985 ; Lodder & Kreger-van Rij,1974 ; Van der Walt & Yarrow, 1984; Barnett et al., 1983; McGinnis, 1980 และ Campbell, 1974

3.2.1. การตรวจลักษณะโคโลนีและเซลยีสต์

3.2.1.1 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง

นำยีสต์ที่เตรียมไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่มีอายุประมาณ 2-3 วัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ morphology agar ตามสูตรอาหารที่มีในภาคผนวก ก ข้อ 3 นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 7-10 วัน ตรวจลักษณะโคโลนี ได้แก่ ลักษณะของเนื้อ, สี, พื้นผิว, รูปร่าง, ขอบผิว

3.2.1.2 ลักษณะเซลของยีสต์ที่เจริญในอาหารเหลว

นำยีสต์ที่เตรียมไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM slant ที่มีอายุ 2-3 วัน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว malt extract(ภาคผนวก ก ข้อ 5) ปริมาตร 30 มล. ในฟลาสค์ขนาด 100 มล. ตั้งทิ้งไว้ 2-3 วัน ที่อุณหภูมิ 25-28°ซ ตรวจลักษณะเซลและการแตกหน่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และถ่ายภาพโดยใช้ฟิมล์ขาวดำโกดัก ASA 200 วัดขนาดเซลและรายงานขนาดเฉลี่ยของเซล 20 เซล

3.2.2. การตรวจการสร้างเส้นใย (pseudomycelium หรือ true mycelium)

วางกระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์บนแท่งแก้วรูปตัวยูในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนในตู้อบที่อุณหภูมิ 180°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ corn meal agar(ภาคผนวก ก ข้อ 6) เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนกระจกสไลด์บางๆ รอจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ขีดลากเซลยีสต์อายุ 2-3 วัน ขีดลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามแนวยาวของกระจกสไลด์ประมาณ 1 หรือ 2 เส้น นำกระจกปิดสไลด์วางทับบนแนวขีดของเชื้อเหนำที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 4-5 วัน นำกระจกสไลด์มาตรวจการสร้างสายใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และถ่ายภาพโดยใช้ฟิมล์ขาวดำโกดัก ASA 200

3.2.3. การตรวจการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospores)

นำเชื้อยีสต์ที่เก็บรักษาใน YM agar slant มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เพื่อเตรียมเซลให้สร้างแอสโคสปอร์ (presporulation medium) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 1-2 วัน นำเซลยีสต์ที่ได้มาเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสปอร์ (sporulation medium) ได้แก่ Gorodkowa agar, acetate agar, V8 agar, (ภาคผนวก ก ข้อ 7, 8 และ 9) malt extract agar และ YM agar นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 3 วัน ตรวจการสร้างแอสโคสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า ทุกๆสัปดาห์เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ ยีสต์ที่สร้างแอสโคสปอร์ซึ่งนำ

มาใช้เป็นคอนโทรลได้แก่ *Hansenula polymorpha* TISTR 5140

3.2.4. การตรวจการสร้างอาร์โทรสปอร์ (Arthrospores)

วางกระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์บนแท่งแก้วรูปตัวยูในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนในตู้อบที่อุณหภูมิ 180°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ corn meal agar เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนกระจกสไลด์บางๆ รอจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ขีดลากเชลยีสต์อายุ 2-3 วัน ขีดลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามแนวยาวของกระจกสไลด์ประมาณ 1 หรือ 2 เส้น นำกระจกปิดสไลด์วางทับบนแนวขีดของเชื้อ เทน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 4-5 วัน นำกระจกสไลด์มาตรวจการสร้างอาร์โทรสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และถ่ายภาพโดยใช้ฟิมล์ขาวดำโกดัก ASA 200 ยีสต์ที่สร้างอาร์โทรสปอร์และนำมาใช้เป็นคอนโทรลได้แก่ *Tricosporon cutaneum* TISTR 5133

3.2.5. การตรวจการสร้าง บอลลิสโตสปอร์ (ballistospores)

นำเชื้อยีสต์ซึ่งเลี้ยงบน YM agar slant ที่ 28°ซ เป็นเวลา 2-3 วัน ขีดลากบน corn meal agar ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อในลักษณะเส้นตรง 2 เส้นตัดกันเป็นมุมฉาก นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไปคว่ำบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออีกใบหนึ่งซึ่งมีกระจกสไลด์ที่ฆ่าเชื้อ แล้ววางบน malt extract agar โดยวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบนให้แนวขีดลากของเชื้อเส้นใดเส้นหนึ่งตรงกับแนวของกระจกสไลด์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ ตรวจการสร้างบอลลิสโตโคนิเดียมหลังจากเลี้ยงเชื้อ 1-3 สัปดาห์ โดยตรวจจากเชลที่งอกจากสปอร์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่าง และนำกระจกสไลด์ตรวจลักษณะบอลลิสโตสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์(Van der Walt & Yarrow ,1984) และถ่ายภาพโดยใช้ฟิมล์ขาวดำโกดัก ASA 200 ยีสต์ที่สร้างบอลลิสโตสปอร์และนำมาใช้เป็นคอนโทรลได้แก่ *Sporobolomyces pararoceus* TISTR 5213

3.2.6. การตรวจการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon assimilation)

เลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ต่างๆบนอาหารแข็ง YM เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28°ซ ใส่ยีสต์1 ลูป ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนได้แก่กลูโคส(glucose) ซูโครส(sucrose) แลคโตส(lactose) มอลโตส(moltose) อินโนซิโทล(inositol) เซลโลไบโอส(cellobiose) แอล-อราบิโนส(L-arabinose) ดี-อราบิโนส(D-arabinose)ดี-ไรโบส(D-ribose)แอล-ซอร์โบส(L-sorbose)แรฟฟิโนส(raffinose) ดี-ไซโลส(D-xylose) ดี-กาแลคโตส(D-galactose) ดี-แมนนิโทล(D-mannitol) ดี-แรฟฟิโนส(D-raffinose) เมลิไบโอส(melibiose) ซาลิซิน(salicin) อิริทริโทล (erythritol) ไรบิโทล(ribitol) แอล-แรมโนส(L-rhamnose) ทรีฮาโลส (trehalose) เมเลไซโทส(melezitose) น้ำแป้ง(soluble starch) สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมีดังรายงานในภาคผนวก ก (ข้อ 11) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ นาน 5-7 วัน ตรวจการเจริญของยีสต์ในอาหารทดสอบนี้ วางแผ่นกระดาษที่มีแถบสีดำกว้างประมาณ 3-4 มม.ในแนวระดับ นำหลอดที่ต้องการตรวจสอบการเจริญมาวางทับบนแผ่นกระดาษนี้ ถ้ายีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนั้นได้ดีจะเห็นแถบสีดำไม่ชัดเจน แต่ถ้ายีสต์ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนั้นได้จะเห็นแถบสีดำชัดเจนขึ้น ยีสต์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส มอลโตส ดี-ไรโบส ดี-แมนนิโทล อิริทริโทล ไรบิโทล และทรีฮาโลส และนำมาใช้เป็นคอลโทรลคือ *Hansenula polymorpha* TISTR 5140 ยีสต์ที่ใช้น้ำตาลแลคโตส อินโนซิโทล และแอล-แรมโนส และนำมาใช้เป็นคอลโทรลคือ *Trichosporon cutaneum* TISTR 5133 ยีสต์ที่ใช้น้ำตาลเซลโลไบโอส ดี-ไซโลส ดี-กาแลคโตส และนำมาใช้เป็นคอลโทรลคือ *Candida pulcherrima* TISTR 5120 ยีสต์ที่ใช้น้ำตาลแอล-อราบิโนส แรฟฟิโนส เมเลไซโตส และนำมาใช้เป็นคอลโทรลคือ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123

3.2.7. การตรวจการหมักแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคส ทรีฮาโลส ซูโครส มอลโตส และแลคโตส ความเข้มข้น 2% ในสารละลาย yeast extract ความเข้มข้น 0.5% บรรจุลงอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทดสอบลงในหลอดทดลองซึ่งบรรจุหลอดดักก๊าซไว้ภายในหลอดหลอดละ 6 มล. ปิดหลอดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความชื้นร้อนที่ 110 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที นำยีสต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง YM อายุ 24 ชั่วโมง มาละลายในหลอดบรรจุน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 4.5 มล. ผสมให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายเซลมา 0.1 มล. ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ นำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 28°ซ ตรวจดูปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นภายในหลอดดักก๊าซ ซึ่งถ้ามีก๊าซเกิดขึ้นภายในหลอดดักก๊าซแสดงว่ายีสต์สามารถใช้น้ำตาลชนิดนั้นในกระบวนการหมักได้ ยีสต์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส และนำมาเป็นคอลโทรลคือ *Hansenula polymorpha*TISTR 5140

3.2.8. <u>การตรวจการใช้ไนเตรต</u>

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการใช้ไนเตรต(ภาคผนวก ก ข้อ 12) เตรียมหลอดบรรจุน้ำกลั่นปลอดเชื้อหลอดละ 4.5 มล. เติมอาหารที่เตรียมไว้ลงไปในหลอดน้ำกลั่นหลอดละ 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำเชื้อยีสต์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM 2-3 วัน เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบการใช้ไนเตรต บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ 1 สัปดาห์ ทดสอบการใช้ไนเตรตโดยหยด 0.5% α-naphthylamine และ 0.8% sulfalinic acid (ภาคผนวก ข ข้อ 1 และ2) 2-3 หยด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มล. ถ้าเกิดสีแดงขึ้นมาทันทีแสดงว่ายีสต์สายพันธุ์นั้นใช้ไนเตรตได้ แต่ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนสี ให้เติมผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีไนเตรต ผงสังกะสีจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไนเตรตให้เป็นไนไตรท์ ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ 0.5% α-naphthylamine และ 0.8% sulfanilic acid เกิดเป็นสารละลายสีแดง แสดงว่ายีสต์สายพันธุ์นั้นไม่สามารถใช้ไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่ถ้าไม่เกิดสีหลังจากการเติมผงสังกะสีแสดงว่ายีสต์สายพันธุ์นั้นใช้ไนเตรต โดยไนเตรตถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ซึ่งถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นแอมโมเนีย(Lodder,1974 ; Kern,1985) ยีสต์ที่สามารถใช้ไนเตรตและนำมาเป็นคอนโทรล ได้แก่ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123

3.3. การหาผลของอายุยีสต์ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้ต่อการผลิตไบโอตินในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงยีสต์ที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YM ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุใน Klett's flask ที่มีความจุ 250 มล. ให้อากาศโดยเขย่าฟลาสค์ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28°ซ วัดการเพิ่มจำนวนยีสต์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำเซลจากระยะ mid log phase และ stationary phase มาเป็นกล้าเชื้อในการตรวจปริมาณการผลิตไบโอตินในระดับขวดเขย่า โดยใช้เครื่องเหวี่ยงแรงสูงเก็บเซลในระยะที่ต้องการ ล้างเซล 2 ครั้ง โดยใช้น้ำเกลือ(0.85% NaCl) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว และล้างเซลอีกครั้งด้วย biotin-free medium นำเซลไปเลี้ยงใน 50 มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อ biotin-free medium ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสค์ความจุ 250 มล. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไบโอติน(ภาคผนวกก ข้อ2) ให้อากาศโดยเขย่าฟลาสค์ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28±1°ซ ปรับปริมาณของเซลตั้งต้นให้มีความขุ่นซึ่งวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 วัดการเจริญของยีสต์โดยวัดน้ำหนักแห้ง วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งที่ยังเหลืออยู่ในฟลาสค์ตามวิธีที่รายงานโดย Somogyi(1952) วัดปริมาณไบโอตินโดยใช้ *Lactobacillus plantarum* ตามวิธีที่รายงานโดย Wright & Skeggs (1944) และ DeMoll & Shine(1986) คำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ(specificgrowth rate, μ) ค่าสัมประสิทธิ์การผลิตเซลต่อหนึ่งหน่วยซับสเตรท($Y_{x/s}$) และค่าสัมประสิทธิ์การผลิตไบโอตินต่อหนึ่งหน่วยซับสเตรทที่ถูกใช้ไป($Y_{p/s}$) เขียนฮีสโตแกรม(histogram)และวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Student ; t-test(Spatz & Johnston,) เพื่อหาข้อสรุปว่าควรใช้ยีสต์ในระยะmid log phase หรือ stationary phase เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไบโอตินและยีสต์สายพันธุ์ใดบ้างที่ผลิตไบโอตินได้ในปริมาณสูงเพื่อนำผลการทดลองไปใช้ในการทดลองต่อไป

I 17341942

3.4. การหาน้ำหนักเซลแห้ง

เตรียมภาชนะบรรจุเซลโดยพับกระทงจากกระดาษฟลอย์ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80°ซ นาน 24 ชม. หลังจากนั้นนำไปเก็บใน desiccatorเป็นเวลา 24 ชม. ชั่งน้ำหนักภาชนะก่อนใส่เซล เก็บเซลจากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มล.โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง Beckman J2-21 ที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลด้วยน้ำกรอง 50 มล. เก็บเซลโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเซลลงในกระทงที่พับจากกระดาษฟลอย์ ล้างกระบอกเซนตริฟิวส์ด้วยน้ำกรอง 1-2 มล. เพื่อให้เซลหลุดจากกระบอกเซนตริฟิวจ์ให้หมด นำกระทงที่บรรจุเซลไปอบที่ 50°ซ เป็นเวลา 24 ชม. ทิ้งให้เย็นใน desiccator นำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง หาน้ำหนักแห้งโดยคำนวณผลต่างระหว่างน้ำหนักกระทงที่บรรจุเซลหลังอบกับน้ำหนักกระทงฟลอย์หลังอบก่อนบรรจุเซล

3.5. วิธีวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส(Somogyi,1952)

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งใช้วิธีที่รายงานโดย Somogyi (1952) แยกยีสต์ออกจากสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°ซ นำส่วนใสมาเจือจาง 100 เท่าและ 10 เท่า ปิเปต 1 มล. ของตัวอย่างสารละลายที่เจือจางแล้วลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายคอปเปอร์คาร์บอเนตตาร์เตรต (ภาคผนวก ข ข้อ 3) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที และทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น หลังจากทำให้เย็นลงแล้วเติมสารละลายอาร์ซิโนโมลิบเดท(ภาคผนวก ข ข้อ 4)ลงไป 1 มล. ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีฟ้า เติมน้ำกลั่นลงไป 5 มล.ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง จากกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ทำได้โดยสารละลายน้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้นต่างกันได้แก่ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำน้ำตาล

กลูโคส 10 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มล. ในโวลุมเมตริกฟลาสต์(volumetric flask) จะได้ความเข้มข้นที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและทดสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งตามวิธีดังกล่าวข้างต้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร จะได้กราฟมาตรฐานดังแสดงใน รูปที่ 1 ภาคผนวก ก ซึ่งใช้ในการทดลองวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งในการทดลองครั้งต่อๆไป

3.6. <u>การตรวจปริมาณไบโอตินที่ผลิตโดยยีสต์</u>

ตรวจปริมาณไบโอตินที่ผลิตโดยยีสต์โดยใช้วิธีทางชีวภาพ ซึ่งประกอบด้วยการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* TISTR 50 ในส่วนน้ำใสหลังจากเก็บเซลแล้วของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีไบโอตินความเข้มข้นต่างๆ หาค่าการเพิ่มจำนวนของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 50 โดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาความเข้มข้นของไบโอตินในส่วนน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้กราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไบโอติน และการเพิ่มจำนวนของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 50 รายละเอียดของการทดลองมีดังนี้

นำ *Lactobacillus plantarum* TISTR 50 ซึ่งเก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอ็มอาร์เอส(ภาคผนวก ก ข้อ 13) ที่ 4°ซ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอ็มอาร์เอส 5 มล. ในหลอดทดลองเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30°ซ ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อโดยวิธี pour plate ในอาหารแข็งเอ็มอาร์เอส บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อพบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น ใช้เข็มเขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเป็นกระสวย มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอ็มอาร์เอสในหลอดทดลอง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำเซลไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแรงสูง(Beckman J2-21) ที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที โรเตอร์ JA-14 ล้างเซล 3 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85% เจือจางความเข้มข้นเซลลง 100 เท่า เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นสองเท่า(double strength) สำหรับตรวจปริมาณไบโอตินตามวิธีที่รายงานโดย Wright & Skeggs(1944) และ Demoll & Shine

(1986) ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจปริมาณไบโอติน 5 มล. บรรจุลงในหลอดทดลองที่ทำความสะอาดมาอย่างดี เติมส่วนน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการตรวจปริมาณไบโอติน 1 มล. และเติมน้ำกลั่น 4 มล. ดังนั้นปริมาตรของสารละลายในแต่ละหลอดเท่ากับ 10 มล. นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอที่อุณหภูมิ 121°ซ 10 นาที และทำให้เย็นลง จากนั้นหยดสารแขวนลอยเซล *Lactobacillus plantarum* TISTR 50 ลงไปหลอดละ 1หยด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจการเจริญของเซลโดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโน เมตร หาค่าความเข้มข้นของไบโอตินจากกราฟมาตรฐานซึ่งสร้างโดยเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* TISTR 50 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจความเข้มข้นของไบโอติน 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 นาโนกรัม.มิลลิลิตร$^{-1}$

3.7. <u>ผลของการเติมกรดพิมีลิคต่อการผลิตไบโอตินระดับขวดเขย่าโดยยีสต์ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้</u>

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3 ใช้ยีสต์ในระยะการเจริญที่เหมาะแก่การสังเคราะห์ไบโอตินซึ่งเป็นผลการทดลองจากข้อ 3.3 โดยหาผลของการเติมกรดพิมีลิคลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไบโอติน ให้ได้ความเข้มข้นของกรดพิมีลิค 0.05, 0.1, 0.2 , 0.3 และ 0.4% วัดการเจริญ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง และปริมาณไบโอตินตามวิธีที่รายงานในข้อ 13, 14 และ 15คำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate , μ) ค่าสัมประสิทธิ์การผลิตเซลต่อหนึ่งหน่วยซับสเตรท($Y_{x/s}$) และค่าสัมประสิทธิ์การผลิตไบโอตินต่อหนึ่งหน่วยซับสเตรทที่ถูกใช้ไป($Y_{p/s}$) เขียนฮีสโตแกรม(histogram) เพื่อวิเคราะห์ผลของกรดพิมีลิคต่อการผลิตไบโอติน และเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของกรดพิมีลิคสำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.8. <u>ผลของกรดพิมีลิคต่อการผลิตไบโอตินโดยยีสต์ในถังหมักขนาด 10 ลิตร</u>

ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองมีสองสายพันธุ์ สายพันธุ์แรกเป็นสายพันธุ์ที่ได้ทำการทดลองแล้วในข้อ 3.7 ว่าเป็นยีสต์ที่ผลิตไบโอตินได้ในปริมาณสูง และกรดพิมีลิคมีผลเพิ่มการผลิตไบโอติน ยีสต์อีกสายพันธุ์หนึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้ทำการทดลองแล้วในข้อ 3.7 พบว่าเป็นยีสต์ที่ผลิตไบโอติน

ได้ในปริมาณต่ำ และกรดพิมีลิคไม่มีผลลดปริมาณการผลิตไบโอติน เลี้ยงยีสต์ในขวดเขย่าที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YM จนได้อายุเซลตามต้องการ เก็บเซล ล้างเซลด้วยน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใส่เซลลงในถังหมักที่บรรจุสารอาหารให้ได้ความขุ่นเริ่มต้น ซึ่งวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 เลี้ยงเซลในสารอาหารที่ไม่มีไบโอตินแต่มีกรดพิมีลิคความเข้มข้นเหมาะสมที่ได้จากการทดลองในระดับขวดเขย่า ปรับอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนเครื่องเฟอร์เมนเตอร์ให้ได้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น(initial DO ; dissolved oxygen) เท่ากับปริมาณ DO ในขวดเขย่าซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีซัลไฟท์ออกซิเดชั่น (Moo-Young & Blanch, 1987) เลี้ยงเซลที่ 28°ซ วัดความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดการเจริญ การใช้น้ำตาลรีดิวซิ่ง และการผลิตไบโอตินโดยใช้วิธีดังกล่าวแล้วข้อ 3.4, 3.5, 3.6 คำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ค่าสัมประสิทธิ์การผลิตเซลต่อหนึ่งหน่วยซับสเตรทและค่าสัมประสิทธิ์การผลิตไบโอตินต่อหนึ่งหน่วยซับสเตรทที่ถูกใช้ไป เขียนฮีสโตแกรม(histogram) เพื่อสรุปผลของกรดพิมีลิคต่อการผลิตไบโอตินโดยยีสต์ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย