บทที่ 4

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

4.1.1 กระบวนการหมัก (Fermentation)

ถังหมัก (Fermentor) รุ่น MINI-JAR-FERMENTOR KMJ ของบริษัท Mituwa, Japan

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HL24ADY ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corparation, Tokyo, Japan

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) รุ่น GFS ของบริษัท Gesells chaft fur Labortechnik, Germany

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Kubota 5100 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20D ของบริษัท Milton Roy, USA

เครื่องวัดและควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Controller) รุ่น Digital pH Controller ของบริษัท Mituwa, Japan

ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น VS-124 ของบริษัท ISSCO, USA

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Julabo ของบริษัท Labertechnik GMBH, Germany

ปั๊มรีด (Peristaltic pump)

1. รุ่น Sj - 1211 ของบริษัท Chromatograph ATTO, Japan
2. รุ่น Microtube Pump MP - 3 ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan

ปั๊มลม (Air compressor) รุ่น BEBICON ของบริษัท Hitachi Co. Ltd., Japan

4.1.2 กระบวนการกรอง (Filtration unit)

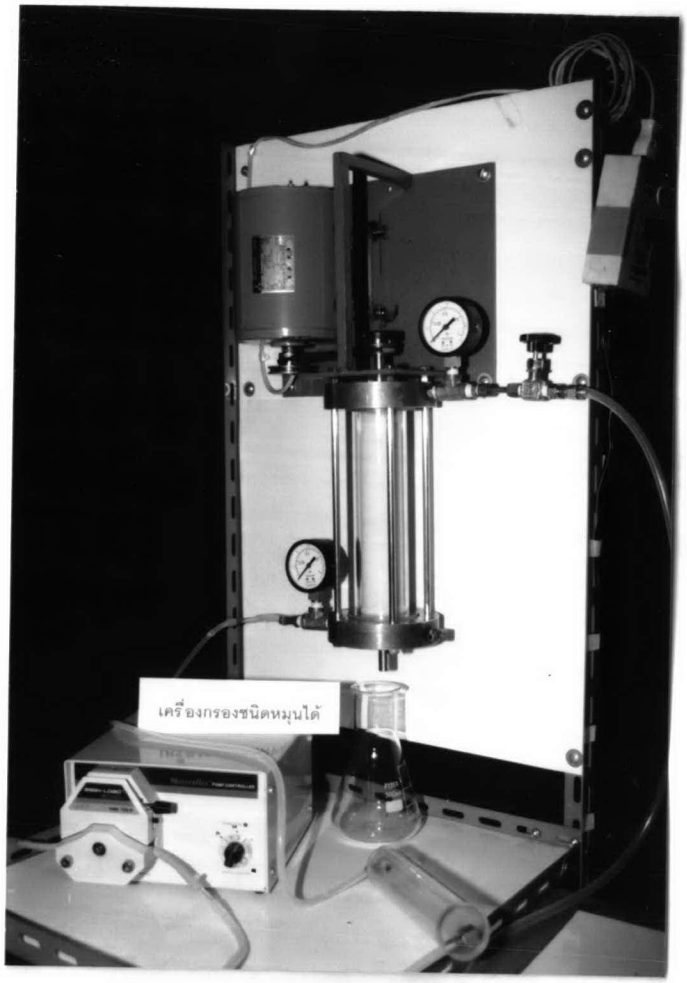
เครื่องกรองชนิดหมุนได้ (Rotary Biofiltration System) แสดงได้ดังรูปที่ 4.1 ประกอบด้วยเยื่อแผ่นเซรามิกขนาด 0.2 ไมโครเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 48 มิลลิเมตร ยาว 230 มิลลิเมตร มีพื้นที่การกรอง 343.8 ตารางเซนติเมตร ระยะระหว่างผนังเยื่อแผ่นด้านนอกกับผนังท่อด้านในกว้าง 7.25 มิลลิเมตร แสดงดังรูปที่ 4.2

มอเตอร์ ขนาด 1/4 แรงม้า ของบริษัท Masterflex, U.S.A.

ปั๊มรีด (Peristaltic Pump) ของบริษัท Masterflex , U.S.A.

เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer) ของบริษัท Heido2lph, Germany

เกจวัดความดัน (Pressure Gauge)



รูปที่ 4.1 แสดงภาพถ่ายเครื่องกรองชนิดหมุนได้

รูปที่ 4.2 แสดงภาพถ่ายเยื่อแผ่นเซรามิก

4.2 <u>เคมีภัณฑ์</u>

ฟรุกโตส ของบริษัท Merck, Germany

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท GIBCO BRL, Scotland

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [Na_2HPO_4] ของบริษัท Carloerba, Italy

แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [KH_2PO_4] ของบริษัท Merck, Germany

แมกนีเซียมซัลเฟต [$MgSO_4.7H_20$] ของบริษัท FLUKA, Switzerland

แคลเซียมคลอไรด์ [$CaCl_2$] ของบริษัท Merck, Germany

ซิงค์ซัลเฟต [$ZnSO_4.7H_20$] ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia

เฟอรัสซัลเฟต [$FeSO_4.7H_2O$] ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia

แอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$]ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia

กรดบอริก [H_3BO_3] ของบริษัท Merck, Germany

โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia

กรดไฮโดรคลอริก [HCl] ของบริษัท AJAX CHEMICALS, Australia

แอมโมเนียมคลอไรด์ [NH_4Cl] ของบริษัท Carloerba, Italy

4.3 <u>เชื้อจุลินทรีย์</u>

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเตรียมน้ำหมักที่ใช้ในการทดลอง คือ <u>Alcaligenes eutrophus</u> สายพันธุ์ ATCC17697 สั่งซื้อมาจาก American Type Culture Collection, USA

4.4 วิธีการทดลอง

4.4.1 การทดลองเรื่องการหมัก

4.4.1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ถ่ายเชื้อ Alcaligenes eutrophus ATCC17697 จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในอาหารแข็งเอียงลงในอาหารเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง

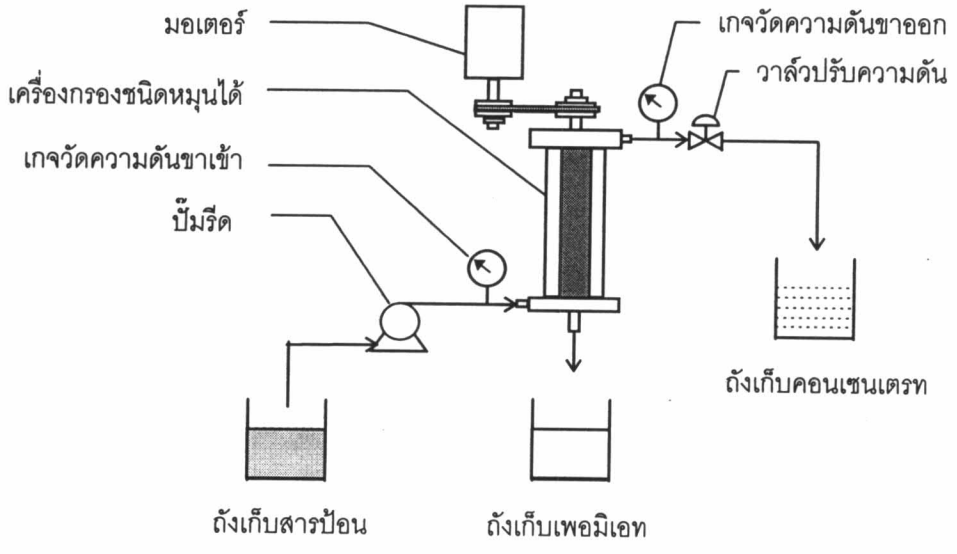
4.4.1.2 กระบวนการหมัก

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบกึ่งต่อเนื่อง โดยใช้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสเริ่มต้นเท่ากับค่า 9 กรัมต่อลิตร ทำการเตรียมสารอาหารปริมาตร 2700 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 3 ลิตร ทำให้ปลอดเชื้อด้วยไอน้ำร้อน (steam sterilization) จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ลงในถังหมัก ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ใช้อัตราการกวนประมาณ 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลและความเข้มข้นของเซลล์ หมักจนกระทั่งความเข้มข้นของเซลล์คงที่ตามที่ต้องการ จึงทำการถ่ายเชื้อออกจากถังหมักด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technic) เพื่อนำไปใช้ทดลองเรื่องการกรองต่อไป

4.4.2 การทดลองเรื่องการกรอง (การทดลองแบบไม่มีการเวียนเซลล์กลับ)

เตรียมสารป้อนโดยนำเชื้อที่ได้จากการหมักผสมให้เข้ากับสารอาหารด้วยเครื่องกวนสาร เก็บตัวอย่างสารป้อนเริ่มต้นเพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นเริ่มต้น จากนั้นใช้ปั๊มรีดดูดสารละลายผ่านสายยางเข้าทางด้านล่างของเครื่องกรองชนิดหมุนได้ ด้วยอัตราการป้อนสารเริ่มต้น 0.003 ล.บ.เมตรต่อชั่วโมง รอจนสารละลายเต็มโมดูล ปล่อยให้สารละลายไหลผ่านสาย

รีเทนเททประมาณ 1 นาที จากนั้นจึงทำการปรับให้เยื่อแผ่นหมุน เพิ่มอัตราการป้อนของสารเริ่มต้นจนได้เท่ากับ 0.013 ล.บ.เมตรต่อชั่วโมง ปรับวาล์วควบคุมความดันให้ได้ความดันที่ต้องการ ทำการวัดปริมาตรเพอมิเอททุก 2 นาที และเก็บตัวอย่างเพอมิเอทเพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์ทุก 4 นาที ทำการทดลองเป็นเวลา 40 นาที หลังจากทำการทดลองทุกครั้งให้ล้างผิวเยื่อแผ่นด้วยน้ำปราศจากแร่ธาตุประมาณ 10 นาที เพื่อทำความสะอาดผิวหน้าของเยื่อแผ่น จากนั้นนำเยื่อแผ่นแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ เพื่อย่อยสลายเซลล์ที่ฝังอยู่บนเยื่อแผ่นออก เมื่อจะทำการทดลองครั้งต่อไปต้องทำการทดลองกรองน้ำ และเปรียบเทียบผลที่ได้กับค่าฟลักซ์มาตรฐานเพื่อตรวจสอบความสะอาดของผิวเยื่อแผ่นทุกครั้ง แผนภาพชุดเครื่องมือการกรองแบบไหลขนานกับเยื่อแผ่นโดยใช้เครื่องกรองชนิดหมุนได้ แสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 แผนภาพชุดเครื่องมือการกรองแบบไหลขนานกับเยื่อแผ่นโดยใช้เครื่องกรองชนิดหมุนได้

4.4.3 <u>การทดลองเรื่องการกรอง</u> (การทดลองแบบมีการเวียนเซลล์กลับ)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองแบบที่ไม่มีการเวียนเซลล์กลับข้างต้น แต่การทดลองแบบไม่มีการเวียนเซลล์กลับข้างต้นนั้นจะไม่มีการนำเอาสารละลายในสายป้อน สายรีเทนเทท และสายเพอมิเอทมารวมกันอีก แต่การทดลองแบบมีการเวียนเซลล์กลับนั้นจะนำสารละลายในสายรีเทนเททมารวมกับสารละลายในสายป้อนอีกครั้ง เพื่อทำให้สารละลายในสายป้อนเข้มข้นขึ้นเรื่อย ๆ

4.4.4 <u>การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์</u>

ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นเซลล์ในสารละลายเริ่มต้น และสายคอนเซนเตรท โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ของบริษัท MILTON ROY รุ่น SPECTRONIC 20 D ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบมาตรฐาน แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ดูภาคผนวก ข) จะได้ความเข้มข้นเซลล์ในสารละลายนั้น ๆ

4.4.5 <u>การวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์</u>

ทำการวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ ในสารละลายเริ่มต้นและสารละลายเพอมิเอท โดยใช้แผ่นนับเซลล์ (haemacytometer) ของบริษัท BOECO กับ กล้องจุลทรรศน์ ของบริษัท OLYMPUS รุ่น BH-2 ที่มีกำลังขยายสูงสุด 1000 เท่า