บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1.1 ถังหมัก (fermenter)

ถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท L.E.Marubishi ประเทศญี่ปุ่น รุ่น MD-300 ตัวถังหมักเป็นแก้ว ใบพัด(impeller)เป็น 6-blade turbine ตัวควบคุมสภาวะเป็น bioprocess controllerรุ่น MDIAC-SS เครื่องอัดอากาศ (air compressor) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (circulation type handy cooler) รุ่น TRL-108 เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

1.1.2 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychrotherm incubator shaker)

เครื่องเขย่าที่ใช้เป็นเครื่องเขย่าแบบหมุน (rotary shaker) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท INFORS ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

1.1.3 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น spectronic 21

1.1.4 เครื่องอบฆ่าเชื้อ (autoclave)

เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น รุ่น HA-26

1.1.5 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Olympus Optical จำกัด ประเทศญี่ปุ่น รุ่น CHA

1.1.6 แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (counter chamber)

เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Bocco ประเทศเยอรมัน รุ่น Neubauer Bright Line

1.1.7 เครื่องกลั่นหาไนโตรเจน (unit distillation)

เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Laboratoriums-Technik AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ รุ่น Buchi 315

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1.กรดซัลฟุริก	E.Merck ประเทศเยอรมัน
2.กรดมะนาว	Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
3.คอปเพอร์ซัลเฟต	E.Merck ประเทศเยอรมัน
4.โซเดียมเททระบอเรต	Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
5.โซเดียมไฮดรอกไซด์	E.Merck ประเทศเยอรมัน
6.ไทโอยูเรีย	E.Merck ประเทศเยอรมัน
7.แป้งมันสำปะหลัง	บริษัท ไทยวา ประเทศไทย
8.โพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต	E.Merck ประเทศเยอรมัน
9.โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	E.Merck ประเทศเยอรมัน
10.โพแทสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต	BDH Chemicals ประเทศอังกฤษ
11.โพแทสเซียมโบรไมด์	BDH Chemicals ประเทศอังกฤษ
12.ฟีนอล	E.Merck ประเทศเยอรมัน
13.เมทิลแอลกอฮอล์	Jt.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
14.แมกนีเซียมซัลเฟต	Carlo erba ประเทศอิตาลี
15.แอมโมเนียมซัลเฟต	E.Merck ประเทศเยอรมัน
16.เฮปเทน	E.Merck ประเทศเยอรมัน
17.ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	E.Merck ประเทศเยอรมัน
18.เอนไซม์ BAN และ Dextrozyme	Novo Nordiskประเทศเดนมาร์ก

2. เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บรักษา และการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

2.1 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อรา A. niger A185 ซึ่งคัดเลือกได้จากการวิจัยของ ศยามล นองบุญนาก (2534)

2.2 การเก็บรักษาเชื้อรา

ถ่ายสปอร์ของเชื้อรา A. niger A185 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (ภาคผนวก ก 1) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

2.3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา

ถ่ายสปอร์ของเชื้อรา A. niger A185 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน ทำเป็นสปอร์แขวนลอย โดยใช้สารละลายกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์กับ tween 80 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ จำนวนสปอร์เท่ากับ 1.0×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.3.2 การเตรียมหัวเชื้อ

ปิเปตสปอร์แขวนลอยจากข้อ 2.3.1 ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง นอกจากจะระบุเป็นอย่างอื่น

2.3.3 การเลี้ยงเชื้อ A. niger A185 เพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร

ปิเปตหัวเชื้อจากข้อ 2.3.2 ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก 3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทดลองขนาด

250 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที

2.3.4 การเลี้ยงเชื้อ A. niger A185 เพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรเริ่มต้น 3.5 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อตามข้อ 2.3.2 ปริมาณ 0.6 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตามภาคผนวกที่ ก 4 ควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 v.v.m. อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที นอกจากจะระบุเป็นอย่างอื่น

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมัก มากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เก็บสารละลายไปวิเคราะห์สารต่างๆ ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 150-200 มิลลิลิตร นำไปอบแห้งโดยใช้ไมโครเวฟที่ตำแหน่ง defrost นาน 30 นาที จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นใน desiccator ก่อนนำมาชั่งน้ำหนัก หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.2 ความเป็นกรดด่าง

โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

3.3 ของแข็งทั้งหมด

ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ใส่ plate ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบแห้งโดยใช้ไมโครเวฟที่ตำแหน่ง defrost นาน 30 นาที จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นใน desiccator ก่อนนำมาชั่งน้ำหนัก หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 น้ำตาลทั้งหมด

โดยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟุริก (Dubois, 1956)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ในน้ำ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร อย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที เขย่าให้เข้ากัน ตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เขย่า นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วง 5-50 ไมโครกรัม (ภาคผนวก ค 1) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.5 น้ำตาลรีดิวซ์

โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Bernfeld, 1955)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNSA reagent (ภาคผนวกที่ ข 1) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วง 0.4-2.0 มิลลิกรัม (ภาคผนวก ค 2) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.6 ไนโตรเจน

หาในรูปแอมโมเนียไนโตรเจน โดยใช้เครื่องกลั่น Buchi (Steyermark, 1951)

นำสารละลายตัวอย่าง 10.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการกลั่นจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้น โดยใช้สารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข 2) อยู่ 2-3 หยด กลั่นตัวอย่างจนกระทั่งสารละลายกรดบอริกมีปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟุริก

3.7 ฟอสเฟต

โดยใช้วิธีโมลิบเดทบลู (molybdate blue method) (Vogel, 1961)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบ (cation exchange column) เพื่อขจัดโลหะหนัก โดยใช้ Lewatit ของ Byer เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวชะ (eluant)นำไปหาปริมาณฟอสเฟตต่อไป

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโมลิบเดทปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข 3.1) และสารละลายไฮดราซินซัลเฟตปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข 3.2) เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง ปรับปริมาตรอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 830 นาโนเมตร (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวณปริมาณฟอสเฟตจากกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัสในช่วง 0 - 50 ไมโครกรัม (ภาคผนวก ข 3.3 และภาคผนวก ค 3) หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

3.8 กรดมะนาว

โดยใช้วิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน (Stern, 1957)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 2 นอร์มัล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายโพแทสเซียมโบรไมด์เข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 5 หยด และสารละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 5 เปอร์เซนต์ในน้ำ จำนวน 10 หยด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที แช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 6 เปอร์เซนต์ ทีละหยดจนสารละลายใส เติมเฮปเทนปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่านาน 10 นาที ปิเปตสารละลายชั้นเฮปเทน(ชั้นบน) 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายไทโอยูเรีย (ภาคผนวก ข 4) ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ปิดฝา เขย่านาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดสารละลายชั้นไทโอยูเรีย (ชั้นล่าง) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร (ใช้เฮปเทนเป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวณปริมาณกรดมะนาวจากกราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วง 10 - 40 ไมโครกรัม (ภาคผนวก ค 4) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร