บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

2.1.1.1 เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.1.2 เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (rotary incubator shaker) รุ่น G – 25 ของ บริษัท New Brunswick Scientific Co. , Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.1.3 เครื่องชั่งแบบละเอียด (electronic balance) รุ่น FX – 180 ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.4 เครื่องชั่งแบบหยาบ (electronic balance) รุ่น FX – 3000 ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge) รุ่น TOMY MC – 15A ของบริษัท TOMY SEIKO ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.7 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น F-13 ของบริษัท HORIBA ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของ บริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.1.9 เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจนรุ่น Buchi 345 Distillation unit และรุ่น Buchi 345 Digestor ของบริษัท Buchi Laboratory Techniques Ltd., ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

2.1.1.10 ตู้อบแห้ง (oven) รุ่น UL-80 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

2.1.1.11 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น TE – 8D ยี่ห้อ Tempette ของบริษัท Techne ประเทศอังกฤษ

2.1.1.12 เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) รุ่น Buchi 190 ของบริษัท Buchi Laboratory Techniques Ltd., ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

2.1.1.13 เครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ (evaporator) รุ่น RE 50 เครื่องดูดให้เป็นสูญญากาศ (vacuum aspirator) รุ่น BP – 51 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.1.14 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน รุ่น NA-2000 และ เครื่องบันทึกผล รุ่น EAGER200 ของบริษัท Fisons Instruments ประเทศอังกฤษ

2.1.1.15 เครื่องวัดปริมาณเกลือ (compact salt meter) รุ่น C-121 ของบริษัท HORIBA ประเทศญี่ปุ่น

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	ปริษัทผู้ผลิตหรือจำหน่าย	
กรดบอริก	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
กรดไฮโดรคลอริก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดซิตริก	วิทยาศรม	ประเทศไทย
คอปเปอร์ซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจน ฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โพแทสเซียมซัลเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โพแทสเซียมคลอไรด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
Titron X-100	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เมธิลเรด	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เมทธิลีนบลู	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
โฟลินฟีนอล	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
เอทานอล	กรมสรรพสามิต	ประเทศไทย
เอนไซม์พาเพน (ของแข็ง)	BDH	ประเทศอังกฤษ
เอนไซม์พาเพน (ของเหลว)	Rohm GmbH	ประเทศเยอรมัน
เอนไซม์เฟลเวอร์ไซม์	East asiatic	ประเทศไทย
เอนไซม์นิวเทรส	East asiatic	ประเทศไทย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นยีสต์สด (compressed yeast) สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการทำขนมปัง จากบริษัท ไทยเมจิ-ฟาร์มาซูติคัล จำกัด

2.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเร่งการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

2.3.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม

ทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ โดยนำยีสต์สด 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเติมน้ำปราศจากไอออนให้ปริมาตรทั้งหมดประมาณ 26 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยมาตรวัดความเป็นกรดด่าง ทำการแปรค่าความเป็นกรดด่าง ตามข้อ 2.3.1.1 จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ปริมาตรทั้งหมดได้ 28 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบหมุนโดยแปรอุณหภูมิ ตามข้อ 2.3.1.2 และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตลอดการทดลองตัวแปรที่ศึกษาคือ

2.3.1.1 ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 3.0 4.0 5.0 และ 6.0 (ปรับค่าความเป็นกรดด่างโดยใช้ กรดไฮโดรคลอริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์)

2.3.1.2 อุณหภูมิ 35 40 45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส

ประเมินผลด้วยการติดตามปริมาณโปรตีนในออโตไลเสต โดยนำตัวอย่างจากแต่ละภาวะปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นของแข็งและของเหลว แยกส่วนน้ำไว้ นำส่วนกากมาล้างโดยเติมน้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำที่ได้นี้มารวมกับส่วนน้ำส่วนแรก จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 มิลลิลิตร นำสารที่ได้มาวิเคราะห์ ตามข้อ 2.4.2.1 – 2.4.2.2

2.3.2 ศึกษาผลของสารเคมีต่อการเร่งการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

ทดลองหาชนิดของสารเคมีที่เหมาะสมโดยเติมสารเคมีลงในสารละลายของยีสต์ที่ควบคุมให้มีการย่อยสลายโดยใช้ภาวะที่เลือกได้จากข้อ 2.3.1 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ตลอดการทดลอง โดยตัวแปรที่ศึกษาคือ

2.3.2.1 ชนิดของสารเคมีที่ใช้ ได้แก่ Titron X – 100 โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ และเอทานอล

2.3.2.2 ปริมาณของสารเคมีที่ใช้ ได้แก่ Titron X – 100 1.0 และ 2.5 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) โพแทสเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ 5.0 7.5 และ 10.0 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเอทานอล 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 % (ปริมาตรต่อปริมาตร)

2.3.2.3 นำ 2 ภาวะที่ให้ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตสูงสุด ที่ได้จากการเติมสารเคมี 2 ชนิด มาทำการทดลองร่วมกัน

2.3.3 ศึกษาผลของเอนไซม์ต่อการเร่งการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

2.3.3.1 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

ทำการทดลองโดยแปรค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 – 7.5 โดยใช้อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.1 ละลายเคซีนในสารละลายบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ บ่มเคซีนและเอนไซม์ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปิเปตต์เคซีน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการเจือจางที่เหมาะสมแล้ว ทำการผสมให้เข้ากัน ทำการบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลอง ทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ 10 นาที แล้วเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) หลอดละ 3 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยาทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 10 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน ปิเปตต์ส่วนใสแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์ (ภาคผนวก ก - 1) โดยเทียบจากโปรตีนจากกราฟมาตรฐานไทโรซีน ในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค - 1)

2.3.3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเร่งการย่อยสลายตัวเองของยีสต์โดยการเติมเอนไซม์

ทดลองหาภาวะในการเร่งการย่อยสลายโดยเติมเอนไซม์ปริมาณ 1,000 ยูนิตเอนไซม์ต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง ลงในสารละลายของยีสต์ที่เตรียมไว้ควบคุมให้มีการย่อยสลายโดยใช้ภาวะในข้อ 2.3.1.1 – 2.3.1.2 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ตลอดการทดลอง โดยตัวแปรที่ศึกษาคือ

2.3.3.2.1 ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 – 7.5

2.3.3.2.2 ชนิดของเอนไซม์ ได้แก่ พาเพน นิวเทรส และเฟลเวอร์ไซม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.3.2.3 ชนิดและค่าความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ ได้แก่ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ อะซิเตตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข - 1)

2.3.4 การเร่งการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ในการทดลองขนาด 4.5 ลิตร

เปรียบเทียบผลของปริมาณโปรตีนข้อ 2.3.1 2.3.2 และ 2.3.3 แล้วนำภาวะที่ดีที่สุดมาทำการทดลองในขนาด 4.5 ลิตร เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับในระดับขวดเขย่า โดยใช้ยีสต์สด 1500 กรัมละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 4.5 ลิตร หลังจากการทดลอง นำออโตไลเสตมากรองเพื่อแยกเซลล์ และส่วนที่เป็นของเหลว เก็บตัวอย่างของเหลวไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ปริมาณเกลือ และส่งตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนที่หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล นำของเหลวส่วนที่เหลือมาทำการระเหยเอาน้ำออก โดยเครื่องระเหยเป็นไอให้มีความเข้มข้น ประมาณ 20 บริกส์ แล้วนำมาอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) นำตัวอย่างสารสกัดจากยีสต์ที่ได้มาหาค่าการละลาย (solubility) ดังข้อ 2.4.2.4 และปริมาณเกลือในสารสกัดจากยีสต์ ดังข้อ 2.4.2.5

2.4 วิธีวิเคราะห์

2.4.1 การวิเคราะห์ในเซลล์ยีสต์

2.4.1.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ทำการชั่งน้ำหนักยีสต์สดบนกระทงอะลูมิเนียมฟอยล์ (aluminium foil) ที่ทำการอบและชั่งน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำกระทงอะลูมิเนียมฟอยล์ที่มีเซลล์ยีสต์อยู่ด้านบนมาทำการอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง (desicator) แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด หักน้ำหนักของกระทงอะลูมิเนียมฟอยล์ออกจะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง หน่วยเป็นกรัมเซลล์แห้งต่อกรัมยีสต์สด

2.4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน NA2000 และ เครื่องบันทึกผล EAGER200

ชั่งสารตัวอย่างโดยใส่ใน tin container ทำการบรรจุ tin container ลงใน sealing device เพื่อปิด tin capsule แล้วนำไปใส่ใน autosampler ผลการวิเคราะห์โปรตีนมีหน่วยเป็นร้อยละของโปรตีนต่อน้ำหนักเซลล์ยีสต์

ภาวะที่ใช้ในการ วิเคราะห์โดยเครื่องวิเคราะห์โปรตีน

อุณหภูมิเตาเผาสารตัวอย่าง : Left furnace : 900 ºC

Right furnace : 780 ºC

ก๊าซเชื้อเพลิง : ออกซิเจน

ชนิดสารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ (column) : Activated Carbon

อุณหภูมิคอลัมน์ : 120 ºC

อุณหภูมิอินเจกเตอร์ (injector) : 190 ºC

เครื่องตรวจหา (detector) : TCD (Thermal conductivity detector)

ก๊าซพา (carrier gas) : ฮีเลียม

ความดันเกจ (gauage pressure) : 400 kPa

2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารสกัดจากยีสต์

2.4.2.1 ค่าความเป็นกรดด่าง

วัดโดยใช้มาตรวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

2.4.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี (Lowry, 1951)

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย ง. 2 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข - 2.4) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลายโฟลิน 0.2 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข - 2.5) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ก - 2) ได้จากกราฟมาตรฐานโปรตีน ในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 0.25 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค - 2) หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

2.4.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen) โดยวิธี Kjeldahl

ตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดกลั่น (Kjeldahl flask) ขนาด 300 มิลลิลิตรเติมของผสมของเกลือ 7 กรัม (ภาคผนวก ข - 3.1) และเติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุม (digestor) ด้วยเครื่อง Buchi 425 ในตู้ควันจนได้สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรและเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร รองรับสารที่กลั่นออกมาด้วยสารละลายกรดบอริกที่มีความเข้มข้น 4 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ผสม (ภาคผนวก ข - 3.2) อยู่ 3 หยด กลั่นตัวอย่างจนกระทั่งสารละลายกรดบอริกมีปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกจนได้สารละลายสีม่วง โดยที่

$$\text{ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด} = (A-B) \times N \times 1.4$$

โดยกำหนดให้

A = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง

B = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรตกับแบลงค์

N = ความเข้มข้น (นอร์แมล) ของกรดไฮโดรคลอริก

2.4.2.4 การหาค่าการละลาย (solubility)

ชั่งสารสกัดจากยีสต์ชนิดผง 1 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนครั้งละ 1 มิลลิลิตร เขย่าและสังเกตการละลาย ทำการทดลองจนสารสกัดจากยีสต์สามารถละลายได้หมด โดยสังเกตจากความใสของสารแขวนลอย นำผลที่ได้มาทำการคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์สารสกัดจากยีสต์ต่อน้ำปราศจากไอออน

2.4.2.5 การตรวจวัดปริมาณเกลือ โดยใช้เครื่อง Compact salt meter

นำสารละลายสารสกัดจากยีสต์ 1 % (น้ำหนักโดยปริมาตร) หยดลงในช่องตรวจวัด อ่านค่าความเข้มข้นเกลือที่ได้ โดยมีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย