บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์การทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Rotary Incubator shaker) รุ่น G25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. เครื่องเขย่าผสม (Vortex) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

3 .เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bousch & Lomb Incorporated ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KR-2000T ของบริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น

5. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น PHM82 ของบริษัท Radiometer Copenhagen ประเทศเดนมาร์ก

6. เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น KT-30SD ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น

7. ชุดถังหมักขนาด 5 ลิตร ประกอบด้วย

7.1 เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (Circulation type hardy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

7.2 เครื่องอัดอากาศ (Air compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น

7.3 ชุดควบคุมภาวะ (Bioprocess controller) รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น

7.4 ถังหมักขนาด 5 ลิตร พร้อมใบพัดแบบเทอร์ไบน์ (Fermenter) รุ่น MD-300-5L ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น

7.5 หัวตรวจวัดความเป็นกรดด่าง (pH combination electrode) รุ่น D-26 ของบริษัท TOA Electronics Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

7.6 หัวตรวจวัดออกซิเจนที่ละลาย (Dissolved oxygen electrode) รุ่น OE-8270G ของบริษัท TOA Electronics Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

8. ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar flow) รุ่น NK System Clean Bench ประเทศญี่ปุ่น

9. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น MTR 152 ของบริษัท Sanyo Electric Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

10. ตู้อบแห้ง (Oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

11. หน่วยกรองเซลล์ ประกอบด้วย

11.1 กระดาษกรอง Whatman GF/C ของบริษัท Whatman International Ltd. ประเทศอังกฤษ

11.2 เครื่องอัลทราฟิลเทรชัน (Ultrafiltration) รุ่น Amicon ultrafiltration ของบริษัท W.R. Grace Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา

11.3 ปั๊มชนิดเพอริสตอลติก รุ่น SMP-23 ของบริษัท EYELA ประเทศญี่ปุ่น

12. หน่วยแยกแอล-ไลซีนจากน้ำหมัก ประกอบด้วย

12.1 คอลัมน์แก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.70 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร

12.2 เรซินชนิดแลกเปลี่ยนไอออนบวก รุ่น Lewatit S 100 ของบริษัท Bayer Co., Ltd. ประเทศเยอรมัน

2.1.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 รายชื่อสารเคมีและบริษัทผู้ผลิต

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ	เกรดที่ใช้
กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	Sigma	สหรัฐอเมริกา	Analytical
กรดฟอสฟอริก	Carlo Erba	อิตาลี	Analytical
กรดอะซิติกล้วน	Merck	เยอรมัน	Analytical
กรดไฮโดรคลอริก	Merck	เยอรมัน	Analytical
ดีแอล-อลานีน	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์	Lab
โซเดียมคลอไรด์	Merck	เยอรมัน	Lab
โซเดียมไฮดรอกไซด์	Merck	เยอรมัน	Lab
เดรกซ์โทรส(กลูโคส)	สงวนชัยเคมี	ไทย	Commercial
ไทอะมีนโมโนไฮโดรคลอไรด์	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์	Lab
ไบโอติน	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์	Lab
แบกโต เปปโตน	Difco	สหรัฐอเมริกา	Lab

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ	เกรดที่ใช้
มารีนเปปโตน	Seagarden	นอร์เวย์	Food
เฟอรัสซัลเฟต	Merck	เยอรมัน	Lab
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์	Lab
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	Merck	เยอรมัน	Lab
วุ้นผง	พัฒนสินเอ็นเตอร์ไพรส์	ไทย	Commercial
สารสกัดจากเนื้อวัว	Difco	สหรัฐอเมริกา	Lab
สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ไทย	Commercial
สารสกัดจากยีสต์	Seagarden	นอร์เวย์	Food
เอทานอล 95%	กรมสรรพสามิต	ไทย	Commercial
แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	กรเกียรติ	ไทย	Commercial

หมายเหตุ IBGE = สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

2.2.1 แบคทีเรีย *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21798

2.2.2 แบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* KY9714

2.2.3 แบคทีเรีย *Corynebacterim glutamicum* RTS32

2.3 วิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

2.3.1 เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากหลอดที่ไลโอฟิลไลซ์ไว้ลงในอาหารเหลว (ภาคผนวก ข) บ่มบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.3.2 ใช้ลูปแตะเชื้อที่เจริญในน้ำหมักลากบนอาหารแข็งเอียง(slant agar)ที่อยู่ในหลอดทดลอง ,บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ดูดอาหารเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารแข็งเอียงที่เชื้อเจริญเต็มที่ แล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อให้ละลายลงในอาหารเหลว ดูดมา 2 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเหลวที่ฆ่าเชื้อ

แล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาวัดการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ทุก 2 ชั่วโมง

2.5 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์

ดูดอาหารเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารแข็งเอียงที่เชื้อเจริญเต็มที่ แล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อให้ละลายลงในอาหารเหลว ดูดมา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร18 มิลลิลิตร บรรจุในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ได้ 2.0

2.6 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

นำเชื้อจุลินทรีย์

1. *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21798
2. *Corynebactium glutamicum* KY9714
3. *Corynebactium glutamicum* RTS32

เตรียมกล้าเชื้อ ตามวิธีข้อ 2.5 10 มิลลิลิตร ของเชื้อแต่ละชนิด ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตแอล-ไลซีน ทั้ง 2 สูตร(ภาคผนวก ข) ปริมาตรอาหารเหลว 90 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 64 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ตั้งแต่เริ่มการหมักจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

2.7 การผลิตแอล-ไลซีนในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบแบตช์

ทำการหมักแบบแบตช์โดยมีปริมาตรการทำงานทั้งหมด 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เติมสารป้องกันการเกิดฟอง (adecanol) ควบคุมภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0 โดยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 โมลาร์ เตรียมกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตแอล-ไลซีน สูตรที่ 1 เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ตั้งแต่เริ่มการหมักจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

2.7.1 ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญและการผลิตแอล-ไลซีน โดยใช้ bacto peptone , marine peptone และสารสกัดจากยีสต์

ทำการหมักแบบแบตช์โดยมีปริมาตรการทำงานทั้งหมด 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เติมสารป้องกันการเกิดฟอง (adecanol) ควบคุมภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการ

กวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0 โดยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 โมลาร์ เตรียมกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตแอล-ไลซีน สูตรที่ 1 โดยแปรแหล่งไนโตรเจนในอาหาร ได้แก่ bacto peptone, marine peptone และสารสกัดจากยีสต์ เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ตั้งแต่เริ่มการหมักจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

2.7.2 ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ 130 , 110 และ 90 กรัมต่อลิตร

ทำการหมักแบบแบตช์โดยมีปริมาตรการทำงานทั้งหมด 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เติมสารป้องกันการเกิดฟอง(adecanol) ควบคุมภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0 โดยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 27 เปอร์เซ็นต์ เตรียมกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตแอล-ไลซีน สูตรที่ 1 โดยใช้สูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจากข้อ 2.7.1 และแปรระดับน้ำตาลเริ่มต้นในถังหมักที่ความเข้มข้น 130 ,110 และ 90 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ตั้งแต่เริ่มการหมักจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

2.8 การผลิตแอล-ไลซีนในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบเฟดแบตช์

ช่วงแรกทำการหมักแบบแบตช์ตามข้อ 2.7.2 หมักจนกระทั่งเชื้อใช้น้ำตาลลดลงระดับหนึ่ง จึงเปลี่ยนเป็นการหมักแบบเฟดแบตช์โดยเติมน้ำตาลความเข้มข้น 600 กรัมต่อลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ ศึกษาผลของระดับน้ำตาลที่ควบคุมไว้ที่มีต่อการเจริญและการผลิตแอล-ไลซีน

2.9 การผลิตแอล-ไลซีนในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบเฟดแบตช์ โดยใช้เทคนิค extractive fermentation

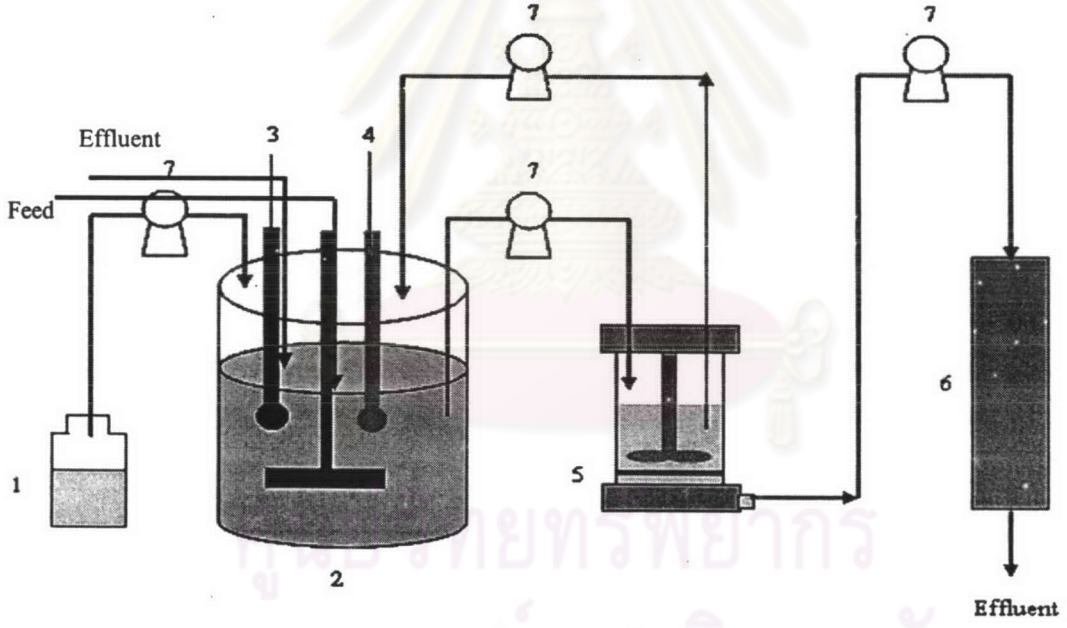
ทำการฆ่าเชื้อในหน่วยกรองเซลล์ ซึ่งหน่วยกรองเซลล์ดัดแปลงมาจากเครื่องอัลทราฟิลเทรชัน ใช้กระดาษกรอง Whatman GF/C เป็นตัวกรองเซลล์ โดยใช้เครื่องสูบหมุนเวียนเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เข้าไปในหน่วยกรองเซลล์เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำขจัดไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นนำไปต่อเข้ากับถังหมัก ช่วงแรกทำการหมักแบบเฟดแบตช์ตามข้อ 2.8 จนกระทั่งอัตราการผลิตแอล-ไลซีนลดลง จึงเริ่มเวียนเซลล์ออกจากถังหมักเข้าสู่หน่วยกรองเซลล์แล้วหมุนเวียนกลับไปในถังหมัก ส่วนน้ำหมักส่วนที่กรองผ่านหน่วยกรองเซลล์จะนำไปผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนบวก ซึ่งใช้ตามภาวะที่ ภูวะนัย จริยวรานุกูล (55) ศึกษามาแล้ว และเวียนกลับเข้าถังหมักอีก โดยให้อัตราการไหลของน้ำหมักที่ดึงออกจากถังหมักเพื่อเข้าสู่หน่วยกรองเซลล์และอัตราการไหลของน้ำหมักที่เวียนกลับเข้าถังหมักเท่ากับ 800 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง อัตราการไหลของน้ำหมักที่ออกจากหน่วยกรองเซลล์ก่อนเข้าคอลัมน์เรซินแลกเปลี่ยนไอออนบวกและอัตราการ

ไหลของน้ำหมักที่เข้าคอลัมน์เรซินแลกเปลี่ยนไอออนบวกเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (รูปที่ 2.1) เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์แอล-ไลซีนและน้ำตาลเพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับการหมักแบบเฟดแบตช์

2.10 วิธีการวิเคราะห์

2.10.1 การวิเคราะห์หาปริมาณแอล-ไลซีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

วิเคราะห์ปริมาณแอล-ไลซีนโดยวิธีสเปกโตรฟอโทเมทตริก ตามวิธีของ Chinard (56) โดย นำตัวอย่างน้ำหมักที่มาปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนใสที่ได้มา 1 มิลลิลิตร ทำให้มีสภาพเป็นกรดด้วยการเติมกรดอะซิติกล้วน1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมนินไฮดรินรีเอเจนต์ (ninhydrin reagent)1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้สนิท นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาเติม กรดอะซิกล้วน 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมกรดอะซิติกล้วนอีก 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้แอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.05-0.30 กรัมต่อลิตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์กับค่าการดูดกลืนแสง



1. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 27 เปอร์เซ็นต์
2. ถังหมักขนาด 5 ลิตร
3. pH probe
4. D.O. probe
5. หน่วยกรองเซลล์
6. คอลัมน์เรซินแลกเปลี่ยนไอออนบวก
7. ปั๊ม

รูปที่ 2.1 การผลิตแอล-ไลซีนด้วยกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีระบบเวียนเซลล์และน้ำหมัก

2.10.2 การวัดปริมาณเซลล์จากค่าการดูดกลืนแสง

นำน้ำหมักที่เก็บมาแต่ละช่วงเวลามาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเหลวชนิดเดียวกันเป็นตัวเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และน้ำหนักเซลล์แห้ง

2.10.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

วิธีวิเคราะห์ทำตามวิธีของ Bernfeld (57) เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.1-1.0 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย