บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Alphaphot-2 YS2	Nikon Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (Heamacytometer)	Neubauer Bright Line	Bocco Co., Ltd.	เยอรมัน
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	UV160	Shimadzu Corporation	ญี่ปุ่น
เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	FX-180	A&D Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic balance)	Fx-3000	A&D Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	F-13	Horiba	ญี่ปุ่น
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (Rotary incubator shaker)	G-25	New Brunswick Scientific Co., Inc.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)	Vortex-Genie No.2	Scientific Industries Inc.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	KT-30 SD	ALP Co., Ltd.	ญี่ปุ่น

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
เครื่องไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography)	Shimadzu LC-6A	Shimadzu Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
ปั๊มไหลวน (Peristaltic pump)	P-3	Pharmacia Fine Chemical	สหรัฐอเมริกา
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood)	NK system clean bench	International Scientific Supply	ไทย
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Recording spectrophotometer)	UV 160	Shimadzu	ญี่ปุ่น
ตู้อบแห้ง (Oven)	UL-80	Memmert Co., Ltd.	เยอรมัน
ถังหมัก ขนาด 5 ลิตร (Fermentor 5 L)	MD 300-5L	B.E. Marubishi	ญี่ปุ่น
ชุดควบคุมสภาวะ (Bio process controller)	MD 300-5L	B.E. Marubishi	ญี่ปุ่น
เครื่องอัดอากาศ (Air compressor)	-	Hitachi	ญี่ปุ่น
เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (Circulation type hardy cooler)	TRL-108	Thomas Kagaka	ญี่ปุ่น
มาตรตรวจวัดความเป็นกรดด่าง (pH combination electrode)	405-DPAS-SC-K85/225	Mettler toledo	สวิตเซอร์แลนด์
มาตรวัดออกซิเจนที่ละลาย (Dissolved oxygen electrode)	O_2sensor InPro 6820/12/220	Mettler toledo	สวิตเซอร์แลนด์
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (Scanning electron microscope)	JSM-5410LV	Teol	ญี่ปุ่น

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Agar (วุ้นผงตรานางเงือก)	พัฒนสินเอ็นเตอร์ไพรส์	ไทย
Albumin from bovine serum	Sigma	เยอรมัน
Calcium carbonate ($CaCO_3$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
Copper sulfate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
Folin-ciocalteu's phenol reagent	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	สยามชัยเคมิคอล	ไทย
Hydrochloric acid (HCl)	Merck	เยอรมัน
Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Carlo erba	อิตาลี
Mercapto-ethanol (C_2H_6OS)	Sigma	ญี่ปุ่น
Sodium-pyruvate ($C_3H_3NaO_3$)	Fluka	จีน
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck	เยอรมัน
Sodium hydroxide (NaOH)	แกรนด์ เคมิคอล	ไทย
Dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4)	Sigma	เยอรมัน
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck	เยอรมัน
Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)	Sigma	เยอรมัน
Urea $(NH_2)_2CO$	Merck	เยอรมัน
Yeast extract (สารสกัดจากยีสต์)	Difco	สหรัฐอเมริกา
Zinc sulfate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	Merck	เยอรมัน

3.2 เชื้อจุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

3.2.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติก คือ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จาก Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ใช้เข็มเขี่ยสปอร์ของเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ลากลงบนอาหารวุ้น Potato dextrose agar หรือ PDA ประกอบด้วย มันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตรและวุ้น 18 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและทำการถ่ายเชื้อทุกๆเดือน

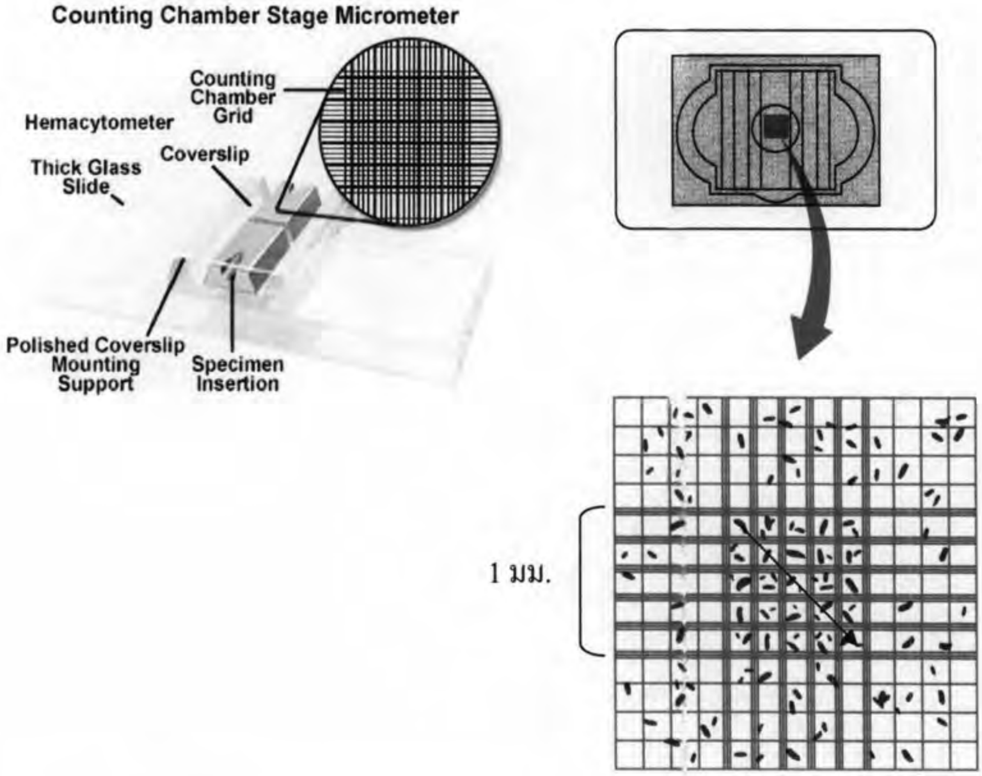
3.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

เลี้ยงเชื้อรา *R. oryzae* NRRL 395 บนอาหารวุ้น PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วใช้เข็มเขี่ยสปอร์ใส่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร เขี่ยสปอร์ให้กระจาย ปิเปตสปอร์แขวนลอยมาประมาณ 20 ไมโครลิตร ถ่ายลงบน Haemacytometer ที่ปิดด้วย Cover slip นับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า ตามแนวเส้น ดังรูปที่ 3.1

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ Haemacytometer

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก)	=	0.1	ลูกบาศก์มิลลิเมตร
สมมุติค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ใน 1 ช่องใหญ่	=	X	เซลล์
ใน 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด		(X) x 25	เซลล์
ใน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด		(X)x25x10	เซลล์
ใน 1 มิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด		(X)x25x10x1000	เซลล์
	=	$25(X)x10^4$	

โดยนับจำนวนสปอร์ตามแนวเส้นทั้งหมด 5 ช่อง จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำไปคำนวณความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3.1 ลักษณะของ Haemacytometer (1) ภาพที่มองจากด้านบนของ chamber มีตารางอยู่กลางสไลด์ (2) ภาพขยายของตารางที่กำลังขยาย 10 เท่าประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่แต่ละด้านยาว 1 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กบรรจุอยู่ 25 ช่องแต่ละช่องมีเส้น 3 เส้นล้อมรอบโดยแต่ละด้านยาว 0.2 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดเล็กบรรจุอยู่อีก 16 ช่อง

ที่มา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, (2551)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมัก

อาหารเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ใช้ตามงานวิจัยที่ผ่านมาของ Thongchul (2005) โดยอาหารที่นำมาใช้เลี้ยงเชื้อราแบ่งเป็น 2 ชนิดได้แก่ อาหารเพื่อการเจริญ (Growth Medium) และอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ (Production Medium) โดยอาหารเพื่อการเจริญประกอบด้วยกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรและสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร และอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 70 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 0.3 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตร $MgSO_4$ 0.25 กรัมต่อลิตร และ $ZnSO_4$ 0.088 กรัมต่อลิตร

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การหมักในระดับขวดเขย่า

3.4.1.1 การคัดเลือกชนิดของด่างที่ใช้ในการควบคุมพีเอช

ทำการหมักระดับขวดเขย่าแบบไม่ต่อเนื่องด้วย *R. oryzae* แบบเซลล์แขวนลอย ใส่หัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.3 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงไปในอาหารเพื่อการเจริญที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เริ่มควบคุมพีเอชของการหมักที่ 6.0 โดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ในตัวอย่างที่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตสำหรับควบคุมพีเอช หลังจากเปลี่ยนอาหารแล้วเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปในน้ำหมักความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ส่วนตัวอย่างที่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการควบคุมพีเอช โดยนำตัวอย่างมาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ที่ฆ่าเชื้อแล้วภายในตู้ปลอดเชื้อ เพื่อปรับค่าพีเอชให้เป็น 6.0 ทุกๆ 24 ชั่วโมง ทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้วจึงทำการกรองเพื่อแยกเซลล์ออกจากของเหลวแล้วนำไปวิเคราะห์ตามข้อ 3.5

3.4.1.2 การคัดเลือกชนิดของเส้นใยที่ใช้ในการตรึงเซลล์

เปรียบเทียบชนิดโครงสร้างของเส้นใยที่ใช้ในการตรึงเซลล์ของ *R. oryzae* ในระดับขวด โดยตรึงสปอร์ของ *R. oryzae* บนเส้นใยขนาด 2.5x2.5 ตารางเซนติเมตรชนิดต่างๆ ได้แก่ ผ้าฝ้าย (ถักและไม่ถัก) และพอลิเอสเทอร์ (ถักและไม่ถัก) ทำการหมักแบบเซลล์ตรึงบนเส้นใยดังกล่าว เปรียบเทียบกับการหมักแบบเซลล์แขวนลอย โดยใส่หัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.3 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเพื่อการเจริญปริมาตร 50 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้วจึงทำการเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ในการควบคุมความเป็นกรดด่างโดยเติมทุกๆ 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง ทำการกรองเพื่อแยกเซลล์ออกจากของเหลวแล้วนำไปวิเคราะห์ตามข้อ 3.5

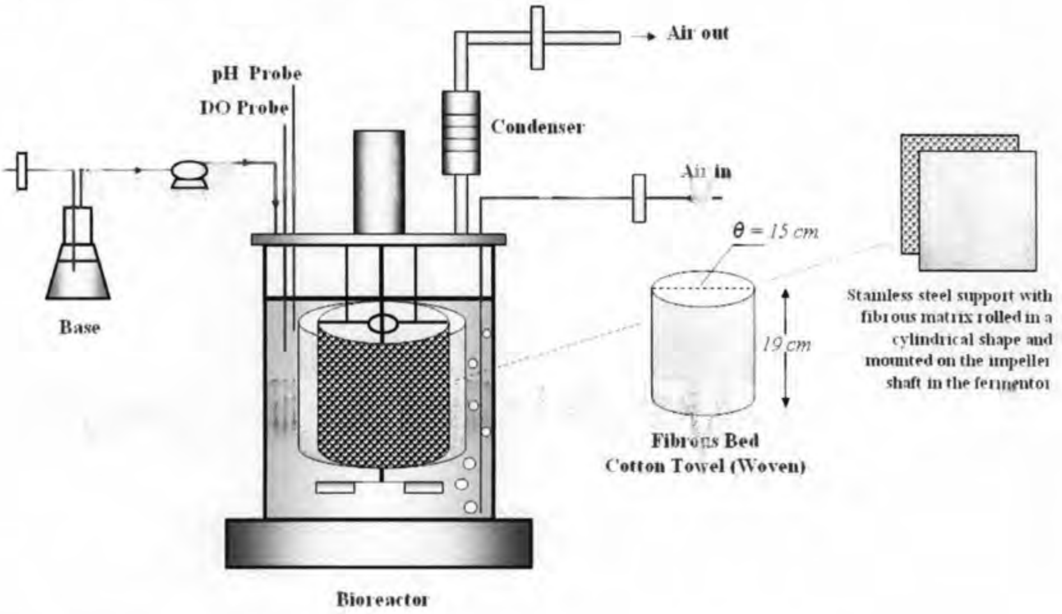
3.4.2 กระบวนการผลิตกรดแลกติกในถังหมัก 5 ลิตร

3.4.2.1 การหมักกรดแลกติกแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวน

ถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเพื่อการเจริญปริมาตร 3 ลิตร ในถังหมักควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 300 500 และ 700 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศคือ 0.5 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ทำการหมักจนครบ 48 ชั่วโมง แล้วจึงทำการเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ ควบคุมค่าพีเอชที่ 6.0 โดยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ตลอดการหมัก ทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง

3.4.2.2 การหมักกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต

ถังหมักแบบเบดสถิตดัดแปลงจากถังกวน มีโครงร่างแบบทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร สูง 19 เซนติเมตร ทำจากสแตนเลสสตีล ยึดอยู่กับฝาบนของถังหมักดังนั้นตัวเบดสถิตจึงไม่เคลื่อนที่และใช้ตะแกรงสแตนเลสสตีลที่มีขนาดช่องตาข่าย 0.5x0.5 ตารางมิลลิเมตร หุ้มเป็นโครงร่างตัวเบดสถิต จากนั้นจึงหุ้มด้วยเส้นใยที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.1.2 สำหรับเป็นตัวยึดเกาะของ *R. oryzae* แสดงดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ลักษณะของถังหมักแบบเบดสถิต
ที่มา : ดัดแปลงจาก Tay และ Yang (2002)

ทำการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต โดยถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเพื่อการเจริญปริมาตร 3 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.0 อัตราการกวนคือ 100 300 500 และ 700 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศคือ 0.5 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ทำการหมักจนครบ 48 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ควบคุมค่าพีเอชที่ 6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ตลอดการหมัก ทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง

3.5 วิธีการวิเคราะห์

3.5.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนเก็บตัวอย่างที่ได้จากการกรองแล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 45 – 60 นาทีนำไปชั่งน้ำหนัก

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่อง HPLC

นำตัวอย่างที่ได้จากการกรองในข้อ 3.5.1 มาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสมาทำการเจือจางให้ความเข้มข้นเป็น 0.1 เท่า นำมากรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรจากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อหาปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอลและปริมาณน้ำตาลกลูโคส

คอลัมน์	Biorad Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid column ขนาด 300 มิลลิเมตร x 7.8 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	0.005 mM กรดซัลฟิวริก
อุณหภูมิ	45 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	RI detector ของ Shimadzu รุ่น RID-6A
เวลาที่อยู่ในคอลัมน์	25 นาที

คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอลและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

3.5.3 การเตรียมตัวอย่างส่วนใส (Crude extract)

นำเซลล์ที่ได้จากการหมักในถังหมักมากรองและล้างผ่านชุดกรอง Buchner funnel ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร 3 ครั้งซับให้เซลล์แห้งด้วยกระดาษกรองจากนั้นชั่งเซลล์ให้ได้ 1 กรัม นำเซลล์มาแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นบดในครกเป็นเวลา 5 นาทีโดยเติม 50 mM TrisHCl buffer ซึ่งมี 10 mM mercaptoethanol ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการบดแล้วมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic disruptor (Tomy, UD-201, 20 kHz) เดินเครื่องเป็นเวลา 30 วินาทีแล้วหยุดพัก 45 วินาที เพื่อป้องกันความร้อนสะสมรวมเวลาเดินเครื่อง 10 นาทีโดยระวังไม่ให้เกิดฟอง (ขณะทำการทดลองให้แช่ตัวอย่างไว้ในน้ำแข็งเพื่อให้เย็นตลอดเวลา) หลังจากเสร็จแล้วก็นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสโดยการติดตามปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ NADH และหาปริมาณโปรตีน นำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการผลิตกรดแลกติกกับค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสของเชื้อรา *R. oryzae* ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบระหว่างเซลล์แขวนลอยในถังหมักแบบถังกวนกับเซลล์ยึดตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต

3.5.3.1 การวิเคราะห์โปรตีน

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.5.3 มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry, (1951) โดยนำตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรมาเติมด้วยสารละลายผสมที่ประกอบด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ Na_2CO_3 ใน 0.1 M NaOH กับ 1 เปอร์เซ็นต์ ของ KNa Tartrate ที่ละลายในน้ำและ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ที่ละลายในน้ำด้วยอัตราส่วน 98:1:1 เติมลงในสารตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Phenol ที่ผสมกับน้ำกลั่นในอัตรา ส่วน 3:1 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน (ภาคผนวก ก ข้อ1)

3.5.3.2 การวิเคราะห์ค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนส

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.5.3 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์หาค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนส โดยเติมสารละลายผสมที่ประกอบด้วย 0.1 M Phosphate buffer (พีเอช 6.5) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรกับ 0.1 M Sodium pyruvate ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรกับ 0.01 M NADH ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรผสมใน Cuvette เขย่าให้

เข้ากันอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เป็นเวลา 7 นาที โดยเลือก Mode kinetic จากนั้นนำผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ (Unit of enzyme) เพื่อหาค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ตามภาคผนวก ก ข้อ 2

3.5.4 การหาค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน

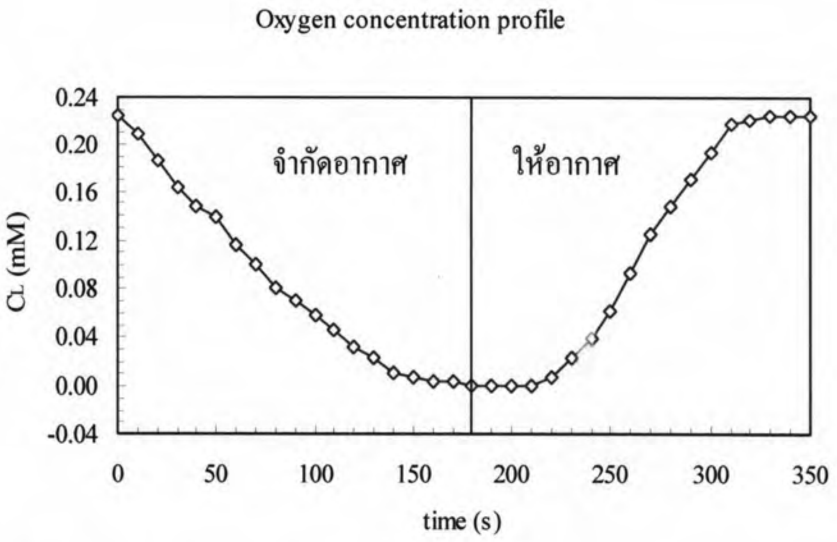
ในระหว่างขั้นตอนการหมักนั้นจะหยุดการให้อากาศทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (C_L) ลดลงอย่างต่อเนื่องทำการวัดความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารทุกๆ 10 วินาทีจนกระทั่งค่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารวัดได้ค่าคงที่ หลังจากนั้นจึงให้อากาศตามเดิมแล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารกับเวลาเพื่อหาความชันหรือ อัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ (*OUR*) จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณจากสูตร

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR$$

โดยอัตราการถ่ายเทออกซิเจน (*OTR*) นั้นสามารถหาได้จาก

$$OTR = K_La \cdot (C^* - C_L)$$

C^* คือ ค่าการละลายของออกซิเจนในอาหาร (mM) และ K_La หรือค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (min^{-1}) ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ พบว่าค่า $OTR = 0$ และ ค่า *OUR* (mM/min) สามารถหาได้จากความสัมพันธ์ระหว่าง C_L กับ เวลา (ไม่มีอากาศ) แสดงดังรูปที่ 3.3 ซึ่งทั้งค่า K_La และค่า C^* สามารถหาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\frac{dC_L}{dt} + OUR$ กับ C_L ซึ่งค่า K_La คือส่วนกลับของความชัน ส่วนค่า C^* เท่ากับ จุดตัดแกน Y ต่อ K_La



รูปที่ 3.3 ค่าการละลายของออกซิเจนภายในถังหมักด้วยเทคนิค Gassing out

3.5.5 Scanning electron microscope (SEM)

นำตัวอย่างของเซลล์ยึดตรึงแบบเบดสถิตที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.4.2.2 และเส้นใยของผ้าฝ้ายและพอลิเอสเทอร์ชนิดที่ถักและไม่ถัก ขนาด 2.5x2.5 ตารางเซนติเมตรมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นทำการวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิว โครงสร้างของเส้นใยและลักษณะของ *R. oryzae* ที่ยึดตรึงบนเส้นใยชนิดต่างๆ