บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Kubota 7500 ของบริษัท Kubota Corboration,Japan
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
    2.1 รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Instruments,USA
    2.2 รุ่น Beckman DU® Spectrophotometer ของบริษัท Beckman,USA
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB204 ของบริษัท Mettler Toledo,Switzerland
4. กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus
5. เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Particle size analyzer) , Coulter LS230
6. ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น ULM500 ของบริษัท Memmert,Germany
7. กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) รุ่น JSM ของบริษัท Jeol, Japan
8. เครื่องวัดพีเอช (pH-meter) รุ่น MP220 ของบริษัท Mettler,Toledo , Switzerland
9. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Julabo HC-2/8 ของบริษัท Labortechnik GMBH, Germany
10. เครื่องกวน (stirrer) รุ่น RW 20 ZM.n. ของบริษัท Ika labortechnik,Germany
11. อุปกรณ์ชุดการออโตไลซิส
12. อุปกรณ์ชุดกรองแบบไหลขนานเยื่อแผ่น ชนิดหมุนได้
13. ปั๊มรีด (Peristatic pump) รุ่น Watson-Marlow 505U ของบริษัท Watson-Marlow Limited, England
14. เครื่องวิเคราะห์ขนาดรูพรุนด้วยปรอท (Pore sizer) ,pore sizer 9320,USA

3.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Laboratory, England
2. โซเดียมไฮดรอกไซค์ (NaOH) ของบริษัท Merck,Germany
3. โซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) ของบริษัท Ajax Chemical,Australia
4. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ของบริษัท Ajax Chemical,Australia
5. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ของบริษัท Carlo erba,Italy
6. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin,BSA) ของบริษัท Fluka,Switzerland
7. กรดกลูตามิก (glutamic acid) ของบริษัท Carlo erba,Italy
8. กลีเซอรัล (Glycerol) ของบริษัท Carlo erba,Italy
9. นินไฮดริน (Ninhydrin) ของบริษัท Ajax Chemical,Australia
10. กรดซิตริก (Citric acid) ของบริษัท Ajax Chemical,Australia
11. โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) ของบริษัท Ajax Chemical,Australia
12. แมงกานีสคลอไรด์ (Manganese chloride) ของบริษัท Ajax Chemical,Australia
13. ไอโซออคเทน ($(CH_3)_3CCH_2CH(CH_3)_2$) ของบริษัท Carlo erba,Italy

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

สเปนท์บริวเวอร์ยีสต์จากบริษัท บุญรอดบริวเวอร์รี จำกัด นำไปเหวี่ยงแยกน้ำเบียร์ออก ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที (1700xg) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนยีสต์ด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:3 เพื่อแยกเอาฮอพ (hop) ที่มีขนาดอนุภาคใหญ่ออกด้วยตะแกรง 150 เมช นำไปเหวี่ยงแยกเอาน้ำออกที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างด้วยน้ำซ้ำอีก 2 ครั้งเพื่อให้ได้ครีมยีสต์ที่สะอาดสำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ดังแสดงในแผนภาพ รูปที่ 3.1

รูปที่ 3.1 แผนภาพการเตรียมวัตถุดิบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 <u>การศึกษาอัตราการผลิตกรดอะมิโน อัตราการโอนถ่ายโปรตีนและกรดอะมิโนตามเวลาในการย่อยสลายตัวเองของครีมยีสต์</u>

ก) ศึกษาผลของความเข้มข้นของครีมยีสต์เริ่มต้น

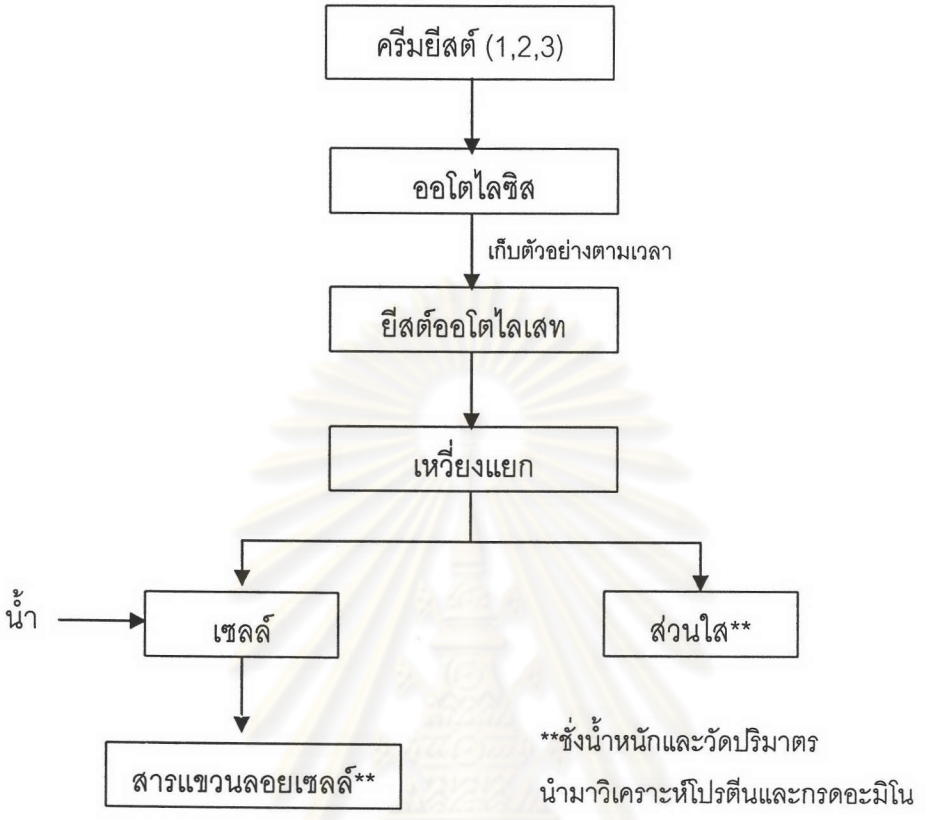
นำครีมยีสต์ที่ผ่านการล้างจนสะอาดแล้วมาทำการปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล จากนั้นนำไปกวนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 50 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 หรือ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาตรและน้ำหนักของส่วนใสและเซลล์ยีสต์ที่ได้ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนทั้งภายในและนอกเซลล์ โดยทำการทดลองด้วยครีมยีสต์เข้มข้นร้อยละ 22 โดยน้ำหนักแห้ง, ครีมยีสต์เข้มข้นร้อยละ 22 โดยน้ำหนักแห้ง ที่มีการเติมเกลือร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และครีมยีสต์เข้มข้นที่เติมน้ำให้เจือจางเป็นร้อยละ 11.25 โดยน้ำหนักแห้ง ดังแสดงในแผนภาพ รูปที่ 3.2

ข) <u>ศึกษาผลของการเติมน้ำในช่วงท้ายของการย่อยสลายตัวเอง</u>

นำครีมยีสต์เข้มข้นร้อยละ 22 โดยน้ำหนักแห้ง มาทำการย่อยสลายตัวเองจนถึงเวลาที่ได้อัตราการผลิตสกัดสูงสุด (จากข้อ ก) เติมน้ำปรับให้ยีสต์ออไลเสทมีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 11.25 โดยน้ำหนักแห้ง แล้วปล่อยให้เกิดการย่อยสลายตัวเองต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างตามเวลาทุก 3 หรือ 6 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนทั้งภายในและนอกเซลล์ ดังแสดงในแผนภาพการทดลอง รูปที่ 3.3

ค) <u>ศึกษาผลของความเร็วรอบที่ใช้กวน</u>

นำครีมยีสต์ที่ผ่านการล้างจนสะอาดแล้ว (เข้มข้นร้อยละ 22 โดยน้ำหนักแห้ง)มาทำการย่อยสลายตัวเองเหมือนข้อ ก แต่เปลี่ยนความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ ก



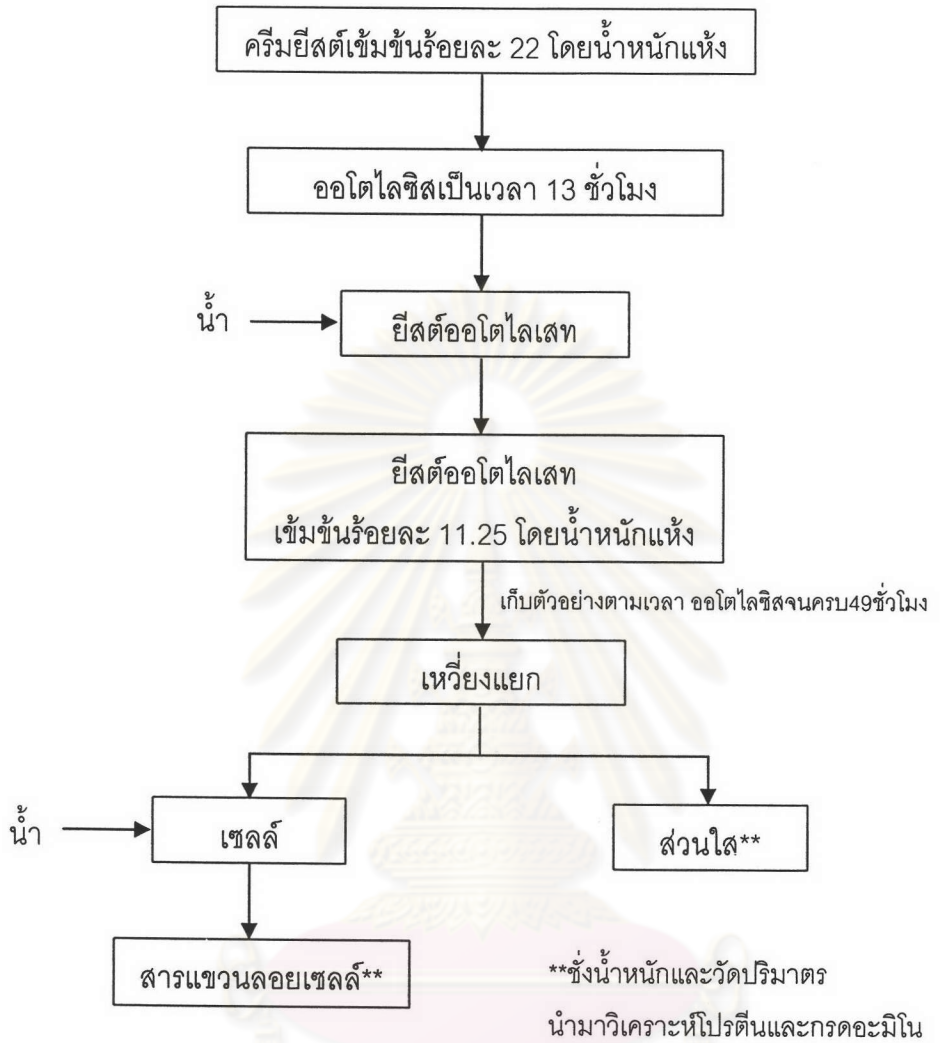
รูปที่ 3.2 แผนภาพการหาอัตราการโอนถ่ายโปรตีนและกรดอะมิโน

1 คือ ครีมยีสต์เข้มข้นร้อยละ 22 โดยน้ำหนักแห้ง

2 คือ ครีมยีสต์เข้มข้นร้อยละ 22 โดยน้ำหนักแห้ง ที่มีการเติมเกลือร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก

3 คือ ครีมยีสต์เข้มข้นที่เติมน้ำให้เจือจางเป็นร้อยละ 11.25 โดยน้ำหนักแห้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.3 แผนภาพการหาอัตราการโอนถ่ายโปรตีนและกรดอะมิโน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 <u>การกรองแยกเศษเซลล์หลังจากการย่อยสลายตัวเองของสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์ด้วยเครื่องไมโครฟิลเตรชันแบบหมุนได้</u>

นำครีมยีสต์เข้มข้นมาทำการย่อยสลายตัวเองจนถึงเวลาที่ได้ปริมาณยีสต์สกัดสูงสุด (จากข้อ 3.4.1 ก) แล้วเติมน้ำให้มีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 11.25 โดยน้ำหนักแห้ง หรือ คิดเป็นยีสต์ออโตไลเสทที่มีความเข้มข้น 112.5 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.5 นำมากรองด้วยเครื่องกรองที่มีช่องว่างระหว่างเยื่อแผ่นและท่อทรงกระบอกคงที่ โดยใช้ความเร็วรอบในการหมุนเยื่อแผ่นเท่ากับ 1500 รอบต่อนาที อัตราการป้อนสาร 30 ลิตรต่อชั่วโมง

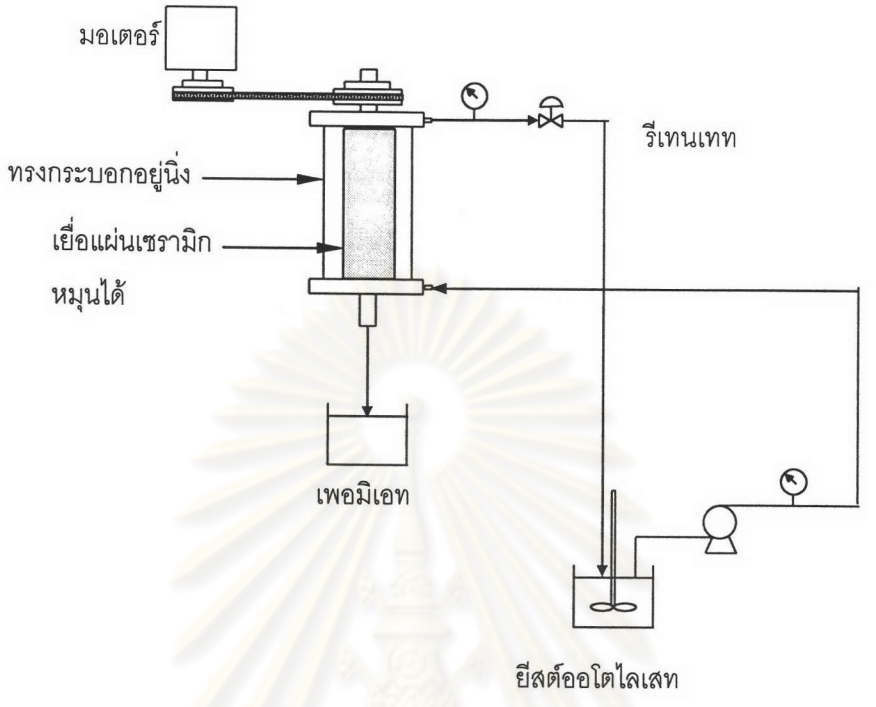
<u>การพิจารณาคัดเลือกเยื่อแผ่น</u>

การทดลองเพื่อเลือกชนิดของเยื่อแผ่น ด้วยการนำเยื่อแผ่นไปวัดขนาดรูพรุนด้วยเครื่องวัดขนาดรูพรุน (poresizer) ดูภาคผนวก ข เทียบกับผลการวัดขนาดอนุภาคของเซลล์ยีสต์ ด้วยเครื่องขนาดอนุภาคด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค (particle size analyzer) ดูภาคผนวก ข

<u>กระบวนการกรอง</u>

เครื่องกรองชนิดหมุนได้ (Rotary filter) ใช้มอเตอร์ขนาด ¼ แรงม้า ของบริษัท Mitsubishi ในการทำให้เยื่อแผ่นหมุนด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีใ ช้เยื่อแผ่นเซรามิกขนาดรูพรุน 0.9 ไมโครเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.82 เซนติเมตร ยาว 9.8 เซนติเมตร มีพื้นที่การกรอง 148 ตารางเซนติเมตร ระยะห่างระหว่างผนังเยื่อแผ่นด้านนอกกับผนังเยื่อแผ่นด้านใน 0.775 เซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3.4

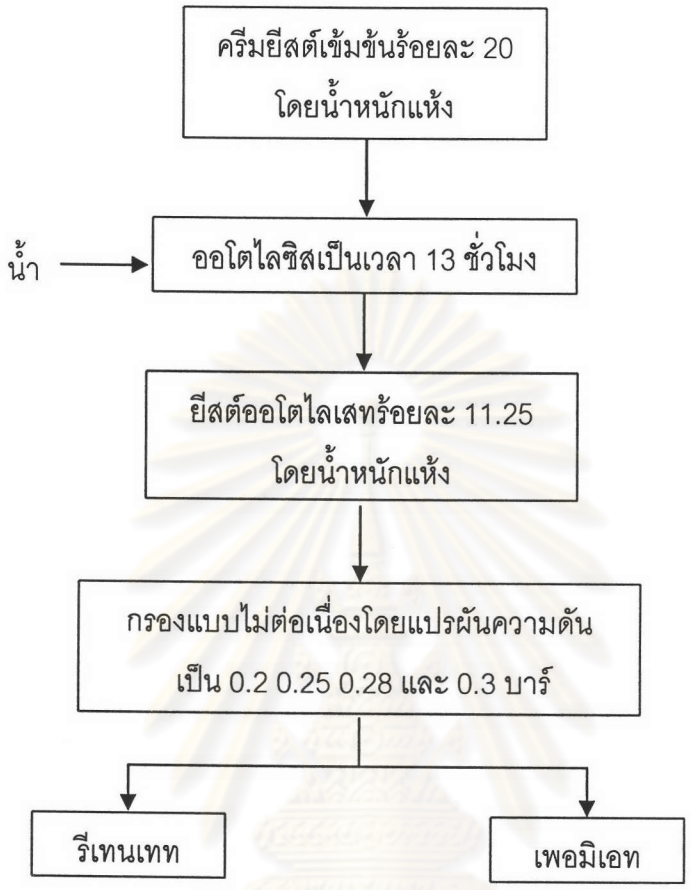
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.4 แผนภาพชุดเครื่องมือการกรองแบบไหลขนานกับเยื่อแผ่นโดยใช้เครื่องกรองชนิดหมุนได้

ก. <u>การทดลองหาความดันที่เหมาะสมในกระบวนการกรองแบบไม่ต่อเนื่อง (ความเข้มข้นสายป้อนเข้มข้นขึ้น)</u>

เตรียมสายป้อน โดยนำยีสต์ที่ผ่านการออโตไลซิส 13 ชั่วโมง มาเติมน้ำเพื่อให้ได้เป็นสารแขวนลอยเข้มข้นร้อยละ 11.25 โดยน้ำหนักแห้ง วัดความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 5 - 6 เก็บตัวอย่างสารป้อนเริ่มต้นก่อนการกรอง ปรับความเร็วรอบของมอเตอร์เป็น 1500 รอบต่อนาที จากนั้นใช้ปั๊มรีดดูดสารแขวนลอยผ่านสายยางซิลิโคนเข้าทางด้านล่างของเครื่องกรองด้วยอัตราไหล 30 ลิตรต่อชั่วโมง รอจนสารแขวนลอยเต็มโมดูลจึงทำการปรับความดันโดยแปรผันค่าเป็น 0.2 ,0.25, 0.28 และ 0.3 บาร์ เพื่อให้เพอมิเอทไหลออกทางด้านล่างของเยื่อแผ่นเซรามิก เก็บตัวอย่างและวัดปริมาตรของเพอมิเอททุก 3,5 และ10 นาที จนกระทั่งได้ค่าฟลักซ์ลดลงจบเกือบคงที่ ทำการวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง โปรตีน และกรดอะมิโนของเพอมิเอท รวมทั้งสายป้อนก่อนการกรอง ดังแสดงในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 แผนภาพการกรองยีสต์ออโตไลเสทด้วยความดันต่าง ๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข การนำกลับโปรตีนและกรดอะมิโนให้ได้มากที่สุดในกระบวนการกรองแบบความเข้มข้นสายป้อนเข้มข้นขึ้น

เตรียมยีสต์ออโตไลเสทให้มีความเข้มข้น 112.5 กรัมต่อลิตร จำนวน 2 ลิตร นำมากรองด้วยเครื่องกรองแบบหมุนได้ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที อัตราไหล 30 ลิตรต่อชั่วโมง ใช้ความดันในการกรองเท่ากับ 0.28 บาร์ กรองยีสต์ออโตไลเสทจนกระทั่งเพอมิเอชันฟลักซ์ลดลงจบเกือบคงที่ หรือครบ 1 ชั่วโมง ให้เติมน้ำลงในถังป้อนจำนวนครึ่งหนึ่งของปริมาตรเพอมิเอทที่กรองได้ (250มิลลิลิตร) ทำการกรองต่อไปจนกระทั่งค่าฟลักซ์ลดลงจนเกือบคงที่ ให้ทำการชะโดยเติมน้ำลงในถังป้อนอีก เก็บตัวอย่างและวัดปริมาตรเพอมิเอทที่ได้ตามเวลา นำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของแข็ง ความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของโปรตีน และกรดอะมิโน รวมทั้งความขมของเพอมิเอท สายป้อนก่อนการกรอง ดังแสดงในรูปที่ 3.6

รูปที่ 3.6 แผนภาพการทดลองการนำกลับโปรตีนและกรดอะมิโน

3.5 การวิเคราะห์

3.5.1 <u>การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของแข็ง (%solid)</u>

ทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของแข็งของตัวอย่างเริ่มต้น โดยอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ข้ามคืนแล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักจนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งคงที่

3.5.2 <u>การวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์</u>

ทำการวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ในสารแขวนลอยเริ่มต้นและสารละลายเพอร์มิเอทโดยใช้แผ่นนับเซลล์ (Haemacytometer) ของบริษัท BOECOกับกล้องจุลทรรศน์ของบริษัท OLYMPUS รุ่น BH-2 ที่มีกำลังขยายสูงสุด 1000 เท่า

3.5.3 <u>การวิเคราะห์โปรตีน</u> (Lowry,1951)

ใส่สารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน (โดยมีค่าโปรตีนไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม) 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอี 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายเอฟ 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน

<u>หมายเหตุ</u> วิธีเตรียมสารละลายอี และ เอฟ

การเตรียมสารละลายอี โดยทำการเตรียมสารละลาย เอ,บี,ซี และ ดี ดังนี้

สารละลายเอ : 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) คอปเปอร์ซัลเฟต

สารละลายบี : 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต

สารละลายซี : 0.2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซค์

สารละลายดี : 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โซเดียมคาร์บอเนต

สารละลายเหล่านี้เก็บที่อุณหภูมิห้องได้

จากนั้นผสมสารละลายซี 49 มิลลิลิตร กับสารละลายดี 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเอ และสารละลายบีอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงไปตามลำดับ โดยสารละลายอี ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

การเตรียมสารละลายเอฟ ทำโดยเจือจาง Folin-Ciocalteau ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1

การเตรียมกราฟมาตรฐาน ใช้โบวีนซีรัมอัลบูมินความเข้มข้นระหว่าง 0.05 -0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.4 <u>การวิเคราะห์กรดอะมิโน</u>

ใส่สารละลายนินไฮดรินจำนวน 1 มิลลิลิตร สารละลายกลีเซอรอลจำนวน 2.4 มิลลิลิตร เติม 0.5 โมลาร์ของสารละลายบัฟเฟอร์ซิเตรท และสารละลายแมงกานีสคลอไรด์ อย่างละ 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน ปิดปากหลอดทดลองเพื่อกันการระเหย นำไปต้มในน้ำเดือด 12 นาที จากนั้นทำให้เย็นในอ่างน้ำ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 570 นาโนเมตร ต้องทำการวัดการดูดกลืนแสงภายใน 1 ชั่วโมง

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายนินไฮดรินร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก
2. สารละลายกลีเซอรอลร้อยละ 55 โดยปริมาตร
3. สารละลายบัฟเฟอร์ซิเตรท 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.5
4. สารละลายแมงกานีสคลอไรด์ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมกราฟมาตรฐาน ใช้กรดกลูตามิกความเข้มข้นระหว่าง 0.1 - 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.5 <u>การวิเคราะห์ความขม</u> (Analytica-EBC)

ใส่สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณความขม 10 มิลลิลิตร ลงขวดปั่นเหวี่ยง จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล 1 มิลลิลิตร ใส่เม็ดลูกแก้ว 2 เม็ด แล้วเติมไอโซออคเทน 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกเฟสที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าความขมตามสมการ โดยแสดงค่าความขมในรูปของจำนวนเต็มในหน่วย EBU. (European Brewery Convention) ปริมาณ 1 EBU.มีค่าเท่ากับ 1 มิลลิกรัมของไอโซแอลฟาแอซิดในสารละลาย 1 ลิตร

ความขม (EBU.) = O.D.275 นาโนเมตร x 50

3.5.6 <u>การวัดขนาดอนุภาคของเซลล์ยีสต์</u>

การวัดขนาดอนุภาคของเซลล์ยีสต์ ด้วยเครื่องวัดอนุภาค (Particle analyzer) รุ่น Coulter LS 230 โดยใช้ small volume module ดูภาคผนวก ข

3.5.7 <u>การวัดความหนืดของสาร</u>

ทำการวัดความหนืดของสารแขวนลอยยีสต์ และยีสต์สกัด ด้วยหลอดแก้วออสวาว์ล โดยนำสารที่ต้องการวัด เทลงในหลอดแก้วออสวาล์วให้อยู่ในปริมาตรที่กำหนด แล้วปล่อยให้สารไหลลงมาตามหลอดแก้ว จับเวลาการไหลของสารแขวนลอย ตั้งแต่เริ่มไหลจากที่กำหนดไปจนถึงตำแหน่งที่กำหนด ในหน่วยวินาที นำค่าเวลาที่ได้มาคำนวณค่าความหนืดของสารแขวนลอยเทียบกับน้ำ

3.5.8 <u>การวัดความหนาแน่นของสาร</u>

การวัดความหนาแน่นของสาร โดยการเปรียบเทียบปริมาตรของสารแขวนลอยกับน้ำหนักของสารแขวนลอยนั้น นำสารแขวนลอยปริมาตร 25 มิลลิลิตรมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำน้ำหนักมาคำนวณหาค่าความหนาแน่น นำค่าที่ได้และค่าความหนืดของสารมาคำนวณหาค่าเทย์เลอร์นัมเบอร์ และเรย์โนลด์นัมเบอร์ตามแนวแกน