บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychrotherm incubator shaker)	รุ่น AG แบบ KF-4	บริษัท INFROS ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	รุ่น Spectronic 21	บริษัท Baush & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave)	รุ่น HA-26	บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องเขย่า (vortex mixer)	Vortex-Genie	บริษัท Scientific Industries
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	รุ่น pH 82	บริษัท Radiometor ประเทศเดนมาร์ค
กล้องจุลทรรศน์ (microscope)	รุ่น CHA	บริษัท Olympia Optical จำกัด ประเทศญี่ปุ่น
แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (haemacytometer)	รุ่น Neubauer Bright Line	บริษัท Bocco ประเทศเยอรมัน
ถังหมักขนาด 5 ลิตร และชุดควบคุมสภาวะ	รุ่น MD-300	บริษัท L. E. Marubishi ประเทศญี่ปุ่น

1.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1.โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)	E.Merck ประเทศเยอรมัน
2.กรดซัลฟุริก (sulfuric acid)	E.Merck ประเทศเยอรมัน
3.โปตัสเซียมเปอร์แมงกาเนต (potassium permanganate)	E.Merck ประเทศเยอรมัน
4.โปตัสเซียมโบรไมด์ (potassium bromide)	BDH Chemicals ประเทศอังกฤษ
5.ไทโอยูเรีย (thiourea)	May & Baker ประเทศอังกฤษ
6.โปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium monohydrogen phosphate)	BDH Chemicals ประเทศอังกฤษ
7.โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate)	E.Merck ประเทศเยอรมัน
8.แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate)	E.Merck ประเทศเยอรมัน
9.ฟีนอลฟธาลีน (phenolphthalene)	E.Merck ประเทศเยอรมัน
10.เฮปเทน (heptane)	E.Merck ประเทศเยอรมัน
11.ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide)	E.Merck ประเทศเยอรมัน

สารเคมีอื่นๆ นอกจากที่กล่าวมาแล้ว สั่งซื้อจากบริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ส่วนแป้งมันสำปะหลังหาซื้อได้ทั่วไปตามท้องตลาด สำหรับกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว และรำข้าวที่สกัดไขมันแล้วได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์ จำกัด

2. เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บรักษา และการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ตรวจสอบการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา Aspergillus niger 12 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สายพันธุ์ของ Aspergillus niger ทั้ง 12 สายพันธุ์

สายพันธุ์	แหล่งที่มา
Aspergillus niger A 3	แยกจากดินใน กทม.
A. niger A 5	"
A. niger A 13	"
A. niger A 16	"
A. niger A 18	"
A. niger A 22	"
A. niger A 35	"
A. niger A 41	"
A. niger A 46	"
A. niger A 185	"
A. niger NRC 401121	ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr.K.Roger Latta Culture Collection National Research Council of Canada Ottawa Canada
A. niger NRRL 2270	ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr.A.J.Lyons Northern Regional Research Laboratory Peoria Illinois U.S.A.

2.2 การเก็บรักษาเชื้อ Aspergillus niger

เขี่ยสปอร์ของเชื้อ Aspergillus niger โดยใช้เข็มเขี่ยลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียงโพเตโตเด็กซ์โตรส (potato dextrose agar PDA ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลานาน 7 วัน เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -70 °ซ.

2.3 การเลี้ยงเชื้อ Aspergillus niger

2.3.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยสปอร์ของเชื้อ Aspergillus niger จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2.2 ใส่ลงในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มล. เพื่อทำให้เป็นสปอร์แขวนลอยผสมให้เข้ากัน นำไปกระจายลงบนผิวหน้าของอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรสในขวดขนาด 10x15x4 ซม. บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. นาน 7 วัน หลังจากนั้นถ่ายสปอร์ออกจากขวดด้วยสารละลาย ทวีน 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1 แล้วกรองผ่านผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อ นับจำนวนสปอร์ด้วยแผ่นนับเม็ดเลือด

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อ Aspergillus niger เพื่อเป็นหัวเชื้อ

ถ่ายสารละลายแขวนลอยของสปอร์ที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 2.3.1 ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 100 มล. (ภาคผนวกที่ 1.2) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. โดยทำให้สารละลายแขวนลอยมีความเข้มข้น $1x10^7$ สปอร์/มล. นำไปวางบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลานาน 72 ชม.

2.3.3 การเลี้ยงเชื้อ Aspergillus niger เพื่อให้ผลิตกรดมะนาวในขวดทดลองขนาด 250 มล.

ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 5 มล.ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 2.3.2 ลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. นำไปวางบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่เขย่า ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ.

2.3.4 การเลี้ยงเชื้อ Aspergillus niger เพื่อให้ผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีในข้อ 2.3.2 ให้ได้ปริมาตรรวม 300 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวกที่ 1.6) ปริมาตร 2.7 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ.ตลอดการหมัก เก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์แต่ละครั้งปริมาตร 20 มล. โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชม. จนสิ้นสุดการหมัก

3.<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

3.1 การวิเคราะห์กรดทั้งหมด (total acid)

เตรียมสารตัวอย่างที่ได้จากการกรองแยกน้ำหมัก ออกจากสายใยราด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ปริมาตร 5 มล. ใส่ขวดทดลองขนาด 250 มล. นำมาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล (ภาคผนวกที่ 2.1) คำนวนปริมาณกรดทั้งหมด โดยเทียบเป็นน้ำหนักโมเลกุลของกรดมะนาวโมโนไฮเดรต

3.2 การวิเคราะห์กรดมะนาว

โดยวิธีเพนตาโบรโมอะซิโตน (Pentabromoacetone method)(37)

3.2.1 นำสารตัวอย่าง ปริมาตร 1.0 มล. มาเติมกรดซัลฟุริก ($2N.H_2SO_4$) ปริมาตร 1.0 มล. เติมโปตัสเซียมโบรไมด์เข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาณ 5 หยด และโปตัสเซียมเปอร์แมงกาเนตเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาณ 10 หยด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

3.2.2 นำหลอดทดลองจากข้อ 3.2.1 ไปแช่ในอ่างน้ำเย็น และ ค่อยๆหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 6 จนได้สารละลายใส เติมเฮปเทนปริมาตร 3.0 มล. ปิดฝาให้สนิท สกัดโดยการเขย่านาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างสมบูรณ์

3.2.3 ถ่ายส่วนเฮปเทนจากข้อ 3.2.2 ปริมาตร 2.0 มล. มาใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลายไทโอยูเรีย (ภาคผนวกที่ 2.2) ปริมาตร 4.0 มล. ปิดฝาให้สนิท สกัดโดยการเขย่านาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างสมบูรณ์

3.2.4 นำชั้นสารละลายชั้นไทโอยูเรียที่สกัดแล้วจากข้อ 3.2.3 มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

3.2.5 เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้กรดมะนาวที่ปราศจากน้ำ 0-0.2 มก. ต่อมล. ละลายในกรดซัลฟุริก 1.0 นอร์มอล มาผ่านการทดลองตามที่กล่าวข้างต้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกรดมะนาวที่ปราศจากน้ำกับค่าดูดกลืนแสง (ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ลบด้วย ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร)

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

โดยวิธีการของ Bernfeld (26) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (DNSA reagent)(ภาคผนวกที่ 2.3) ปริมาตร 1.0 มล. ลงในสารตัวอย่างที่มีปริมาตร 1.0 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้กลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.2-2.0 มก.ต่อมล. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสง

3.4 การวัดการเจริญของเชื้อรา Aspergillus niger

นำตัวอย่างปริมาตร 50 มล. มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักเพื่อแยกส่วนสายใยราออกจากส่วนน้ำใส ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 °ซ. จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักเซลแห้ง (25)

3.5 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

นำน้ำหมักที่กรองได้มาวัดความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง