บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ(psychrotherm incubator shaker) ของบริษัท Infors ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง(spectrophotometer)รุ่นSpectronic-21 ของบริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์(autoclave)รุ่น HA-26 ของบริษัท Hirayama Manufacturing ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องผสม(vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie 2 ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH meter) รุ่น HI 8424 ของบริษัท Hanna Instruments ประเทศอิตาลี

ตู้อบไมโครเวฟ(microwave oven) รุ่น MR 6650(touch control) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก(Fermentor)ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300-5Lใบพัดแบบ turbine และ bioprocess controller ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
กรดมะนาวโมโนไฮเดรต	Sigma Chemical
แคลเซียมคาร์บอเนต	Fluka Chemika
ไดโซเดียมเตตราโบเรตเดกกาไฮเดรต	E. Merck
ไทโอยูเรีย	E. Merck
ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์	Sigma chemical
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	E. Merck
โปแตสเซียมโบรไมด์	Farmitalia Carloerba
โปแตสเซียมเปอร์มังกาเนต	Farmitalia Carloerba
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	E. Merck
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	Fluka Chemika
ยูเรีย	E. Merck
แอมโมเนียมคลอไรด์	Fluka Chemika
แอมโมเนียมซัลเฟต	Farmitalia Carloerba
แอมโมเนียมไนเตรต	May & Baker
เฮปเทน	Mallinckrodt
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 35 %	E. Merck
สารสกัดจากยีสต์	Difco Laboratories
แป้งมันสำปะหลัง	Thai-Wah(ตรากุหลาบ)
พีจีโอ เอนไซม์	Sigma diagnostics
เอนไซม์ BAN 240L	Novo Nordisk
เอนไซม์ DEXTROZYME 225/75L	Novo Nordisk

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

2.2.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นยีสต์สายพันธุ์ *C. oleophila* C-73 ซึ่งได้ผ่านการคัดเลือกแล้วจากการวิจัยของ เรวดี เลิศไตรรักษ์(2535)

2.2.2 การเก็บรักษาเชื้อยีสต์

ถ่ายเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ แล้วลากบนอาหารแข็งลาดเอียง(ภาคผนวก ก1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน เก็บเชื้อในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.2.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

2.2.3.1 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อยีสต์

เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็งลาดเอียง(ภาคผนวก ก1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำเป็นเซลล์แขวนลอยโดยใช้น้ำที่กำจัดไอออนและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5.0 มิลลิลิตร ต่อหลอดอาหารแข็งลาดเอียง

2.2.3.2 การเตรียมหัวเชื้อ

ปิเปตเซลล์แขวนลอยที่เตรียมได้ในข้อ 2.2.3.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ(ภาคผนวก ก1.1) เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที นาน 15 ชั่วโมง นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น

2.2.3.3 การเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.3.2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2) คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น 0.7

กรัมต่อลิตร(ปริมาณร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น

2.2.3.4 การเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.3.2 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้มีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ใช้หัวเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น 0.7 กรัมต่อลิตร(ปริมาณร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร) อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมได้ตามภาคผนวก ก2.12 ควบคุมสภาวะในการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น

2.3 วิธีวิเคราะห์

2.3.1 การละลายเกลือแคลเซียมในน้ำหมัก (Nakanishi และคณะ,1972)

เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ ลงในน้ำหมักจนเกลือแคลเซียมละลายหมด ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0 ปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้วและมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0

2.3.2 การวัดการเจริญของเชื้อยีสต์ โดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตสารละลายที่ได้จากข้อ 2.3.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนด้วยเครื่องสูบสุญญากาศ ล้างเซลล์ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว 20.0 มิลลิลิตร นำเซลล์ที่ได้บนกระดาษกรองไปอบด้วยเครื่องไมโครเวฟความร้อนระดับดีฟรอสเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองเอาเซลล์ออกแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลที่เหลือต่อไป

2.3.3 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน</u>

(Stern,1957)

2.3.3.1 การเปลี่ยนกรดมะนาวเป็นเพนตาโบรโมอะซีโตน

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการกรอง ในข้อ 2.3.2 และผ่านการทำเจือจางให้เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาเกลียว เติมกรดซัลฟุริกความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโปแตสเซียมโบรไมด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ลงไป 5 หยด เติมสารละลายโปแตสเซียมเปอร์มังกาเนตความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)ลงไป 10 หยดทันที เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

2.3.3.2 การสกัดเพนตาโบรโมอะซีโตนด้วยเฮปเทน

นำหลอดทดลองที่ได้จากข้อ 2.3.3.1 แช่ในอ่างน้ำแข็ง หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในหลอดทดลอง จนสารละลายใส ปิเปตเฮปเทนปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองปิดฝาให้สนิท สกัดโดยใช้เครื่องผสมนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

2.3.3.3 การสกัดด้วยไทโอยูเรีย

ปิเปตส่วนบน(ชั้นเฮปเทน)ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาเกลียวใหม่ ที่มีสารละลายไทโอยูเรีย(ภาคผนวก ข1) ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท สกัดด้วยเครื่องผสมนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดเอาชั้นล่าง(ชั้นไทโอยูเรีย)นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ใช้สารละลายไทโอยูเรียเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณกรดมะนาวได้จากกราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0-40 มิลลิกรัมต่อลิตร(ภาคผนวก ง1) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

สารละลายมาตรฐานกรดมะนาว เตรียมได้จากภาคผนวก ข1 ในช่วงความเข้มข้น 0-40 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้สารละลายมาตรฐานกรดมะนาวดังกล่าว 1.0 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ตามวิธีข้างต้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกรดมะนาวกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้(ภาคผนวก ง1)

2.3.4 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์</u> (Bernfeld,1955)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการทำเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 มิลลิลิตร(ภาคผนวก ข2) ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0.0-2.0 กรัมต่อลิตร(ภาคผนวก ง2) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.3.5 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยพีจีโอเอนไซม์</u>

(Hugget and Nixon,1957)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการทำเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายพีจีโอเอนไซม์(ภาคผนวก ข3) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0-0.2 กรัมต่อลิตร(ภาคผนวก ง3) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.3.6 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด</u>

ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ใส่ในจานแก้วที่ทราบน้ำหนักแน่นอน อบให้แห้งในเครื่องไมโครเวฟ ความร้อนระดับดีฟรอสนาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นในเดสิเคเตอร์ นำไปชั่งหาน้ำหนักที่ได้ หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.3.7 <u>ค่าความเป็นกรด-ด่าง</u>

ใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง