บทที่ 2

วิธีทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychrotherm incubator shaker) รุ่น AG Rittergasse 27 ของบริษัท INFORS ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic-21 ของบริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

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

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น HI 8424 ของบริษัท Hanna Instruments ประเทศอิตาลี

ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น MR 6650 (touch control) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องเพอริสตอลติกปั๊ม รุ่น LKB ยี่ห้อ Microperpex ของบริษัท Bromma ประเทศสวีเดน

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น TE-8D ยี่ห้อ Tempette ของบริษัท Techne ประเทศอังกฤษ

เครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ (evaporator) รุ่น RE 52 เครื่องดูดให้เป็นสุญญากาศ (vacuum aspirator) รุ่น BP-51 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องกำเนิดคลื่นอุลตราโซนิค (sonicator) ยี่ห้อ Delta รุ่น Ultrasonic Cleaner D 200 บริษัท D.S.C group ประเทศไต้หวัน

เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) รุ่น LC-8A ชุดควบคุมระบบ SLC-8A และเครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300-5L ใบพัดแบบ 6-blade turbine ตัวควบคุมสภาวะ bioprocess controller รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องอัดอากาศ (air compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (circulation type handy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

2. สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรดมะนาวชนิดปราศจากน้ำ	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไอโซซิตริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดทาร์ทาริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดฟอสฟอริก	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
กรดซัลฟุริก	MALLINCKRODT	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไฮโดรคลอริก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แคลเซียมคาร์บอเนต	ศิลาทิพย์	ประเทศไทย
แคลเซียมออกไซด์	ศิลาทิพย์	ประเทศไทย
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แอมโมเนียมคลอไรด์	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ประเทศไทย
สารสกัดจากมอลต์	FIS	ประเทศไทย
เปปโตน	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แป้งมันสำปะหลัง	บริษัท ไทยวา	ประเทศไทย
พีจีโอ เอนไซม์	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอนไซม์ BAN 240 L และ Dextrozyme 225/75 L	NOVO NORDISK	ประเทศเดนมาร์ก
ออโธ-ไดอะนิซิดีน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เมธานอล	J.T.BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นยีสต์สายพันธุ์กลายของ Candida oleophila C-73 ซึ่งได้จากงานวิจัยของสมศักดิ์ นาคซื่อตรง (2537)

การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อ

1. การเก็บรักษาเชื้อ

เขี่ยเชื้อ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แล้วลาก (streak) บนอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) สูตรอาหาร YM (ภาคผนวก ก1.1 หรือ ก1.4) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เก็บเชื้อในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2. การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

2.1. การเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็งลาดเอียง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก1) โดยเติมน้ำที่กำจัดไอออน และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2.5 มิลลิลิตรต่อหลอดอาหารแข็งลาดเอียง ปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ซึ่งวิธีนี้จะทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.05 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม (rotary shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

2.2. การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 ลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก2) ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นประมาณ 0.7 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

2.3. การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2..1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.5 ลิตร ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นประมาณ 0.7 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมได้ตามภาคผนวก ก2.9 นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น ควบคุมภาวะในการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 VVM

วิธีวิเคราะห์

1. ค่าความเป็นกรดด่าง

ใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)

2. การละลายเกลือแคลเซียมซิเตรทในน้ำหมัก (ดัดแปลงจากวิธีของ Nakanishi และคณะ, 1972)

ก่อนการวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว และติดตามการเจริญของเชื้อจะต้องทำการละลายเกลือแคลเซียมซิเตรทที่เกิดขึ้น โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 1.8 จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100.0 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว

3. การวัดการเจริญของเชื้อโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตน้ำหมักที่ได้จากข้อ 2 ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C ที่ทราบน้ำหนักแห้งแน่นอน โดยใช้เครื่องกรองอย่างละเอียด (Millipore filter) และเครื่องสูบสุญญากาศ ล้างเซลล์ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว 30 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด หักน้ำหนักกระดาษกรองออก จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองเอาเซลล์ออกแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำตาลที่เหลือต่อไป

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ดัดแปลงจากวิธีของ Bernfeld ,1955)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (Vortex Mixer) ปิดฝาหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็น 3 นาที เติมน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540นาโนเมตร ใช้น้ำที่กำจัดไอออนแล้ว และผ่านขั้นตอนข้างต้นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค3)

5. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้พีจีโอเอนไซม์ (Hugget and Nixon ,1957)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายพีจีโอเอนไซม์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ใช้น้ำที่กำจัดไอออนแล้ว และผ่าน

ขั้นตอนข้างต้นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0.0-0.20 กรัมต่อลิตร หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค4)

6. การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกในน้ำหมัก โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) (สมศักดิ์ นาคซื่อตรง ,2537)

ปิเปตน้ำหมักที่ผ่านการกรองในข้อ 3 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายตัวพาปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร แล้วเติมสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะดังนี้

คอลัมน์	:	Selectosil 5 C18 ขนาด (I.D.) 4.6 มิลลิเมตร ยาว 25 เซนติเมตร
สารละลายตัวพา	:	ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต[$(NH_4)_2HPO_4$] 5 กรัมต่อลิตร ในน้ำที่กำจัดไอออนแล้วอย่างดี ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.00 ด้วยกรดฟอสฟอริก
สารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน	:	กรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ในน้ำปราศจากไอออน
อุณหภูมิที่ใช้	:	40 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	:	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	:	คลื่นอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร

โดยใช้สภาวะดังกล่าว เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดมะนาวประมาณ 5.8 นาที และกรดไอโซซิตริกประมาณ 3.6 นาที คำนวณหาปริมาณกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริกจากกราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0-5.0 กรัมต่อลิตร และกราฟมารตฐานของกรดไอโซซิตริกในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งกราฟมาตรฐานที่ใช้นั้นเป็นกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดมะนาว หรือกรดไอโซซิตริก กับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของกรดต่อสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (ภาคผนวก ค1 และภาคผนวก ค2)

7. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

ชั่งสารไดอะตอมาเซียสเอิร์ธ 1.0 กรัม ใส่ในจานแก้วที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วใส่สารละลายตัวอย่างปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12

ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดสิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก หักน้ำหนักจานแก้วและไดอะตอมาเชียสเอิร์ธ จะได้ปริมาณของแข็งทั้งหมด หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร