บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น G-25 บริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., U.S.A.

เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KR-20000T บริษัท Kubota Corporation, Japan.

เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Z 230 บริษัท Berthod Hermle, Germany.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160 บริษัท Shimadzu, Japan.

เครื่องชั่งแบบหยาบ (eletronic balance) รุ่น FX-3000 บริษัท A&D, Japan.

เครื่องชั่งแบบละเอียด (eletronic balance) รุ่น FX-180A บริษัท A&D, Japan.

เครื่องเขย่า (vortex) รุ่น Vortex-Genie No.2 บริษัท Scientific Industries, Inc., USA.

เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ รุ่น Elgastat UHQ II บริษัท Elga Ltd, England.

ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น MIR152 บริษัท Sanyo Electric Co.,Ltd, Japan.

เพริสตาลติกปั๊ม (peristaltic pump) รุ่น P-3 บริษัท Pharmacia Fine Chemical, U.S.A.

ตู้อบไมโครเวฟ (microwave oven) รุ่น Mir-6650 บริษัท Hitachi, Ltd, Japan.

หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA - 26 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.

ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD - 300 - 5L ใบพัดกังหัน 6 ใบ (6 - blade turbine) เครื่องควบคุมภาวะ (bioprocess controller) รุ่น MDIAC -SS บริษัท Marubishi, Japan เครื่องอัดอากาศ (air compressor) บริษัท Hitachi, Japan เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (circulation type handy cooler) รุ่น TRL - 108 ของบริษัท Thomas Kagaka, Japan

เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจนรุ่น Buchi 315 Distillation Unit และรุ่น Buchi 425 Digestor ของบริษัท Buchi Laboratory Techniques Ltd., Switzerland.

2.1.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิตหรือจัดจำหน่าย	
กรดบอริค	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
กรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดซัลฟุริก	Mallinckrodt	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดอะซีติค	The East Asiatic	ประเทศไทย
กรดไฮโดรคลอริค	MERCK	ประเทศเยอรมัน
คอปเปอร์ซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ซิงค์คลอไรด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เปปโตน	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
โพแทสเซียมซัลเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เฟอริคคลอไรด์	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
เมทธิลีนบลู	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
เมทธิลเรด	MERCK	ประเทศเยอรมัน
สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ประเทศไทย
สารสกัดจากมอลต์	FIS	ประเทศไทย
อะดีตานอล	Marubishi	ประเทศญี่ปุ่น
เอธานอล	องค์การสุรา	ประเทศไทย
เอนไซม์อินเวอร์เทรส	Wako Pure Chemical	ประเทศญี่ปุ่น
แอมโมเนียมซัลเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	J.T.Baker	ประเทศสหรัฐอเมริกา

หมายเหตุ IBGE = สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FIS = Food Ingredients Specialities, Co. Ltd.

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธ์ SG1 ซึ่งเป็นยีสต์ขนมปังของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การเก็บรักษาเชื้อ

ถ่ายยีสต์ SG1 ที่ใช้ในการทดลองโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งลาดเอียงสูตรอาหาร YM (ภาคผนวก ก 1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเชื้อในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การเลี้ยงเชื้อ

2.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็งลาดเอียง (YM slant) (ภาคผนวก ก. 1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก. 1.1) โดยเติมน้ำขจัดไอออนแล้ว (deionized water) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารแข็งลาดเอียงซึ่งมีเซลล์ยีสต์เจริญอยู่บนผิวหน้าของอาหาร จากนั้นปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที จนเชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด

2.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลล์ในการหมักแบบขวดเขย่า

ปิเปตหัวเชื้อจากข้อ 2.4.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ (ภาคผนวก ก. 2.1) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที

2.4.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลล์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบช

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.1 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ ปริมาตร 2.7 ลิตร ควบคุมภาวะของการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 โมลาร์เป็นสารสำหรับควบคุมความเป็นกรดด่าง และใช้อะดีคานอลละลายในน้ำปราศจากไอออนอัตราส่วน 5 : 15 (ปริมาตร : ปริมาตร) เป็นสารกำจัดฟอง (antifoam)

2.4.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลล์แบบต่อเนื่อง

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.1 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ปริมาตร 1.35 ลิตร ควบคุมภาวะของการหมักเช่นเดียวกับในข้อ 2.4.3 จนเชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด จึงมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์เข้าสู่ถังหมักพร้อมทั้งปล่อยน้ำหมักออกจากถังหมักด้วยอัตราที่เท่ากัน

2.5 วิธีวิเคราะห์

2.5.1 การวิเคราะห์การเจริญของยีสต์

นำน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนน้ำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลต่อไป ส่วนกากนำมาล้างโดยเติมน้ำขจัดไอออนแล้ว 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วปั่นด้วยความเร็ว 3000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนน้ำทิ้ง นำส่วนกากมาล้างโดยวิธีเดิมอีกครั้ง จากนั้นเติมน้ำที่ขจัดไอออนแล้ว 20 มิลลิลิตร ลงในส่วนกากที่ผ่านการล้างแล้ว เขย่าให้เข้ากัน นำไปเจือจาง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้น้ำขจัดไอออนแล้วเป็นตัวเปรียบเทียบ (ค่าที่วัดได้ไม่ควรเกิน 0.600) คำนวณหาน้ำหนักแห้งมีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตรจากกราฟมาตรฐานของน้ำหนักแห้ง (ภาคผนวก ค. 1)

2.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำหมัก

2.5.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (Bernfeld,1955)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข. 1) เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด นาน 5 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็งแล้วเติมน้ำที่ขจัดไอออน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำขจัดไอออนเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ในช่วงความเข้มข้น 0.1 - 1.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค. 2)

2.5.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

เติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส (ภาคผนวก ข. 2) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดในตัวอย่าง ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.5.2.1

2.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) โดยวิธี Kjeldahl

นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในขวดกลั่น (Kjeldahl flask) ขนาด 300 มิลลิลิตรเติมของผสมของเกลือ 7 กรัม (ภาคผนวก ข. 3.1) และเติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุม (digestor) ด้วยเครื่อง Buchi 425 ในตู้ควันจนได้สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 37 (น้ำหนัก:ปริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร รองรับสารที่กลั่นออกมาด้วยสารละลายกรดบอริคที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนัก:ปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ผสม (ภาคผนวก ข. 3.2) อยู่ 3 หยด กลั่นตัวอย่างจนกระทั่งสารละลายกรดบอริกมีปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาดิเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก จนได้สารละลายสีม่วง โดยที่

ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด = (A - B) x N x 1.4

โดยกำหนดให้

A = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ติเตรทกับตัวอย่าง

B = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ติเตรทกับแบลงค์

N = ความเข้มข้น (นอร์มอล) ของกรดไฮโดรคลอริก