บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องควบคุมและวัดค่าการละลายของออกซิเจน (DO controller) รุ่น FM – 2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai co.Ltd., Japan
2. เครื่องวัดและควบคุมความเป็นกรด ด่าง (pH controller) รุ่น FC – 2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai co.Ltd., Japan
3. ปั๊มเติมสาร (pump box) รุ่น FB – 2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai co.Ltd., Japan
4. ปั๊มเติมสาร (peristatic pump) รุ่น MP – 3 N ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai co.Ltd., Japan
5. อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรด ด่าง (pH probe) รุ่น FM – 2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai co.Ltd., Japan
6. ปั๊มอากาศและควบคุมอัตราการให้อากาศ (Aereation unit) รุ่น MAU – 1 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai co.Ltd., Japan
7. เครื่องปรับค่ากระแสไฟฟ้า (Step down transformer) Auto – 05 ของบริษัท Tron Advance Technology Transformer.,USA
8. กล้องจุลทรรศน์ (Miroscope) ของ Olympus optical co.Ltd., Taiwan
9. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G – 27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc,USA
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น GENESYS 20 ของบริษัท Spectronic Unicam, USA
11. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด ด่าง (pH meter) รุ่น SevenEasy ของบริษัท Mettler – Toledo GmbH Schwenzenbach, Swiltzerland
12. ตู้อบแห้ง (hot air oven) รุ่น Contherm series Five ของบริษัท Contherm Scientific LTD., New Zeland
13. ตู้อบแห้ง (hot air oven) รุ่น UL – 80 ของบริษัท Memmert GmbH, Germany

14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath shaker) รุ่น WB 14 ของบริษัท Memmert, Germany.
15. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo, Japan
16. อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิลิตร ของบริษัท Boeco, Germany
17. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P200 P1000 P5000 และ P 10,000 ของบริษัท Gilson, France
18. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan
19. กระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต (celiuiose acetate membrane) รูขนาด 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Satorius, Germany

3.2 เคมีภัณฑ์

1. น้ำตาลทรายขาว ของบริษัทมิตรผล, ประเทศไทย
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ของบริษัท Merck, Germany
4. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท HBD Laboratory Chemicals Ltd., England
5. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท May and Baker Ltd., England
6. อะซิโตรไนไตร (CH_3CN) ของบริษัท Merck, Germany
7. น้ำตาลฟรักโตส (fructose) ของบริษัท Merck, Germany
8. น้ำตาลกลูโคส (glucose) ของบริษัท Merck, Germany
9. น้ำตาสซูโครส (sucrose) ของบริษัท Merck, Germany
10. น้ำตาลราฟฟิโนส (raffinose) Sigma, Germany
11. ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดเคสโตส (kestose) ของบริษัท Wako Pure Chemical., Japan
12. ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดนีสโตส (nystose) ของบริษัท Wako Pure Chemical., Japan
13. กรดไฮโดรคลอริค (HCl) ของบริษัท Riedel – dehaen, Germany
14. ทวีน 80 ของบริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd., England
15. ชุดตรวจกลูโคส (glucoseoxidase test) ของบริษัท Biotech Reagent, ประเทศไทย

3.3 แอร์ลิฟท์รีแอคเตอร์

ทำการสร้างแอร์ลิฟท์รีแอคเตอร์ (air lift reactor) โดยใช้ท่ออะคลิลิค (acrylic) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 5.4 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร และเจาะรูด้านข้างท่ออะคลิลิคที่ความสูง 24 เซนติเมตร และปิดปลายทั้งสองข้างของคอลัมน์ด้วยลูกยางเบอร์ 20 เจาะรูด้านล่างลูกยางสองรูเพื่อเป็นทางสำหรับเติมอาหารและอากาศเข้าสู่คอลัมน์โดยผ่านทางท่ออะลูมิเนียม (aluminium)

3.4 จุลินทรีย์

ทำการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOS) โดยใช้จุลินทรีย์ *Penicillium* sp. H12 ที่คัดแยกได้ในประเทศไทยโดยเสาวนีย์ ศิริรูป (2539)

3.5 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

3.5.1 การเตรียมสปอร์ของ *Penicillium* sp. H12

เลี้ยง *Penicillium* sp. H12 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง PDA (potato drextose agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน (ได้สปอร์จำนวนมากพอ) จากนั้นนำน้ำปลอดประจุผสมทวีน 80 (tween 80) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เติมลงในหลอดที่ใช้เลี้ยง *Penicillium* sp. H12 อายุ 4 วัน แล้วทำการขูดสปอร์ให้หลุดออกมา จากนั้นทำการนับจำนวนสปอร์ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้ได้สปอร์ความเข้มข้น $2x10^9$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.5.2 การเตรียมสายใยสำหรับทำการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

นำสปอร์ความเข้มข้น $2x10^9$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากข้อ 3.5.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.6 การผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้แอร์ลิฟท์รีแอคเตอร์

ถ่ายหัวเชื้อ *Penicillium* sp. H12 อายุ 18 ชั่วโมง ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 50 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารสำหรับผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในคอลัมน์ โดยใช้อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ค่าความเป็นกรด ด่างเริ่มต้น 5.0 ที่อุณหภูมิห้อง (28 – 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

3.7 การศึกษาผลของอัตราการให้อากาศและหัวเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้แอร์ลิฟท์รีแอคเตอร์ที่สร้างขึ้น

ทำการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้กล้าเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.2 ในสภาวะที่ต่างกัน 4 สภาวะคือ

1. ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรร่วมกับอัตราการให้อากาศ 0.2 vvm.
2. ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรร่วมกับอัตราการให้อากาศ 1 vvm.
3. ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรร่วมกับอัตราการให้อากาศ 0.2 vvm.
4. ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรร่วมกับอัตราการให้อากาศ 1 vvm.

ทำการผลิตเป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาปริมาณของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้และแนวโน้มของการผลิตรวมทั้งวิเคราะห์ผลของอัตราการให้อากาศและปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตโดยใช้วิธีทางสถิติ

3.8 การหาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ทำการแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.2 ตั้งแต่ 10, 20 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงคอลัมน์โดยควบคุมอัตราการให้อากาศ 0.2 vvm. ค่าความเป็นกรด ด่างเริ่มต้น 5.0 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้เมื่อใช้หัวเชื้อเริ่มต้นต่าง ๆ

3.9 การผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบต่อเนื่อง (continuous production)

ใช้หัวเชื้อสายใยอายุ 18 ชั่วโมง ในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.8 ใส่ลงในอาหารสำหรับผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในคอลัมน์ โดยใช้อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm. ค่าความเป็นกรด ด่างเริ่มต้น 5.0 ทำการผลิตเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมน้ำตาลซูโครสลงในคอลัมน์อย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการเติม 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ตามช่วงเวลาที่กำหนดเป็นเวลา 54 ชั่วโมง

3.10 การวิเคราะห์ปริมาณของกลูโคสโดยชุดตรวจกลูโคส (glucoseoxidase test)

ละลายผงของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสลงในขวดตัวทำละลายตามปริมาตรที่ระบุไว้บนฉลากน้ำยา จากนั้นนำตัวอย่างน้ำตาลมาทำการเจือจางให้เหมาะสม ทำการเติม working reagent 1.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมตัวอย่างน้ำตาลที่เจือจางไว้แล้ว 0.01 มิลลิลิตร ลงไปนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยปริมาณของกลูโคสหาได้โดย

Glucose (mg/dl) = (OD tested glucose/OD standard) x standard glucose conc.

3.11 การวิเคราะห์หาปริมาณฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (วีระพงษ์ พรประสาทผล, 2545)

นำตัวอย่างของน้ำหมักที่เก็บในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการผลิตมากรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำมาตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงยี่ห้อ Waters โดยใช้คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต (Amino Propyl Column) ปั๊มรุ่น Waters 515 และ เครื่องตรวจสอบชนิด Refractive Index Detector รุ่น 410 ใช้อะซิโตรไนไตรเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตรต่อปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา โดยให้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้น้ำตาลราฟฟิโนส (raffinose) เป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard)

3.12 การหาค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านโดยปริมาตรของออกซิเจนโดยวิธีซัลไฟต์ออกซิเดชั่น (Sulphite Oxidation Method) (Bailey และ Ollis, 1986)

ละลายโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) 5 เปอร์เซ็นต์ และคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 0.32 กรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในคอลัมน์โดยปรับอัตราการให้อากาศ 0.2 และ 1 vvm. ออกซิเจน (O_2) จะทำปฏิกิริยากับโซเดียมซัลไฟต์โดยมีคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก ๆ 10 นาที จนครบ 60 นาที แล้วนำมาไตรเตรทกับสารละลายไอโอดีน (I_2) โดยใช้น้ำแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรเป็นสารอินดิเคเตอร์หาปริมาณของโซเดียมซัลไฟต์ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับออกซิเจนโดยใส่น้ำแข็งแห้ง (dry ice) ทันทีเพื่อป้องกันออกซิเจนละลายลงไปในขณะทำการไตรเตรทแล้วทำการหาค่าปริมาณของไอโอดีน (มิลลิโมล) ที่ใช้ในช่วงเวลาต่าง ๆ นำมาสร้างกราฟระหว่างปริมาณไอโอดีนที่ใช้กับเวลาแล้วหาค่าความชันของกราฟเมื่อใช้อัตราการให้อากาศต่าง ๆ โดยค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านโดยปริมาตรของออกซิเจนมีค่าเท่ากับ slope/2C* เมื่อ C* = 0.21 มิลลิโมลต่อลิตร (equilibrium oxygen concentration)

3.13 การหาปริมาณน้ำตาลฟรักโตส (Dische และ Borenfreund, 1951)

ทำการเจือจางสารตัวอย่างที่ต้องการจะวิเคราะห์ให้ได้ 300 เท่าด้วยน้ำกลั่นแล้วดูดมา 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 70 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟิวริค 3 มิลลิลิตร, 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซิสทีอีนไฮโครคลอไรด์ (cysteine-HCl) 0.1 มิลลิลิตร และตามด้วย 0.12 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอลิคคาร์บาโซล (alcoholic carbazole) 0.1 มิลลิลิตรทันที เขย่าแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเมื่อครบเวลานำมาแช่ในอ่างน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย