บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

1. <u>เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย</u>

1.1 เครื่องเขย่าบ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubater shaker) รุ่น G-27 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc. NJ. USA.

1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น KR 20000T ของบริษัท KUBOTA Japan

1.3 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb

1.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Aquatherm Water Shaker ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc. USA.

1.5 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น pH M82 ของบริษัท Radiometer Copenhagen

1.6 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น Auto Steam Sterilizer ของบริษัท LAP Co. Ltd. Japan

1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Minor 35 MSE ของบริษัท MSE Ltd. England

1.8 เครื่องนับเม็ดเลือดแดง (haemacytometer) รุ่น Neubauer bright line ของบริษัท Boeco West Germany

1.9 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CHA ของบริษัท Olympus Optical Co. Ltd. Japan

1.10 เครื่องผสม (mixer) รุ่น Vortex-Genie ของบริษัท Scientific Industry

1.11 เครื่องอุลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) รุ่น CH_2 Hollow Fiber ของบริษัท Amicon

1.12 เครื่องหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300 ของบริษัท LE Marubishi Co., Ltd. Japan

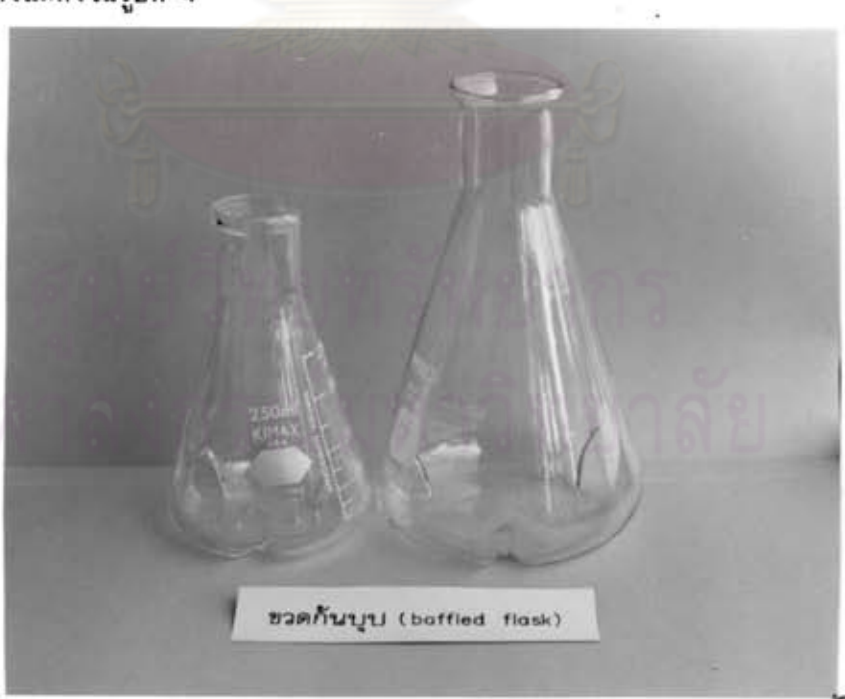
1.13 เครื่องควบคุมพีเอช (pH controller) เครื่องวัดออกซิเจน (D.O. meter), เครื่องเติมสารกำจัดฟอง (antifoamer) ของบริษัท LE. Marubishi Co., Ltd. Japan

1.14 เครื่องอัดลม (air compressor) รุ่น SO 45 E2-ASY ของบริษัท Haug A.G. Maschinenfabrik Switzerland

1.15 เครื่องทำน้ำเย็น (cooling system) รุ่น Eyela Cool Ace CA-101 ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co. Ltd.

1.16 เครื่องวิเคราะห์คาร์บอนไนโตรเจน รุ่น MT 500 ของบริษัท Yamaco Japan

1.17 ขวดก้นบุบ (baffled flask) ดัดแปลงจากขวดแก้วทรงกรวย (Erlemeyer flask) ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ขวดก้นบุบ (baffled flask)

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การเก็บรักษาเชื้อราที่ใช้ในการวิจัย

การเก็บเชื้อราที่ใช้ในการวิจัยตลอดวิทยานิพนธ์นี้ ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Hayashida (1975) โดยใช้ข้าวเจ้าสุก ประมาณ 1 กรัม ใส่ในขวดทรงกรวยขนาด 50 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 15 นาที เขี่ยเส้นใยของเชื้อราลงบนข้าวแบบปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3-7 วัน จนมีการเจริญและสร้างสปอร์ ปิดจุกสำลีด้วยพาราฟิล์ม เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ไว้ใช้ตลอดวิทยานิพนธ์

3. การเตรียมสปอร์ของ *Rhizopus* sp. เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

เขี่ยเส้นใยของเชื้อราลงบนหลอดอาหารแข็งเอียง ที่ประกอบด้วยแป้งข้าวเจ้า 2% เปปโตน 0.5% สารสกัดยีสต์ 0.2% KH_2PO_4 0.1% $MgSO_4$ 0.05% $FeSO_4$ 0.0001% วุ้น 2% พีเอช 5.5

บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน เติมน้ำที่มี Tween 80 0.1% ปริมาตร 10 มล. เขย่าให้กระจายด้วยเครื่องเขย่าหลอดกรองแบบปลอดเชื้อผ่านผ้ากรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว นับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (วิธีการนับแสดงในภาคผนวก ค)

4. การหาสภาพทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *Rhizopus* sp. เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

เติมสารแขวนลอยของสปอร์ใน 0.1% Tween 80 ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1×10^7 สปอร์/มล. ปริมาณ 1 มล. ลงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย แป้งข้าวเจ้า 2% เปปโตน 0.5% สารสกัดยีสต์ 0.2% KH_2PO_4 0.1% $MgSO_4$ 0.05% $FeSO_4$ 0.0001% พีเอช 5.5 ปริมาณ 50 มล. บ่มที่ 30 °ซ ในเครื่องบ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิเขย่าแบบวงกลม 250 รอบ/นาที 24 ชั่วโมง

4.1 เปรียบเทียบวัตถุที่ช่วยในการเขย่า คือใช้ลูกแก้ว (glass bead) และขดลวดสเตนเลส โดยเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนเติมสปอร์

4.2 เปรียบเทียบชนิดของขวดแก้วที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสปอร์ คือ ใช้ขวดแก้วทรงกรวย (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มล. และขวดก้นบุบ (baffled flask) ขนาด 250 มล.

5. การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกลูโคอะไมเลสระหว่าง *Rhizopus* spp. 2 สายพันธุ์

5.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น เติมสปอร์แขวนลอย ใน 0.1% Tween 80 ปริมาณ 10 สปอร์/มล. ปริมาณ 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกับข้อ 4 ปริมาณ 50 มล. ในขวดก้นบุบขนาด 250 มล. บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 35 °ซ เขย่าแบบวงกลม 200 รอบ/นาที

5.2 การผลิตกลูโคอะไมเลส นำเชื้อเริ่มต้นอายุ 24 ชั่วโมง 5 มล. เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มล. ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 3% กากถั่วเหลือง 1% แอมโมเนียมซิเตรต $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ 0.3% KH_2PO_4 0.18% Na_2HPO_4 0.02% $MgSO_4$ 0.1% $FeSO_4$ 0.005% พีเอช 4.5 ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล.

6. การเปรียบเทียบผลของการย่อยโปรตีนในกากถั่วเหลืองกับการผลิตกลูโคอะไมเลสของ *Rhizopus* sp. 2 สายพันธุ์

นำเชื้อเริ่มต้นที่มีอายุ 24 ชั่วโมง 5 มล. เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มล. 2 ชนิด ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 3% แอมโมเนียมซิเตรต 0.3% KH_2PO_4 0.18% Na_2HPO_4 0.02% $MgSO_4$ 0/1% $FeSO_4$ 0.005% และกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วย alcalase หรือที่ยังไม่ได้ย่อย พีเอช 4.5

บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ สำหรับ *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ I และ 35 °ซ สำหรับ *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II

7. การทดลองแบบแฟกตอเรียล

ทดสอบปัจจัย 3 ชนิด คือ ชนิดของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งโปรตีน และการย่อยโปรตีน แต่ละปัจจัยมี 2 ระดับ ดังนี้

ปัจจัย	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การย่อยโปรตีน
ระดับที่ 1	แป้งข้าวเจ้า	กากรำข้าว	ย่อย (+)
ระดับที่ 2	แป้งข้าวเหนียว	กากถั่วเหลือง	ไม่ย่อย (-)

นำเชื้อเริ่มต้นอายุ 24 ชั่วโมง 20 มล. เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มล. ประกอบด้วย แป้งข้าวเจ้าหรือแป้งข้าวเหนียว 4% กากรำหรือกากถั่วที่ย่อยและไม่ได้ย่อยโปรตีน 1% แอมโมเนียมซิเตรต 0.3% KH_2PO_4 0.18% Na_2HPO_4 0.02% $MgSO_4$ 0.1% $FeSO_4$ 0.005% พีเอช 4.5

บ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ ในเครื่องเขย่าแบบวงกลม 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 9 เชื้อราที่ใช้ในการทดลองคือ *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II

8. <u>การหาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกลูโคอะไมเลส</u>

8.1 ทดลองเลี้ยง *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II ที่อุณหภูมิคงที่คือ 35 °ซ เปลี่ยนพีเอชต่าง ๆ กันคือ 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0

8.2 ออกแบบการทดลองวิธีแฟกตอเรียลทดสอบ 2 ปัจจัยคือ อุณหภูมิและพีเอช แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับดังนี้

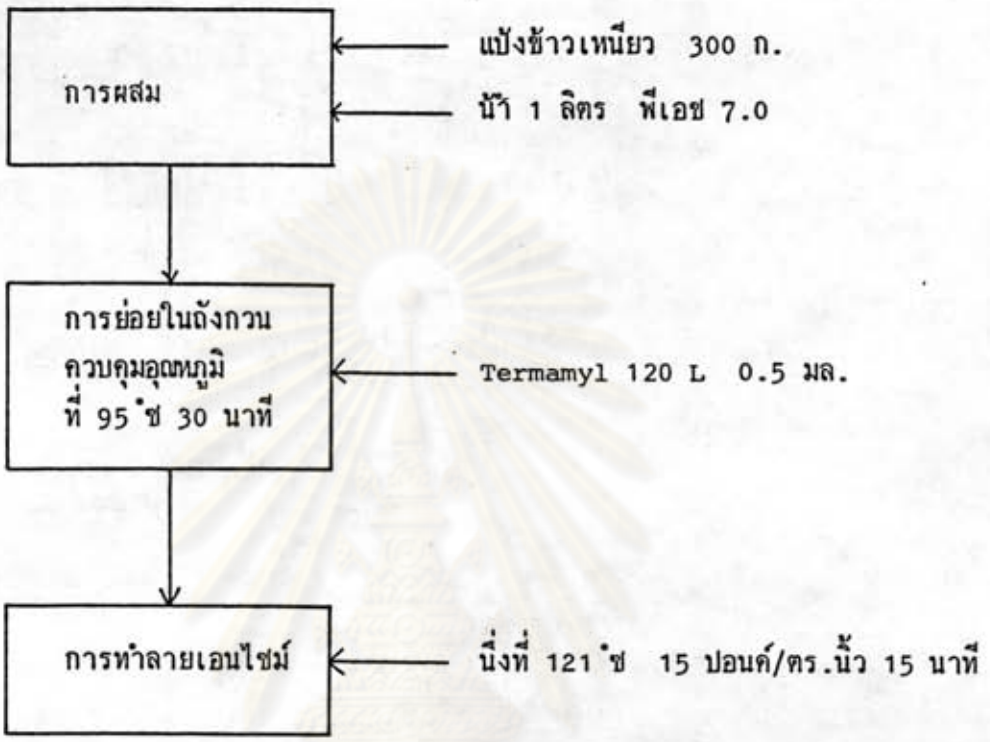
ปัจจัย	อุณหภูมิ (°ซ)	พีเอช
ระดับที่ 1	30	5.5
ระดับที่ 2	35	4.5
ระดับที่ 3	40	3.5

8.3 ทดลองเลี้ยง *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II ที่พีเอชคงที่คือ 5.5 เปลี่ยนอุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 30, 40 และ 50 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. <u>การหาอัตราส่วน C/N ที่เหมาะสมต่อการผลิตกลูโคอะไมเลส</u>

9.1 ทำการย่อยแป้งข้าวเหนียวด้วย α amylase (Termamyl 120 L, NOVO) ตามขั้นตอน



นำแป้งที่ย่อยได้มาหาสมมูลย์เดกซโตรส (D.E.) หน่วยเป็นกรัมของน้ำตาลรีดิวส์ต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (ภาคผนวก ง) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ

9.2 การเปรียบเทียบอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน

นำแป้งข้าวเหนียวจากข้อ 9.1 มาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ คำนวณปรับอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน ระหว่าง 17.5 ถึง 30 โดยให้กากรำมีปริมาณคงที่คือ 1% แอมโมเนียมซิเตรต 0.3%, KH_2PO_4 0.18%, Na_2HPO_4 0.02%, $MgSO_4$ 0.1% $FeSO_4$ 0.005% พีเอช 5.5 โดยค่าคาร์บอนและไนโตรเจนคำนวณจากปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนทั้งหมด ในแป้งข้าวเหนียว, กากรำ และแอมโมเนียมซิเตรต (ภาคผนวก จ)

บ่มกับเชื้อเริ่มต้นที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณ 20 มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มล. อุณหภูมิ 35 °ซ ในเครื่องเขย่าแบบวงกลม ความเร็ว 250 รอบ/นาที นำมาหาแอคทิวิตีของกลูโคอะไมเลสสูงสุด

10. <u>การเลี้ยง *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II เพื่อผลิตกลูโคอะไมเลสในถังหมักขนาด 5 ลิตร</u>

นำเชื้อเริ่มต้นของ *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II อายุ 24 ชั่วโมง 200 มล. เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.5 ลิตร (ปริมาณหัวเชื้อ 8%) ประกอบด้วยแป้งข้าวเหนียว 9% อัลฟาอะไมเลส (NOVO 120 L) 5×10^{-4} % (น้ำหนัก/ปริมาตร) รำข้าวสกัดน้ำมันแล้ว 1% แอมโมเนียมซิเตรต 0.3% KH_2PO_4 0.18% Na_2HPO_4 0.02% $MgSO_4$ 0.1% $FeSO_4$ 0.005% พีเอช 5.5 โดยย่อยแป้งข้าวเหนียวด้วยอัลฟาอะไมเลสระหว่างการทำแป้งให้เกิดเจล ที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 15 นาที การหมักในถังหมักควบคุมอุณหภูมิ 40 °ซ ใช้น้ำมันรำข้าว (บริษัทธนากรน้ำมันพืช) เป็นสารกำจัดฟอง วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายด้วย dissolved oxygen probe ตั้งค่าออกซิเจนที่ละลายเริ่มต้น 15 ppm ควบคุมพีเอช 5.0-5.5 ด้วย NaOH 10% โดยเครื่องควบคุมพีเอชตลอดการทดลอง

10.1 ทำการทดลองแบบแฟคทอเรียล ทดสอบปัจจัย 2 ชนิด 2 ระดับ โดยมีการทำ 2 ซ้ำ ที่จุดกลางของ 2 ระดับ ดังนี้

ปัจจัย	การให้อากาศ (vvm)	การกวน (รอบต่อนาที)
ระดับที่ 1	1	50
ระดับที่ 2	2	150
ทำ 2 ซ้ำที่จุดกลาง	1.5	100

10.2 ทำการทดลองเปรียบเทียบอัตราการกวน 50, 150, 200, 300, 400 รอบต่อนาที ที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm

เก็บตัวอย่างครั้งละ 20 มล. จุดแรกที่ชั่วโมงที่ 8 และทุก ๆ 2 ชั่วโมงต่อมา นำตัวอย่างไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์แอคทิวิตีของกลูโคอะไมเลสตามวิธีในภาคผนวก ง นำส่วนของแข็งมาวิเคราะห์การเจริญด้วยการหากลูโคซามีนตามวิธีในภาคผนวก ง

11. Dynamic measurement

ทำการศึกษาสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (oxygen transfer coefficient) ในการหมักแบบ batch ของ *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II ดังนี้

11.1 เพาะเลี้ยง *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II ตามวิธีข้อ 10 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตั้งค่าออกซิเจนที่ละลายเริ่มต้น 15 ส่วนในล้านส่วน

ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	2.5	ลิตร
อัตราการกวน	200	รอบต่อนาที
อัตราการให้อากาศ	1.0	ปริมาตร/ปริมาตรอาหาร/นาที
อุณหภูมิ	30	°ซ
พีเอช	5.5	

11.2 เมื่อถึงเวลาการหมักชั่วโมงที่ 6 ทำการปิดการให้อากาศและการกวนเป็นเวลา 70 นาที บันทึกปริมาณออกซิเจนละลายที่ลดลง

11.3 เปิดการให้อากาศ และการกวนอีกครั้ง บันทึกปริมาณออกซิเจนที่ละลายที่เพิ่มขึ้นจนคงที่อีกครั้งหนึ่ง

นำค่าออกซิเจนละลายที่บันทึกไว้ไปคำนวณหาสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน ตามวิธี dynamic measurement (Wang และคณะ, 1979)

12. การเตรียมเอนไซม์เหลวให้บริสุทธิ์และเข้มข้นด้วยอุลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration)

นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II ในข้อ 11 ปริมาตร 400 มล. มาทำให้เข้มข้น โดยผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ (membrane) 2 ขนาดคือ

12.1 ผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ขนาดกักโมเลกุล (molecular weight cut off) 100,000 รุ่น HIP 100-43 (Amicon) ซึ่งจะมีพื้นที่ผิวเยื่อแผ่นสังเคราะห์ทั้งหมด 0.03 ตร.เมตร ใช้อัตราการไหลกลับ (recirculation rate) 0.6 มล./นาที/ตร.ซม. ความดัน 1.0 กก./ตร.ซม. (kilogram force cm^{-2}) ปริมาตรเอนไซม์เริ่มต้น (feed) 400 มล. พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 4 °ซ ทำ diafiltration โดยเติมอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 400 มล. นำสารละลายที่ผ่านเยื่อสังเคราะห์ (permeate) มาผ่านเยื่อสังเคราะห์ชนิดที่ 2

12.2 ผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ขนาดกักโมเลกุล 30,000 รุ่น HIP 30-20 (Amicon) มีพื้นที่ผิวทั้งหมด 0.06 ตร.เมตร อัตราการไหลกลับ 1 มล./นาที/ตร.ซม. ความดัน 1.0 กก./ตร.ซม. ปริมาตรเอนไซม์เริ่มต้น 535 มล. พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 4 °ซ ทำเอนไซม์ให้เข้มข้นเป็น 10 เท่า

ทั้ง 2 ข้อ ศึกษาค่าต่าง ๆ ดังนี้

1. ปริมาณโปรตีน ใช้วิธีของ Lowry (ภาคผนวก ง)

2. ปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) นำสารละลายตัวอย่าง 1 มล. อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ปริมาณกลูโคอะไมเลส (ทำตามวิธีภาคผนวก ง)

4. อัตราการไหล (flux, J) หาระยะเวลาของการไหลที่ได้สารละลายที่ผ่านเยื่อสังเคราะห์ทุก ๆ 5 มล.

คำนวณอัตราการไหลในรูปของปริมาตรสารละลายที่ผ่านเยื่อสังเคราะห์ต่อเวลา x พื้นที่ผิวเยื่อสังเคราะห์ หรือจากสมการ 5 ในบทที่ 1 ข้อ 12.3

13. <u>การตรวจสอบประเภทของเอนไซม์โดยโครมาโตกราฟฟีกระดาษ</u>

นำเอนไซม์จาก *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II มาบ่มกับน้ำแป้ง 1% (soluble starch) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ พีเอช 5.5 เป็นเวลา 10 นาที ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีกระดาษแบบ ascending เทียบกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, มอลโตส และไอโซมอลโตส (ภาคผนวก ง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย