บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Laboratory Hot Plate PC-101, Corning Glass Works, Corning, NY ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries,Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic-21 ของบริษัท Bausch & Lomb จากประเทศสหรัฐอเมริกา และ UV-160 ของบริษัท Shimadzu Corporation, Kyoto ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (Rotary incubator shaker) รุ่น RC-TK ของบริษัท INFORS ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบ reciprocal (Reciprocal incubator shaker) รุ่น RC-TK ของบริษัท INFORS ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น

หัวตรวจวัดออกซิเจนที่ละลาย (Dissolved oxygen electrode) รุ่น OE-8270G ของบริษัท TOA Electrics Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (Fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300-5L ใบพัดแบบกังหัน 6 ใบ (6 blade turbine) เครื่องควบคุมภาวะ (Bioprocess controller) รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องอัดอากาศ (Air compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (Circuration type hardy cooler) รุ่น TRL-108ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 501 ของบริษัท Sentron ประเทศญี่ปุ่น และมาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Combination Electrode) สำหรับถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น D-26 ของบริษัท TOA Electrics Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-26 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น และรุ่น KT-30SD ของบริษัท ALP Co.Ltd., Tokyo ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องอบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (Hot air oven) รุ่น 94789 ของบริษัท Contherm Scientific Ltd.. ประเทศนิวซีแลนด์

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น MTR 152 ของบริษัท Sanyo Electric Co.Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรดซัลฟิวริก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดไดไนโทรซาลิไซลิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไฮโดรคลอลิก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เพปโทน	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
โพแทสเซียมเฟร์ริไซยาไนด์	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปทะไฮเดรต	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
ไทรโซเดียมฟอสเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ประเทศไทย
เอทานอล	กรมสรรพมิต	ประเทศไทย
เอนไซม์เซลลูเลส	NOVO NORDISK	ประเทศเดนมาร์ก
แอมโมเนียมซัลเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี

2.2 <u>เชื้อจุลินทรีย์</u>

เชื้อสายพันธุ์ตั้งต้นสำหรับการคัดเลือกเพื่อใช้ในการทดลอง *Acetobacter xylinum* สายพันธุ์ ATCC 23747, 23769, 23770 และ 53263

2.3 การเก็บรักษาและเลี้ยงเชื้อ

2.3.1 การเก็บรักษาเชื้อ

เขี่ยเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แล้วลาก (streak) เชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแข็งเอียงลาด S-1 (agar slant) (ภาคผนวก ก 1.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เก็บเชื้อในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อและการผลิตเซลลูโลส

2.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็งเอียงลาด

เขี่ยเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แล้วลาก (streak) เชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแข็งเอียงลาด S-1 (agar slant)(ภาคผนวก ก 1.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

2.3.2.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอย (cell suspension)

เลี้ยงเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็งเอียงลาดตามข้อ 2.3.2.1 ปิเปตต์น้ำที่ขจัดไอออนออกแล้วและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (sterile deionized water) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนผิวอาหาร เขี่ยเชื้อให้กระจายในน้ำโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อและเครื่องเขย่าผสม (vortex mixer)

2.3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว

เลี้ยงเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็งเอียงลาดตามข้อ 2.3.2.1 และทำให้เป็นเซลล์แขวนลอยตามข้อ 2.3.2.2 ปิเปตต์เซลล์แขวนลอยที่ได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว (ภาคผนวก ก 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 และ 2.8) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในตู้เขย่าแบบหมุน(rotary) ที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที หรือเครื่องเขย่าแบบ reciprocal ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 ชั่วโมง

2.3.2.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลลูโลสในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.3.2.3 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร(5 เปอร์เซ็นต์ V/V) ลงในอาหารเหลว F-4, F-6 (ภาคผนวก ก 2.6,2.8) ปริมาตร 3 ลิตรซึ่งบรรจุในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ควบคุมภาวะตลอดการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.0 ด้วย 5 M NaOH ส่วนค่าอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ ตามที่ระบุไว้ในแต่ละการทดลอง

2.4 วิธีวิเคราะห์

2.4.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดโดยใช้มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง

2.4.2 การวัดการเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตต์น้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่เอนไซม์เซลลูเลสปริมาตร 10 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ปิเปตต์มา 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำขจัดไอออน 2 ครั้ง ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ที่ได้สู่กระทงอะลูมินัมฟอยล์ (aluminum foil) อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ (desiccator) แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดหักน้ำหนักกระทงอะลูมินัมฟอยล์ออก จะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง คำนวณค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)

2.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้กรดไดไนโทรซาลิไซลิก(ดัดแปลงจาก Bernfeld, 1955)

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจาง ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโทรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ปิดปากหลอดทดลอง นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำเย็นเป็นเวลา 3 นาที เติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำขจัดไอออนแทนสารละลายตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หน่วยเป็นกรัมต่อลิตรจากกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ง 1)

2.4.4 การวัดปริมาณเซลลูโลสโดยการหาน้ำหนักแห้ง

ปิเปตต์น้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำขจัดไอออน 2 ครั้ง ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ล้างเซลลูโลสที่ได้สู่กระทงอะลูมินัมฟอยล์ (aluminum foil) อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดหักน้ำหนักกระทงอะลูมินัมฟอยล์และน้ำหนักเซลล์แห้งจากข้อ 2.4.2 ออก จะได้น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.4.5 การวิเคราะห์แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส (Novo Nordisk, 1982)

เตรียมสารละลายเอนไซม์โดยละลายใน 10% 0.1 M สารละลายแอซีเทตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข 1) เติมสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรและซับสเตรต (ภาคผนวก ค 1.2) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายหยุดปฏิกิริยา (ภาคผนวก ข 3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายเฟร์ริ (ภาคผนวก ข 4) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ปิดหลอดทดลองต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร