หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีดำเนินการทดลองและอุปกรณ์

1. การลดปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง ทำได้โดยใช้หลักการทางกายภาพและชีวภาพ (Coursey, 1973) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลังมีวิธีทำดังต่อไปนี้

การศึกษาปริมาณไซยาไนด์

การเตรียมมันสำปะหลัง ใช้หัวมันสำปะหลังสด ล้างให้สะอาด หั่นทั้งเปลือกเป็นชิ้นขนาด 3x4x2 ซม. นำไปทดลองตามหัวข้อต่อไปนี้

ก. ผลของการใช้ปัจจัยทางกายภาพต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง จากรายงานผลการทดลองของ Cooke และ Maduagwu (1978), Gomez และคณะ (1984 a, b, c) และ Nemoto (1940) พบว่าแสงแดด, ความร้อนมีผลต่อการลดปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง จึงได้วางแผนการทดลองดังนี้

1.1 การใช้ช่วงคลื่นแสงต่าง ๆ เพื่อดูผลของการเปลี่ยนแปลงไซยาไนด์เมื่อนำชิ้นมันไปไว้ในที่ ๆ ไม่มีแสง และเมื่ออยู่ในแสงช่วงความยาวคลื่นต่าง ๆ

นำชิ้นมันที่หั่นแล้ว 1.5 ก.ก. ใส่ในถาดโลหะขนาด 40x25 ซม. แผ่ให้เต็มพื้นที่ จะได้ความหนาประมาณ 3 ซม. เก็บไว้ในตู้ควบคุมการทดลองแล้วปฏิบัติดังนี้

1.1.1 ให้การทดลองอยู่ในที่ ๆ ไม่มีแสงเป็นเวลา 3 วัน

1.1.2 ให้แสงสีเขียว ความยาวคลื่นประมาณ 500 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 วัน

1.1.3 ให้แสงสีแดง ความยาวคลื่นประมาณ 700 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 วัน

1.1.4 ให้แสงสีน้ำเงิน ความยาวคลื่นประมาณ 380 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 วัน

1.1.5 ให้แสงอุลตราไวโอเลต ความยาวคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 วัน

เก็บตัวอย่างทุก 12 ช.ม. แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น และปริมาณไซยาไนด์

1.2 การใช้แสงแดด เพื่อดูผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลังเมื่อนำไปผึ่งแดดบนพื้นคอนกรีต

นำยีนมันไปผึ่งแดดบนพื้นคอนกรีต ปริมาณ 7.5 ก.ก.ในพื้นที่ 0.5 ตารางเมตร จะได้ความหนาประมาณ 3 ซม. เป็นเวลา 3 วัน โดยเก็บมันเข้าใต้หลังคาในเวลากลางคืน เก็บตัวอย่างทุก 12 ช.ม. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น และปริมาณไซยาไนด์การทดลองนี้ทำในระหว่างฤดูฝนคือเดือนพฤษภาคม และฤดูร้อนในเดือนมีนาคม

1.3 การใช้ความร้อน เพื่อดูผลของการใช้ความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง โดยแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ การใช้ความร้อนที่ไม่มีไอน้ำ คือการอบมันในตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่ 50 °ซ. และการใช้ความร้อนที่มีไอน้ำ คือการนึ่งด้วยไอน้ำที่ 100 °ซ. มีวิธีทำดังนี้

1.3.1 การใช้ความร้อนแห้ง นำมันที่หั่นแล้ว 1.5 ก.ก. ใส่ในถาดโลหะขนาด 40x25 ซม. อบในตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่ 50 °ซ. เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ช.ม. นำไปวิเคราะห์หาความชื้นและปริมาณไซยาไนด์

1.3.2 การใช้ความร้อนที่มีไอน้ำ นำมันที่หั่นแล้วไปนึ่งด้วยไอน้ำที่ 100 °ซ. เก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0, 5, 10, 20, และ 30 นาที นำไปวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นและปริมาณไซยาไนด์

1.4 การลดไซยาไนด์ในมันสำปะหลังโดยการใช้กระบวนการ จากการทดลอง 1.1-1.3 ได้วางแผนการทดลองเพื่อเป็นการกำจัดไซยาไนด์ในมันสำปะหลังอีกวิธีหนึ่ง

โดยใช้กระบวนการติดต่อกันคือ การหั่น, การผึ่งแดด, และการแช่น้ำ วิธีทดลองมีดังนี้

นำยั่นมันมาผึ่งแดดบนพื้นคอนกรีต จนเหลือความชื้นประมาณ 10% จะใช้เวลาประมาณ 3 วัน เก็บชิ้นมันที่ผึ่งแดดแล้ว ไว้เป็นเวลา 1 เดือน นำมาแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30^{0}ซ. เป็นเวลา 90 นาที เก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 0, 30, 60 และ 90 นาที นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไซยาไนด์และปริมาณน้ำที่ถูกดูดซับในชิ้นมัน

ข. ผลของปัจจัยทางชีวภาพต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง จากรายงานการทดลองของ Okafor (1977), Ketiku และคณะ (1978) และ Tinay และคณะ (1984) สรุปได้ว่า การหมักมันสำปะหลังในสภาพที่มีอากาศน้อย (Microaerophilic fermentation) จะทำให้ลดปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลังได้ การทดลองนี้ทำเพื่อศึกษาผลของการหมักต่อการลดปริมาณไซยาไนด์ในมัน และศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในกระบวนการหมัก

1.5 การหมักแบบกึ่งไร้อากาศ (Microaerophilic fermentation)

นำชิ้นมันที่หั่นแล้วอัดใส่ถุงพลาสติกขนาด 40x60 ซม. ในขวดโหลให้แน่น ถุงละ 4 ก.ก. ความหนาประมาณ 18 ซม. ปิดปากถุงให้สนิท หมักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 วัน มันสำปะหลังนี้ไม่ได้นึ่งฆ่าเชื้อ เมื่อบ่มมันหมักที่อุณหภูมิห้อง เชื้อจุลินทรีย์จะเจริญตามธรรมชาติ เก็บตัวอย่างทุกวัน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณไซยาไนด์, ความชื้น, จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของมันสำปะหลังหมัก

1.6 การหมักแบบมีอากาศ (Aerobic fermentation) โดยไม่มีการลดการปนเปื้อนและให้เชื้อเจริญตามธรรมชาติ

นำมันสดที่หั่นแล้วใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 500 มล. ขวดละ 30 กรัม เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน โดยให้เชื้อเจริญตามธรรมชาติ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของชิ้นมัน

2. การวิเคราะห์หาปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง โดยใช้วิธีของ Cook, R.D. (1978)

2.1 การเตรียมเอนไซม์ลิพาเมสจากเปลือกของหัวมันสำปะหลัง ใช้หัวมันสำปะหลังสด นำมาปอกเปลือกออก ตัดเปลือกมันเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.2x0.5 ซม. ปริมาณ 200 กรัม นำไปปั่นในเครื่องปั่นในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5 โดยแบ่งเป็นครั้งละ 25 กรัมต่ออะซิเตตบัฟเฟอร์ 200 มล. ปั่นที่ความเร็วสูงสุด 3 นาที แล้วนำไปปั่นทิ้งตะกอนที่ 10,000 g. 30 นาที น้ำใสที่ได้ (ประมาณ 1,600 มล.) นำไปตกตะกอนโปรตีนด้วย สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่ลุดอิ่มตัว 60% เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^{0}ซ. 16 ช.ม. โดยกวนตลอดเวลา นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 g. 1 ช.ม. ตะกอนที่ได้นำมาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0x150 มล. แล้วนำไปไดอะไลซิส (dialysis) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (3x50 ปริมาตร) สารละลายที่ได้เก็บในขวดพลาสติกที่ -18^{0}ซ.

2.2 การหาแอคติวิตีของเอนไซม์ลิพาเมสที่ได้จากการเตรียม

นำเอนไซม์ลิพาเมสที่สกัดได้ 0.1 มล. เติมลงในหลอดทดลองที่มีลิพาเมารีน 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 0.5 มล. บ่มที่ 30^{0}ซ. 30 นาที หยุดปฏิกริยาโดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ 0.6 มล. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไขยาไนด์โดยเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 2.8 มล., คลอรามินที 0.2 มล. (0.5 กรัมของคลอรามินทีในน้ำกลั่น 100 มล.) ผสมให้เข้ากันดีนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที เติมสารละลายไพริดีน-ไพราโซโลน รีเอเจนต์ 0.8 มล. (เป็นสารละลายของ 0.2 กรัม บิสไพราโซโลน และ 1.0 กรัม 3 - เมทธิล - 1 - ฟีนิล - 5 - ไพราโซโล่น ละลายใน 200 มล. ไพริดีน) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์เป็นตัวเทียบ (blank)

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขยาไนด์ในมันสำปะหลัง

นำตัวอย่างมันสำปะหลังที่ทดลอง มีน้ำหนักประมาณ 100 กรัม เมื่อเป็นตัวอย่างสด และถ้าเป็นตัวอย่างแห้งใช้ประมาณ 30 กรัม ปั่นในกรดฟอสฟอริก 0.1 โมลาร์ 160 มล. ที่ความเร็วต่ำ 15 วินาที และที่ความเร็วสูง 1 นาที 2 ครั้ง นำมากรองบนกระดาษกรอง glass microfiber filter (GF/A) ล้างถ้วยปั่นด้วยกรดฟอสฟอริก 0.1 โมลาร์ 60 มล. นำไปกรองรวมกัน วัดปริมาตรของน้ำที่กรองได้ประมาณ 220 มล. นำน้ำที่กรองได้นี้ไปวิเคราะห์

หาปริมาณไซยาไนด์ต่อไป

2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด ทำโดยนำตัวอย่างน้ำ ส่กัด 0.1 มล. เติมลงในหลอดจุกเกลียวที่มีฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 0.4 มล. และเติมเอนไซม์ 0.1 มล. ที่มีแอคติวิตี 0.3 หน่วย บ่มที่ 30^{0}ซ. 15 นาที หยุดปฏิกริยาด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ 0.6 มล.

2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์อิส์ระ ทำโดยใช้วิธีเดียวกัน แต่ใส่ฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6 แทนเอนไซม์ เนื่องจากปริมาณของคีโตนจะคงทนที่พีเอช 6

นำหลอดทดลองทั้ง 2 ชุดข้างต้นไปเติมคลอรามินที และส์ารละลายไพริดิน - ไพราโซโลน รีเอเจนต์ ดังอธิบายไว้ในข้อ 2.2 วัดค่าดูดกลืนแส่งที่ 620 นาโนเมตร เทียบค่ายองกรดไฮโดรไซยานิกจากกราฟมาตราฐาน และคำนวนเป็นปริมาณไซยาไนด์เป็น มก./กก. ของมันส์าปะหลัง

เมื่อนำค่าไซยาไนด์อิส์ระ (มก./กก.) หักออกจากค่าไซยาไนด์ทั้งหมด (มก./กก.) จะได้เป็นปริมาณไซยาไนด์เกาะติดเป็น มก./กก.

3. การหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างมันส์าปะหลัง

นำชิ้นมันส์าปะหลังมาชั่ง แล้วอบที่ 80^{0}ซ. เป็นเวลา 3 วัน จนน้ำหนักคงที่แล้วคำนวนเป็นเปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่าง

4. การนับจำนวนโคโลนี (colony) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในมันส์าปะหลังหมัก

ทำโดยใช้วิธีเทคนิคการเจือจาง (dilution plating technique) โดยนำตัวอย่างมัน 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 90 มล. ปั่นในเครื่องปั่นที่ปราศจากเชื้อ นำไปเจือจางที่ความเจือจางต่าง ๆ ประมาณ 10^{3}-10^{9} เท่า ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อแล้วใส่อาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ คือ อาหารวุ้นเอ็น เอ, อาหารวุ้นวายเอ็ม, อาหารวุ้นน้ำมะพร้าว (ข้อ 15) บ่มที่ 40°ซ. เป็นเวลา 5 วัน โดยพ่นก๊าซไนโตรเจนลงในถุงบ่มเชื้อเพื่อให้บรรยากาศในถุงบ่มเชื้อมีออกซิเจนน้อย นับจำนวนโคโลนียองแบคทีเรีย, ยีส์ต์, Geotrichum sp.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกคำนวนเป็นค่า log ของจำนวนเซลต่อมัน 1 กรัม

5. การเพิ่มโปรตีนในมันสำปะหลัง

จากการทดลองในข้อ 1.5 พบว่า การหมักมันสำปะหลังแบบกึ่งไร้อากาศ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก, ยีสต์ และ Geotrichum sp. ซึ่งเชื้อที่เจริญได้ในสภาพกึ่งไร้อากาศนี้สามารถเจริญได้ในขณะที่มีไซยาไนด์ 150 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ยังไม่ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สร้างโปรตีนสูงและทนต่อไซยาไนด์ได้ดี เชื้อราสายพันธุ์ที่จะใช้ในการเพิ่มโปรตีนมันสำปะหลังหมักแบบใช้อากาศคือ Cephalosporium eichhorniae ซึ่งมีคุณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการคือ เป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่เจริญบนแป้งมันสำปะหลังได้ดี สร้างโปรตีนในเซลได้สูง เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40^0-60^0ซ. และพีเอชของอาหารประมาณ 3.5-3.8 ไม่ทำให้เกิดโรคและไม่สร้างสารพิษ (Gregory, 1977) ได้มีรายงานการทดลองการผลิตโปรตีนจากราสายพันธุ์นี้ โดยใช้การหมักแบบอาหารเหลว ซึ่งได้กล่าวแล้วในบทนำ ในการทดลองนี้จะเป็นการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์นี้บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยมันสำปะหลังเพื่อเพิ่มโปรตีน

5.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเพิ่มโปรตีน คือ Cephalosporium eichhorniae สายพันธุ์ 152 (ATCC 38255) จาก Dr.K.F.Gregory ภาควิชาจุลชีววิทยา University of Guelph, Ontario, Canada การเลี้ยงและการเก็บเชื้อทำโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อขูดบนโคโลนีของเชื้อรา แล้วนำมาปลูกในหลอดที่มีอาหารวุ้นเอียง พีดีเอ (potato dextrose agar) บ่มที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 4-6 วัน เมื่อราเจริญเต็มหลอดแล้วนำไปใช้เป็นเชื้อตั้งต้นต่อไป หรือเก็บไว้ในอุณหภูมิ -70^0ซ.

5.2 การทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการของเชื้อรา C.eichhorniae

5.2.1 ความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังดิบเป็นแหล่งคาร์บอน ทำโดยเลี้ยงเชื้อ C.eichhorniae ในอาหารที่มีสูตรดังนี้ ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 10 กรัม, ผงสกัดยีสต์ 5 กรัม, ผงสกัดมอลต์ 3 กรัม, ไดโปแตสเซียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม, วุ้น 20 กรัม แป้งที่ใช้แยกมาอบแป้งที่ 130^0ซ. 30 นาที

นำไปละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแล้วจึงนำไปผสมกับอาหารตามส่วนผสมที่เหลือที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121^0ซ. 15 นาที แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 50^0ซ. เทลงในจานเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว แป้งที่มีอยู่ในอาหารจะยังคงเป็นแป้งดิบ จุด (spot) สารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension)ของ C.eichhorniae บนอาหาร 4 จุด บ่มที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 4 วัน ตรวจดูขนาดของโคโลนี และขนาดของบริเวณใส่ (clear zone) ที่แป้งถูกย่อย แล้วราดด้วยสารละลายไอโอดีน เพื่อวัดขนาดบริเวณใส่

5.2.2 ความทนทาน (tolerance) ต่อไซยาไนด์ เพื่อทดสอบความสามารถในการเจริญของ C.eichhorniae ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารครบและมีไซยาไนด์อยู่ในปริมาณต่าง ๆ ทำการทดลองโดย เตรียมอาหารพีดีเอที่ไม่ใส่วุ้น และมีโปแตสเซียมไซยาไนด์ในปริมาณ 0, 10, 20, 50, 100 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ใส่เชื้อ C.eichhorniae จำนวน 10^5 สปอร์ต่อ มล. แล้วบ่มที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 48 ช.ม. สังเกตการเจริญของเชื้อราในหลอด

6. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ C.eichhorniae บนอาหารแข็งมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

6.1 การศึกษาการเจริญและการสร้างโปรตีนของ C.eichhorniae บนอาหารแข็งที่มีส่วนประกอบต่าง ๆ กันคือ มันสำปะหลังสด, มันเส้น และกากมันสำปะหลัง เพื่อหาวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีนของเชื้อ โดยมีวิธีทดลองดังนี้

อาหารแข็งที่ประกอบด้วยมันสำปะหลังสด นำมันสำปะหลังสดล้างให้สะอาด หั่นทั้งเปลือกเป็นชิ้นขนาด 1.5x1.5x1.5 ซม. แช่น้ำกลั่นปราศจากเชื้อพีเอช 3.5 เป็นเวลา 10 นาที ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ใส่ลงในขวดรูปกรวยที่ปราศจากเชื้อขนาด 500 มล. ขวดละประมาณ 20 กรัม เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5% และเกลือแร่ตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในข้อ 2.5 ใส่เชื้อ C.eichhorniae ที่มีจำนวน 10^7 สปอร์ต่อ มล. บ่มที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 4 วัน

อาหารแข็งที่ประกอบด้วยมันเส้น ใช้มันเส้นขนาด 1x1x1 ซม. ที่ตากแห้งมาเป็นเวลา 1 เดือน และ 1 ปี ผสมมันเส้น : รำข้าว : แกลบในอัตราส่วน 12 : 2 : 1

ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มล. ให้มีอาหารผสม 10 กรัม ใส่แอมโมเนียมซัลเฟต และเกลือแร่ในอัตราส่วนเช่นเดียวกับในข้อ 15.5 เติมน้ำกลั่นที่ปรับพีเอชให้เป็นกรดโดยใช้กรดกำมะถัน 6 นอร์มอล ทำให้ปริมาณอาหาร : น้ำ เป็น 1:0.7, 1:0.9, 1:1.1, 1:1.3, 1:1.5 และ 1:1.7 โดยน้ำหนัก พีเอชของอาหารเท่ากับ 4.0 นึ่งที่ 100^0ซ. เป็นเวลา 1 ช.ม. ใส่เชื้อที่มีจำนวน 10^7 สปอร์ต่อ มล. คลุกเคล้าให้ทั่ว บ่มที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 4 วัน

อาหารแข็งที่ประกอบด้วยกากมันสำปะหลัง เลี้ยงเชื้อ C.eichhorniae ในอาหารแข็งที่มีสูตรตามข้อ 15.5 โดยให้ปริมาณอาหาร : น้ำ เป็น 1:1.5 และปรับพีเอชของอาหารเป็น 4.0 ด้วยกรดกำมะถัน 6 นอร์มอล นึ่งที่ 100^0ซ. 1 ช.ม. ใส่เชื้อที่มีจำนวน 10^7 สปอร์ต่อ มล. นำไปบ่มที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 4 วัน

การทดลองในอาหารทั้ง 3 ชนิด เก็บตัวอย่าง แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณลอรี่โปรตีน (Lowry Protein) และวิเคราะห์การเจริญโดยใช้การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

6.2 ความชื้นตั้งต้นในอาหารกากมันสำปะหลัง เลี้ยงเชื้อ C.eichhorniae บนอาหารแข็งที่มีสูตรในข้อ 2.5 โดยแปรผันปริมาณอาหาร : น้ำ เป็น 1:1.3, 1:1.5, 1:1.7, 1:1.9 และ 1:2.1 ปรับพีเอชเป็น 4.0 โดยใช้กรดกำมะถัน 6 นอร์มอล ใส่เชื้อที่มีจำนวน 10^7 สปอร์ต่อ มล. แล้วบ่มเชื้อไว้ที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และลอรี่โปรตีน

6.3 ระยะเวลาการนึ่งอาหาร เตรียมอาหารแข็งที่มีสูตรในข้อ 15.5 ปรับปริมาณอาหาร : น้ำ เป็น 1:1.9 ปรับพีเอชเป็น 4.0 นำไปนึ่งที่ 100^0ซ. เป็นเวลา 15, 30, 60 และ 90 นาที ใส่เชื้อ C.eichhorniae ที่มีจำนวน 10^7 สปอร์ต่อ มล. บ่มที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าไนโตรเจนทั้งหมด และลอรี่โปรตีน

6.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีน เลี้ยงเชื้อ C.eichhorniae บนอาหารแข็งที่มีสูตรปรากฏในข้อ 15.5 ปรับอาหาร : น้ำ เป็น 1:1.9 ปรับพีเอชเป็น 4.0

นึ่งเป็นเวลา 15 นาที ใส่เชื้อที่มีจำนวน 10^7 สปอร์ต่อ มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 45, 50, และ 55^0ซ. เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและลอรี่โปรตีน

6.5 พีเอชตั้งต้นของอาหารที่เหมาะสม เตรียมอาหารแข็งที่มีสูตรในข้อ 15.5 ปรับปริมาณอาหาร : น้ำ เป็น 1:1.9 และปรับพีเอชของอาหารเป็น 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ด้วยกรดกำมะถัน 6 นอร์มอล นึ่งที่ 100^0ซ. 15 นาที ใส่เชื้อ C.eichhorniae ที่มีจำนวน 10^7 สปอร์ต่อ มล. บ่มที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและลอรี่โปรตีน

6.6 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีน เตรียมอาหารแข็งที่มีสูตรอาหารในข้อ 15.5 แล้วแปรผันแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน เป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งดังในข้อ 6.6.1-6.6.4 ปรับปริมาณอาหาร : น้ำ เป็น 1:1.9 พีเอชของอาหารเท่ากับ 3.5 ใส่เชื้อ C.eichhorniae ที่มีจำนวน 10^7 สปอร์ต่อ มล. บ่มเชื้อที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 4 วัน แล้วเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและลอรี่โปรตีน

6.6.1 ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% (ฟาร์อีสท์ปุ๋ยเคมีจำกัด)

6.6.2 ปุ๋ยโปแตสเซียมไนเตรต 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% (ฟาร์อีสท์ปุ๋ยเคมีจำกัด)

6.6.3 ปุ๋ยยูเรีย 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% (ฟาร์อีสท์ปุ๋ยเคมีจำกัด)

6.6.4 รำข้าว 0, 5, 10, 15 และ 20%

6.7 ชนิดและปริมาณเกลือแร่ที่ส่งเสริมการสร้างโปรตีน เตรียมอาหารแข็งพื้นฐานที่มีส่วนประกอบดังนี้ ในขวดรูปกรวย 250 มล. มีกากมัน 10 กรัม และปุ๋ยแอมโมเนียม-ซัลเฟต 1.5% โดยน้ำหนักแห้ง แล้วผสมเกลือแร่ต่าง ๆ กันเป็นเปอร์เซ็นต์ของเกลือแร่ต่อน้ำหนักแห้งของอาหารพื้นฐาน ตามอัตราส่วนในข้อ 6.7.1-6.7.12 ตามลำดับ แล้วปรับปริมาณอาหาร : น้ำ และพีเอชของอาหารเป็น 1:1.9 และ 3.5 ใส่เชื้อ C.eichhorniae

ที่มีจำนวน 10^7 สปอร์ต่อ มล. บ่มเชื้อที่ 45^0 ซ. เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าไนโตรเจนทั้งหมด และลอรี่โปรตีน

6.7.1 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%

6.7.2 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09%

6.7.3 เหล็กซัลเฟต ($FeSO_4$) 0, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01%

6.7.4 โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0, 0.002, 0.004, 0.006%

6.7.5 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.15%

6.7.6 โซเดียมโมลิบเดต (Na_2MoO_4) 0, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.015%

6.7.7 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) 0, 0.001, 0.002, 0.004, 0.006%

6.7.8 คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 0, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1%

จากผลการทดลองในข้อ 6.7.1 - 6.7.8 ได้เลือกสภาวะในการเติมเกลือแร่ที่ส่งเสริมการสร้างโปรตีนเติมในอาหารพื้นฐานร่วมกันดังนี้

6.7.9 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0%, เหล็กซัลเฟต 0.006%, แคลเซียมคลอไรด์ 0.01%, โซเดียมโมลิบเดต 0.005%, แมงกานีสซัลเฟต 0.002%

.7.10 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0%, เหล็กซัลเฟต 0.006%, แคลเซียมคลอไรด์ 0.01%, แมกนีเซียมซัลเฟต 0.01%, โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.006%

6.7.11 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0%, เหล็กซัลเฟต 0.004%, แมกนีเซียมซัลเฟต 0.01%, โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.006%

6.7.12 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5%, เหล็กซัลเฟต 0.004%, แมกนีเซียมซัลเฟต 0.01%, โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.006%

7. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณโปรตีน

ตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์นั้นนำไปอบให้แห้งที่ 80^0ซ. เป็นเวลา 2 วัน นำมาบดให้ละเอียดในเครื่องปั่นความเร็วสูง เป็นเวลา 30 วินาที

7.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดตามวิธีของ Lang (1958)

ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.05 กรัม ใส่ในหลอดทดลองสำหรับย่อยสลาย เติมน้ำยาย่อยสลาย (digestive reagent) 1 มล. และกรดกำมะถันเข้มข้น 2 มล. ปักในกระบะทรายลึก 5 ซม. ให้ความร้อน 310^0-320^0ซ. ย่อยจนกว่าจะได้สารละลายใส การย่อยนี้ต้องทำในตู้ควัน

น้ำยาย่อยสลาย (digestive reagent) ทำตามวิธีของ Arnold (1971) โดยละลายโปแตสเซียมซัลเฟต 134 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย 650 มล. แล้วผสมกับกรดกำมะถันเข้มข้น 200 มล. คนให้เข้ากัน นำไปผสมกับสารละลายปรอทแดง 2 กรัม ใน 25 มล. กรดกำมะถัน 6 นอร์มอล สารละลายทั้งหมดเจือจางเป็น 1,000 มล.

เนสเซอไรเซชั่น (Nesslerization) นำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการย่อยจากข้างต้นมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น วัดปริมาตรที่แน่นอน ปิเปตสารละลายนี้ 3 มล. ผสมกับน้ำกลั่น 1 มล. เติมสารละลายเนสเลอร์ 1 มล. (nessler reagent) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร โดยมี

น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบอ่านค่าไนโตรเจนเทียบกับกราฟมาตราฐานของแอมโมเนียมซัลเฟต 10 - 40 ไมโครกรัม คำนวณค่าไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่าง เป็นเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนต่อตัวอย่าง 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

เตรียมสารละลายเนสเลอร์ตามวิธีของ Colowick (1957) โดยละลายไอโอดีน 22 กรัม ใน 30 กรัมของโปแตสเซียมไอโอไดด์ที่ละลายอยู่ในน้ำ 20 มล. คนให้เข้ากันดูดเก็บไว้ประมาณ 1 มล. นำสารละลายที่เหลือผสมกับปรอทบริสุทธิ์ 30 กรัม เขย่าให้เข้ากันแรง ๆ ขณะเขย่าต้องทำให้สารละลายเย็นตลอดเวลาโดยนำไปเขย่าในอ่างน้ำเย็น จนกระทั่งไม่มีสีของไอโอดีนให้เห็น ลองหยดสารละลายนี้ 1 หยด ในสารละลายน้ำแห้ง 1% ถ้าเกิดสีน้ำเงินแสดงว่าใช้ได้แต่ถ้าไม่เกิดสีน้ำเงิน ให้นำสารละลายไอโอดีนในโปแตสเซียม-ไอโอไดด์ ที่ดูดเก็บไว้ 1 มล. นั้น หยดลงไปทีละหยดจนกว่าจะให้ปฏิกริยากับน้ำแป้ง แล้วเติมน้ำกลั่น 200 มล. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทน้ำใสส่วนบนออก แล้วนำสารละลายใสส่วนบนนี้ผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) 975 มล. เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง (30^0ซ.) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

หมายเหตุ

1. วิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในที่นี้ ไม่ได้หักค่าที่เกิดจากการรบกวนของอิออนของ Mg, Fe, Ca, S, Mn, Cl และ small-molecular-weight organic compounds ออก (Franson, M.A, 1981)

2. Conversion factor เป็นค่ารบกวนที่เกิดจากกากมันมีวิธีคิดดังนี้ เปอร์เซ็นต์-ไนโตรเจนทั้งหมดในกากมันที่หาด้วยวิธีการย่อย, กลั่น และไตเตรตมีค่าเท่ากับ 0.22% เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเนสเลอร์มีค่าเท่ากับ 0.32% เพราะฉะนั้นค่ารบกวนที่เกิดจากกากมันมีค่าเท่ากับ 0.10% ซึ่งจะนำไปหักออกจากค่าไนโตรเจนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ตามวิธีเนสเลอร์

3. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจะเป็นผลรวมของ ก. ไนโตรเจนที่มีอยู่ในเนื้อมัน ข. ไนโตรเจนที่เติมในอาหาร ค. ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์อื่นที่ไม่ใช่ลอรี่โปรตีน

7.2 การวิเคราะห์ปริมาณลอรี่โปรตีนตามวิธี Lowry (1951)

เป็นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยอาศัยการทำปฏิกริยาระหว่างรีเอเจนต์กับไทโรซีนและทริปโตเฟนในตัวอย่าง วัดปริมาณสารที่มีสีที่ได้โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนอัลบูมินที่ได้จากซีรัมของวัวเป็นมาตราฐาน โดยถือว่าปริมาณไทโรซีนและทริปโตเฟนในโปรตีนทั่วไปจะมีอัตราส่วนใกล้เคียงกัน

เตรียมสารละลายลอรี่ (Lowry, 1951) ดังนี้ สารละลาย ก. โซเดียม-คาร์บอเนต 2 กรัม ละลายใน 0.1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 มล. สารละลาย ข. คอปเปอร์ซัลเฟต 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. สารละลาย ค. โซเดียมโปแตสเซียม-ตาร์เตรต 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ผสม 1 มล. ของสารละลาย ข. กับ 1 มล. ของสารละลาย ค. คนให้เข้ากันแล้วจึงผสมกับ 100 มล. ของสารละลาย ก. คนให้เข้ากันได้เป็นสารละลายลอรี่ นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การวิเคราะห์โปรตีน ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติม 0.1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 มล. นำไปเผาที่ 40^0ซ. นาน 1 ช.ม. เพื่อให้ผนังเซลแตก (ยุพา, 2521) นำส่วนที่เป็นน้ำใสมาหาปริมาณโปรตีน โดยใช้ตัวอย่าง 0.5 มล. ผสมกับสารละลายลอรี่ 3 มล. เผาให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมฟีนอลรีเอเจนต์ (ฟีนอลรีเอเจนต์ 1 ส่วน ผสมกับน้ำกลั่น 1 ส่วน) เผาให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร อ่านค่าโปรตีนเทียบจากกราฟมาตราฐานอัลบูมิน (20-200 ไมโครกรัม) คำนวนเป็นเปอร์เซนต์ลอรี่โปรตีนต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

8. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างโปรตีนของเชื้อรา C.eichhorniae

เลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งในขวดรูปกรวยขนาด 250 มล. ประกอบด้วย กากมัน 10 กรัม ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5%, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5%, เหล็กซัลเฟต 0.004%, โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.006% และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.01% โดยน้ำหนักแห้งปรับความชื้นตั้งต้นของอาหารเป็น 190% พีเอชตั้งต้น 3.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 100^0ซ. 15 นาที ใส่เชื้อที่มีจำนวน 10^7 สปอร์ต่อมล. บ่มเชื้อที่ 45^0ซ. เก็บตัวอย่างทุกวันในเวลา

7 วัน อบแห้งที่ 80^0 ซ. เป็นเวลา 2 วัน นำมาวิเคราะห์การเจริญและการสร้างลอรี่โปรตีน และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร

9. การตรวจวัดความเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็ง

การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารแข็ง ทำโดยอาศัยการวัดปริมาณกลูโคซามีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลของรา เป็นดัชนีของอัตราการเจริญเติบโตตามวิธีการของ Cochran และ Vercellotti (1978)

9.1 การสกัดกลูโคซามีนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ นำตัวอย่างแห้ง 0.2 กรัม ไปย่อยเพื่อสกัดกลูโคซามีนด้วยกรดเกลือเข้มข้น 5 มล. เมื่อบ่มในน้ำเดือดครบ 2 ช.ม. ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นทิ้งตะกอนที่ 10,000 g. นาน 15 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปปรับค่าพีเอช ให้เป็นกลาง (พีเอช 7) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 30% นำไปปั่นทิ้งตะกอนอีกครั้งที่ 10,000 g. นาน 15 นาที นำส่วนน้ำใสมาปรับปริมาตรให้ได้ครบ 10 มล. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน

9.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน ทำตามวิธีของ Morgan - Elson ที่ปรับปรุงแล้ว (Johnson, 1971) โดยดูดสารละลาย 1 มล. จากตัวอย่างที่ได้ในข้อ 9.1 ทำปฏิกริยากับสารละลายอะเซทิลอะซีโตนปริมาตร 1 มล. (ประกอบด้วยอะเซทิลอะซีโตน เข้มข้น 4% ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้น 1.25 โมลาร์) ต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที เมื่อทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว เติมเอทานอล 10 มล. และเออร์ลิกรีเอเจนต์ 1 มล. (Erhilich's reagent, ประกอบด้วยพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.67% ในสารละลายกรดเกลือเข้มข้นและเอทานอลอัตราส่วน 1:1) ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร แล้วนำผลที่ได้มาคิดค่าโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (25-200 ไมโครกรัม)

การเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารแข็งคิดเป็นมิลลิกรัมของกลูโคซามีนต่อน้ำหนักแห้งของอาหารแข็ง

10. การใช้แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นสูงเพื่อศึกษาผลต่อการสร้างโปรตีน

จากการทดลองของ Smith และคณะ (1986) ซึ่งพบว่าการเลี้ยงเชื้อราที่มีความทนต่อแรงดันออสโมติกสูง (osmotolerant) ในอาหารที่มีเกลือไนโตรเจนความเข้มข้นสูง ทำให้เชื้อสามารถสร้างโปรตีนได้สูง การทดลองนี้จะเป็นการศึกษาผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่มากกว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ศึกษาในข้อ 6.6 ต่อการสร้างโปรตีนของเชื้อรา C.eichhorniae ทำได้โดย เตรียมอาหารแข็งที่มีส่วนประกอบดังนี้ ชุดที่ 1 ในขวดรูปกรวย 250 มล. ประกอบด้วย กากมัน 10 กรัม, ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต 8.33%, ปุ๋ยยูเรีย 2.03%, และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.27% และชุดที่ 2 ในขวดรูปกรวย 250 มล. ประกอบด้วย กากมัน 10 กรัม, ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต 4.165% ปุ๋ยยูเรีย 1.015% และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.135% ปรับความชื้นตั้งต้นของอาหารทั้งสองชุดเป็น 190% และปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 3.5 นึ่งที่ 100^0ซ. นาน 15 นาที ใส่เชื้อ C.eichhorniae ที่มีจำนวน 10^7 สปอร์ต่อ มล. แล้วบ่มเชื้อที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และลอรี่โปรตีน

11. การขยายขนาดการหมักให้มีปริมาณมากขึ้น (Scale up)

ทำการขยายขนาดจากการหมักอาหาร 10 กรัม เป็นการหมักอาหารปริมาณ 500-1,000 กรัม โดยใช้กากมันที่มีเชื้อรา C.eichhorniae เจริญเต็มที่แล้วเป็นหัวเชื้อ (starter) นำมาหมักกับมันเส้น ศึกษาอัตราส่วนของหัวเชื้อต่อมันเส้นที่เหมาะสมและปริมาณของอาหารทั้งหมดต่อภาชนะที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีน

11.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเตรียมอาหารมันเส้น

11.1.1 การเตรียมหัวเชื้อกากมัน เลี้ยงเชื้อรา C.eichhorniae บนอาหารแข็งในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 4.0x60 ซ.ม. ประกอบด้วย กากมัน 500 กรัม, ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5%, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5%, เหล็กซัลเฟต 0.004%, โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.006% และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.01% ปรับความชื้นตั้งต้นเป็น 190% พีเอชเป็น 3.5 นึ่งที่ 100^0ซ. 30 นาที ใส่เชื้อที่มีจำนวน 10^7 สปอร์ต่อ มล. 10 มล. บ่มที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 3 วัน

11.1.2 การเตรียมและหมักอาหารมันเส้น ใช้มันเส้นขนาด 1x1x1 ซ.ม. ซึ่งให้ได้น้ำหนัก 500-1,000 กรัม แช่ในน้ำพีเอช 2 (ปรับพีเอชด้วย 6 นอร์มอล กรดกำมะถัน) เป็นเวลา 1 ซ.ม. เทน้ำออกและนำมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ใส่ในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 40 60 ซ.ม. เติมปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตและเกลือแร่ในอัตราส่วนเช่นเดียวกับในข้อ 11.1.1 นึ่งที่ 100^0ซ. 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น (40^0ซ.) นำหัวเชื้อกากมันที่เตรียมไว้ในข้อ 11.1.1 มาผสมคลุกเคล้าให้ทั่วในอัตราส่วน 1:9-5:5 บ่มที่ 45^0ซ. เป็นเวลา 4 วัน

การทดลองแต่ละชุดทำ 2 ถุง เก็บตัวอย่างถุงละ 5 ตัวอย่าง นำมารวมกันอบแห้งที่ 80^0ซ. เป็นเวลา 2 วัน ปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นความเร็วสูง 30 วินาที นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและลอรี่โปรตีน

11.2 การแปรผันอัตราส่วนของหัวเชื้อกากมันต่อมันเส้น เพื่อศึกษาถึงอัตราส่วนที่เหมาะสมในการใส่หัวเชื้อลงในอาหารแข็งมันเส้น โดยทำการทดลองเตรียมหัวเชื้อและอาหารมันเส้นตามวิธีในข้อ 11.1 โดยให้อัตราส่วนระหว่างหัวเชื้อกากมันต่ออาหารมันเส้นเป็น 1:9, 2:8, 3:7, 4:6 และ 5:5 โดยน้ำหนักแห้ง ใส่มันเส้นที่ผสมหัวเชื้อแล้วถุงละ 500 กรัม

11.3 การแปรผันปริมาณมันเส้นต่อถุง

เนื่องจากเชื้อรา C.eichhorniae เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ ดังนั้นในการทดลองนี้ ต้องการที่จะดูผลของความหนาของอาหารต่อพื้นที่ที่สัมผัสอากาศของอาหาร

โดยใช้อัตราส่วนระหว่างหัวเชื้อต่อมันเส้นเป็น 4:6 แปรผันปริมาณอาหารต่อถุงขนาด 40x60 ซ.ม. เป็น 500, 700 และ 1,000 กรัม น้ำหนักแห้ง เมื่อวางถุงในแนวตั้ง (รูปที่ 9) ซึ่งมีความหนาของอาหารหมักเป็น 7.5, 10.5 และ 15 ซ.ม. และพื้นที่หน้าตัดเป็น 314.16 ตารางเซนติเมตร

11.4 การเลี้ยงเชื้อ C.eichhorniae ในอาหารแข็งขยายขนาดที่ใส่แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นสูง ทำได้โดยเตรียมหัวเชื้อและมันเส้นในวิธีเดียวกับข้อ 11.1

17078945

แต่เปลี่ยนปริมาณปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 4.165% ใส่ปุ๋ยยูเรีย 1.015% และโปแตสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.135% โดยให้อัตราส่วนหัวเชื้อต่อมันเส้นเป็น 4:6 น้ำหนักแห้งของอาหารต่อถุงเท่ากับ 500 กรัม

12. การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในอาหารหมักที่ได้

ได้ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยใช้เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน Hitachi Amino Acid Analyzer model 835-50

13. อาหารเลี้ยงเชื้อ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

13.1 อาหารวุ้นพีดีเอ (potato dextrose agar) สำหรับใช้เก็บและเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ C.eichhorniae ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม กลูโคส 20 กรัม วุ้น 20 กรัม ในอาหาร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121^0ซ. 15 นาที

13.2 อาหารวุ้นเอ็น เอ (nutrient agar) สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วย ผงสกัดจากเนื้อวัว 3 กรัม, เปปโตน 5 กรัม, วุ้น 20 กรัม ใน 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121^0ซ. 15 นาที

13.3 อาหารวุ้นวาย เอ็ม (Y M agar) สำหรับแยกเชื้อยีสต์ ประกอบด้วย ผงสกัดยีสต์ 3 กรัม, ผงสกัดมอลต์ 4 กรัม, เปปโตน 5 กรัม, กลูโคส 10 กรัม, วุ้น 20 กรัม ใน 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121^0ซ. 15 นาที

13.4 อาหารวุ้นน้ำมะพร้าว สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ประกอบด้วย น้ำมะพร้าว 100 มล., ผงสกัดยีสต์ 0.5%, โซเดียมอะซายด์ 0.02%, บรอมครีซอลเพอรเพิล 0.004% ใน 1 ลิตร พีเอช 7 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121^0ซ. 15 นาที

13.5 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งกากมันสำปะหลัง (solid cultural medium) ทำในขวดรูปกรวยขนาด 250 มล. ประกอบด้วย กากมันแห้ง 10 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5% เหล็กซัลเฟต 0.002% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05% โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.002% และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2% โดยน้ำหนักแห้ง นึ่งด้วยไอน้ำที่ 100^0ซ.

เป็นเวลา 1 ช.ม.

เครื่องปั่น (Centrifuge) Kubota KS-3,000 P Kamiya Tsusan Kaisha Ltd., Tokyo Japan

เครื่องเขย่า Controlled environment incubator shaker) ของ New Brunswick Scientific Co, Inc, New Jersy, U.S.A.

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น ๒ 70 ของ Beckman, U.S.A.

14. อุปกรณ์ ที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย

ตู้บ่มเชื้อ (Heraeus รุ่น B 5100 E) ของ Heraeus, Germany

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของ Bausch and Comb. Rochester, U.S.A.

เครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) Sorvall RC-5 B ของ Dupont

15. เคมีภัณฑ์

15.1 เคมีภัณฑ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

กลูโคส (Glucose) ของ Riedel-de Haen AB Seelze-Hannover

ผงสกัดจากวัว (Beef extract) ของ Gibco U.S.A

เปปโตน (Bacto - peptone) ของ Difco Laboratories U.S.A

ผงสกัดยีสต์ (Yeast extract) ของ Difco Laboratories U.S.A.

ผงสกัดมอลต์ (Malt extract) ของ Difco Laboratories U.S.A.

โซเดียมอะซายด์ (Sodium azide) ของ BDH Biochemicals Ltd., Poole England

บรอมครีซอล เพอร์เพิล (Bromcresol purple) ของ BDH Biochemicals Ltd., Poole England

ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต (21 - - 0) ของ ฟาร์อีสท์ปุ๋ยเคมี และอินทรีย์ จำกัด

ปุ๋ยโปแตสเซียมไนเตรต (13 - 0 - 46) ของฟาร์อีสท์ปุ๋ยเคมี และอินทรีย์ จำกัด

ปุ๋ยยูเรีย (46 - 0 - 0) ของฟาร์อีสท์ปุ๋ยเคมีและอินทรีย์ จำกัด

15.2 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์

ไพริดีน (pyridine) ของ E.Merck Darnstadt, Germany

บิสไพราโซโลน (Bispyrazolone) ของ BDH Biochemicals Ltd., Poole England

3 - เมทธิล - 1 - ฟีนิล - 5 - ไพราโซโลน (3 - methyl - 1 - phenyl - 5 pyrazolone) ของ BDH Biochemicals Ltd., Poole England

ลินามาริน (linamarin) ของ Calbiochem Hoechat

คลอรามินที (Chloramin T) ของ BDH Biochemicals Ltd., Poole England

15.3 <u>เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน</u>

ปรอทแดง (red mercuric oside) ของ บ.เคมีกิจประเทศไทย

กรดกำมะถันเข้มข้น (Hydrosulfuric acid ของ BDH Biochemicals Ltd., Poole England

ไอโอดีน (Iodine) ของ M & B Ltd. Dagenham, England

โปแตสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide) ของ Carlo Erba Italy

ปรอท (Mercury) ของ บ.เคมีกิจประเทศไทย

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของ E.Merck Darnstadt, Germany

ฟีนอล (Folin - Ciocalteus phenol reagent) ของ E.Merck, Darnstadt, Germany

คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate 5 - hydrate) ของ E.Merck, Germany

โซเดียมโพแตสเซียมตาร์เตรท (sodium potassium tartrate) ของ Fluka AG. Buchs, Switzerland

อัลบูมิน (fraction V, 96 - 99% albumin, bovine) ของ Sigma, U.S.A.

15.4 <u>เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์กลูโคซามีน</u>

กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (glucosamine hydrochloride) ของ Sigma, U.S.A.

อะเซทิลอะซิโตน (acetyl acetone) ของ Fluka AG. Buchs, Switzerland

ไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (4 - dimethyamino - benzaldehyde) ของ Fluka AG. Buchs, Switzerland

เอทานอล (absolute ethanol) ของ E.Merck, Darmstadt, Germany