บทที่ 3
อุปกรณ์วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น WP-Winpact ของบริษัท กิบไทย จำกัด
- เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss, Germany
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา (Biocular compound microscope) รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) M-LAB ของบริษัท เมโทรโลยี เทคนิคคอล, Thailand
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (High - performance centrifuge) รุ่น Avanti® J-30I ของบริษัท Beckman Coulter, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 3700 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 6500 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyela, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, Switzerland
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น eppendorf concentrator 5301 ของบริษัท Modotech, Germany
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
- ตู้อบความร้อน (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland

222725008

- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, USA
- เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries Inc., USA
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
- เครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว Rapid Visco Analyser (RVA, series 4D, Newport Scientific, Warriewood, Australia)

2. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัทBio Springer, France
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Labscan, Ireland
- แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- กลูโคส ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- แบคโตอะการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- น้ำมันถั่วเหลือง ของบริษัท น้ำมันไทย จำกัด, Thailand
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท Carlo Erba, Italy
- โซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- ทริสเบส (Tris base; Tris [hydroxymethl] aminomethane) ($NH_2C(CH_2OH)_3$) ของบริษัท Fisher Scientific UK, UK
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris HCl) ของบริษัท Sigma, USA
- เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- เฮกเซน (Hexane) (C_6H_{14}) ของบริษัท Mallinckrodt Baker, USA
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- กรดซัลฟูริก (sulfuric acid) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- เอทิล แอซีเทต (Ethyl acetate) ของบริษัท Fisher Scientific UK, UK

2227725008

- ไอโอดีนชนิดเกล็ด ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- กระดาษกรอง (Nylon membrane) ขนาด 47 มม. 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- กระดาษกรอง หมายเลข 2 ขนาด 125 มม.ของบริษัท Whatman, USA
- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20 x 20 ซม.,หนา 0.2 มม. (TLC silica gel 60, 0.2 mm.) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- น้ำมันสังเคราะห์ (Synthetic oil) ของบริษัท Tokyo kasei, Japan

3. วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* MUE24 ในระดับขวดเขย่า

3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำยีสต์ *Pichia anomala* MUE24 ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Yeast Malt Extract บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมา 1 ลูป เพาะลงในอาหารเหลว Yeast Malt Extract ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.1.2 การติดตามการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตร

นำหัวเชื้อที่ครบอายุ 18 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.9-1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร 50 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.02 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดยีสต์ 0.64 เปอร์เซ็นต์ $NaNO_3$ 0.11 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันถั่วเหลือง 13.34 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 6.66 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเมื่อเวลา 1 3 5 และ 7 วัน เพื่อติดตามการเจริญโดยการหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ และทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยการวัดค่าการกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิว

3.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* MUE24 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยกระบวนการหมักแบบแบช

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับในระดับขวดเขย่า ตามข้อ 3.1.1

3.2.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยควบคุม pH เท่ากับ 4.5 ตลอดการทดลอง

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้มาเพาะเลี้ยงยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.02 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดยีสต์ 0.64

เปอร์เซ็นต์ $NaNO_3$ 0.11 เปอร์เซ็นต์น้ำมันถั่วเหลือง 13.34 เปอร์เซ็นต์และกลูโคส 6.66 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมการเพาะเลี้ยงที่ pH 4.5 ตลอดการทดลอง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราเร็วรอบกวนในถังเป็น 400 รอบต่อนาที และควบคุมอัตราการให้อากาศ 1vvm เป็นเวลา 7 วันติดตามการเจริญของยีสต์โดยการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวาภาพโดยการวัดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าการกระจายน้ำมัน และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 -7 วัน และทำการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วยเอทิลแอซีเทต เพื่อหาน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยไม่ควบคุม pH

ทำการผลิตเช่นเดียวกับการผลิตโดยควบคุม pH เท่ากับ 4.5 ตลอดการทดลอง แต่ไม่มีการควบคุม pH เพาะเลี้ยงยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราเร็วรอบกวนในถังเป็น 400 รอบต่อนาที และควบคุมอัตราการให้อากาศ 1vvm เป็นเวลา 7 วันติดตามการเจริญของยีสต์โดยการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวาภาพโดยการวัดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าการกระจายน้ำมัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 -7 วัน และทำการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วยเอทิลแอซีเทต เพื่อหาน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยไม่ควบคุม pH เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าการผลิตโดยไม่มีการควบคุม pH ให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีกว่าการผลิตโดยควมคุม pH และให้ผลการทดลองดีที่สุดที่ 3 วัน หรือ 72 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงทำการเพาะเลี้ยงยีสต์เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และการเปลี่ยนแปลงภายในถังหมักที่ทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนของเหลวที่ได้แยกเก็บไว้ ส่วนเซลล์นำมาล้างด้วย เฮกเซน2 รอบ และน้ำกลั่น 1 รอบ จากนั้นอบเซลล์ในถ้วยฟอยล์ที่รู้น้ำหนักแน่นอนแล้วที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ เมื่อครบเวลานำถ้วยฟอยล์มาใส่ในโถดูด ความชื้น แล้วชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียด และคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นกรัมต่อลิตร

3.4 การวัดค่าความเป็นกรดด่าง

นำส่วนของเหลวที่ได้มาวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่อง pH meter ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2222525008

3.5 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement test)

ทดสอบการกระจายน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ [23] โดยตวงน้ำ 45 มิลลิลิตรลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร ที่มีกระดาษกราฟรองอยู่เป็นมาตรวัดความกว้างของบริเวณใส (โดย 1 ช่องใหญ่ของกราฟมีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร) หยดน้ำมันดิบ (crude oil) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์มแผ่ทั่วผิวน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างที่เป็นส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนแผ่นฟิล์มของน้ำมันดิบทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสของการกระจายตัวของน้ำมันที่ได้และคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมัน (πr^2)

3.6 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

นำส่วนของของเหลวที่ไม่มีเซลล์มาวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nuoy Ring จาก เครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Tensiometer) รุ่น K6 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับน้ำบริสุทธิ์ที่มีค่าแรงตึงผิว เป็น 72 mN/m

3.7 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วย DNSA (Dinitrosalicylic Acid Reagent) ตามวิธีของ Miller [56] โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติม DNSA 1 มิลลิลิตรลงไปในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร

3.8 การหาปริมาณน้ำมันที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

หาปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ตามวิธีของ Kim และคณะ [4] โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้วมาสกัดด้วยเฮกเซนในปริมาตร 1 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำชั้นบนหรือชั้นของเฮกเซนไประเหยออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศเพื่อระเหยเฮกเซนออก ส่วนที่เหลืออยู่นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่

3.9 การย้อมเซลล์ด้วยสี nile red เพื่อศึกษาไขมันที่สะสมภายในเซลล์

การทดลองนี้ทำตามวิธีของ Morita และคณะ [57] โดยใช้สีย้อม Nile red ที่มีความเข้มข้น 500 µg/mL ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายแอซีโทนในการย้อมไขมันที่สะสมภายในเซลล์ โดยเริ่มจากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์อยู่มาปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 10,000 xg เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อทิ้งไป แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.8 เปอร์เซ็นต์ (NaCl) อย่างน้อย 3 ครั้ง และทำการละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ไว้ จากนั้นเติมสีย้อม Nile red ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 µg/mL จากนั้นบ่มไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์อีกอย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วนำไปส่องด้วยกล้องฟลูออเรสเซนส์ที่กำลังขยาย 40x

222725008

3.10 สกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

3.10.1 การสกัดสารลดแรงตึงผิวจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อ มาปั่นแยกเซลล์ออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำน้ำส่วนใสมาสกัดน้ำมันออกด้วยเฮกเซน ตามด้วยการสกัดสารลดแรงตึงผิวด้วยเอทิลแอซีเทตปริมาตร 1 เท่า 3 ครั้ง แล้วนำส่วนบนมาระเหยเอทิลแอซีเทต ออกด้วยเครื่อง evaporator ภายใต้สภาวะสุญญากาศ แล้วนำสารที่ได้มาหาน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นกรัมต่อลิตร

3.10.2 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ได้แยกเซลล์ออก

ทำการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามวิธีของ Ueda และคณะ [58] โดยการนำตัวอย่างที่เก็บแต่ละตัวอย่างมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ให้ตกตะกอน นำส่วนน้ำมาทำการสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บชั้นของส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดต่อด้วยเอทิลอะซิเตดปริมาตร 50 มิลลิลิตร 3 รอบ จากนั้นนำไประเหยที่สุญญากาศ แล้วชั่งน้ำหนักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นกรัมต่อลิตร

3.11 การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (Emulsion index)

เปรียบเทียบค่าดัชนีการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ร่วมกับน้ำมันชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันคาโนล่า น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับเติมน้ำมันแต่ละชนิดที่ต้องการศึกษา ในอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำมันเท่ากับ 60:40 (โดยน้ำหนัก) จากนั้นนำไป vortex เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเจือจาง 2 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 แล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรทันที เพื่อหาค่าการก่ออิมลัชัน และส่วนที่เหลือตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน เพื่อหาค่าความเสถียรของอิมัลชัน โดยดูดสารละลายส่วนล่างมาเจือจาง 2 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันหรือความเสถียรในการก่ออิมัลชันต่อไป [22]

3.12 การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (CMC : Critical micelle concentration)

ค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์หรือค่าจุดวิกฤตการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ สามารถทำได้โดยเจือจางสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 โดยเตรียมให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำแต่ละความเข้มข้นไปวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างของเหลวและ

222725008

อากาศเช่นเดียวกับการวัดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.3 และนำไปเขียนกราฟเพื่อหาค่า CMC คือความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้ต่ำที่สุด

3.13 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Analytical Thin-Layer Chromatograph

โดยใช้เฟสคงที่เป็นแผ่นซิลิกาเจล ($SiO_2 \cdot XH_2O$) 60 ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany ขนาด 20 x 20 ซม. หนา 0.2 มม. ส่วนเฟสเคลื่อนที่ใช้สารละลายคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 65:25:4 นำสารลดแรงตึงผิวที่เตรียมได้จากข้อ 2.2 มาละลายด้วยเอทิลแอซีเทต ให้มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาจุดบนแผ่น TLC ปริมาตรจุดละ 20 ไมโครลิตร ให้ห่างจากขอบล่าง ประมาณ 1.5 เซนติเมตร จากนั้นหย่อนแผ่น TLC ลงในแนวดิ่งอย่างช้าๆ ในภาชนะปิดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จนเฟสเคลื่อนที่ไปเกือบสุดแผ่นหรือเหลือขอบประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ออกมาทิ้งไว้จนแห้ง แล้วจึงตรวจหากรดไขมันด้วยการนำไปอบในภาชนะปิดสนิทที่อิ่มตัวไปด้วยไอของไอโอดีน ประมาณ 30 นาที เปิดภาชนะออกแล้วทำเครื่องหมายบริเวณที่เกิดสีน้ำตาลเข้ม และทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ไอโอดีนระเหยจนหมด

3.14 การทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วยสารละลายมอริช (molisch's test)

ทำการทดสอบคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นส่วนประกอบในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ด้วยสารละลายมอริช โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ละลายอยู่ใน 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมมอริชรีเอเจนต์ลงไป จากนั้นค่อยๆเอียงหลอดทดลองเพื่อค่อยๆเทกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป สารละลายในหลอดจะแยกออกเป็น 2 ชั้น โดยมอริชรีเอเจนต์ ซึ่งมีส่วนประกอบของสารกลุ่มฟีนอล คือ α-naphthol จะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วง หรือม่วงแดงปรากฏตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย

3.15 คำนวณค่าต่างๆทางจลนพลศาสตร์การหมัก

การคำนวณค่าต่างๆทางจลนพลศาสตร์ เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารในระดับขวดเขย่า ระดับถังหมักแบบควบคุม pH และไม่ควบคุม pH ดังต่อไปนี้

X = น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) P = น้ำหนักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ (g/l)

$Y_{P/S}$ = ผลผลิตที่ได้ต่อซับเสตรต (g-P/g-S) Q_P = Productivity (g-P/l/h)

Specific productivity = Q_P(mg-P/l/h)/ g-X

Specific growth rate = $\mu = \dfrac{\ln(X_2 - X_1)}{t_2 - t_1}, t_2 > t_1$

3.16 การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจำพวกแป้งข้าว

3.16.1 วิเคราะห์สมบัติต่างๆของแป้งข้าวชัยนาท

แป้งข้าวชัยนาทเป็นแป้งข้าวที่มีแอมิโลสสูงที่มีการใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร จึงเลือกนำแป้งข้าวชัยนาทมาใช้ในการทดลอง

1) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของฟลาวร์ (แป้งข้าวชัยนาท) ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน เถ้า ไขมัน เส้นใยหยาบ และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ AOAC official of analysis [59] โดยส่งวิเคราะห์ที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแป้ง มหาวิทยาลัยเกตรศาสตร์

2) ทดสอบสมบัติการเกิดเพสต์โดยใช้เครื่องมือ Rapid Visco Analyser (RVA) เพื่อทดสอบสมบัติด้านการคืนตัวของเพสต์ ตามวิธีของ Tattiyakul และคณะ [60] โดยใช้แป้ง 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง RVA โดยจะมีการควบคุมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.25 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 95 องศาเซลเซียส (อัตราเร็วของการเพิ่มอุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียสต่อนาที) และควบคุมที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 2.5 นาที จากนั้นเริ่มลดอุณหภูมิให้ต่ำลงจนถึง 50 องศาเซลเซียส แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของค่าความหนืดที่แสดงในกราฟ โดยทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ แล้ววิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ one way anova ด้วยโปรแกรม spss

3) ทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) ตามวิธีของ Toyokawa และคณะ [61] ทดสอบการพองตัว (swelling power) และการละลาย (solubility) ของแป้งข้าวที่อุณภูมิต่างๆ ตามวิธีของ Tattiyakul และคณะ [60] ดังต่อไปนี้

3.1) การทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ

ทำได้โดยนำแป้ง 5 กรัมใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นใส่น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าทุก 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 15 นาที ที่ความเร็วรอบ 1000 xg จากนั้นเทส่วนใส่ทิ้งไป แล้วตั้งหลอดเอียง 45 องศา เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักน้ำที่แป้งอุ้มไว้ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วคำนวณความสามารถในการอุ้มน้ำ ตามสูตร

$$\text{ความสามารถในการอุ้มน้ำ} = \frac{\text{น้ำหนักน้ำ } (g)}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง } (g)}$$

3.2) การทดสอบการพองตัวและการละลายที่อุณหภูมิต่างๆ

นำแป้งข้าว 0.5 กรัม (m_0) จากนั้นเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร นำไปต้มที่ต้มที่อุณหภูมิต่างๆคือ 60, 65, 70, 75, 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง เป็นเวลา 15 นาที ที่ความเร็วรอบ 3000 xg แล้วนำส่วนใสไปอบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส แล้วชั่งน้ำหนัก (m_s) ส่วน

ตะกอนก็นำไปชั่งน้ำหนักเช่นเดียวกัน (m_{sw}) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วคำนวณค่าการพองตัวและความสามารถในการละลายตามสูตร

$$\text{ความสามารถในการพองตัว} = \frac{\text{น้ำหนักตะกอน } m_{sw}}{\text{น้ำหนักแป้งเริ่มต้น}(m_0)\ (1 - \text{ความสามารถในการละลาย})}$$

$$\text{ความสามารถในการละลาย} = \frac{\text{น้ำหนักส่วนใสอบแห้ง } (m_s)}{\text{น้ำหนักแป้งเริ่มต้น } (m_0)}$$

3.16.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีต่อสมบัติของแป้งข้าว

แปรผันความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างน้อย 5 ระดับเหนือค่า CMC คือ 120 150 200 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค่า CMC = 116.16 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อสมบัติของแป้งตามข้อ 2) คือ ทดสอบสมบัติการเกิดเพสต์โดยใช้เครื่องมือ Rapid Visco Analyser (RVA) และ 3) คือ ทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) ทดสอบการพองตัว (swelling power) และการละลาย (solubility) ของแป้งข้าวที่อุณภูมิต่างๆ โดยเตรียมสารลดแรงตึงผิวผสมกับแป้ง ตามรายงานของ เกรียงศักดิ์ [62] คือ เตรียมสารลดแรงตึงผิวให้มีปริมาณเป็น 3% ของน้ำหนักแป้งที่ใช้

222725008