บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychrotherm incubator shaker) รุ่น AG Rittergasse 27 ของบริษัท INFORS ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave) รุ่น HA-26 ของบริษัท Hirayama Manufacturing ประเทศญี่ปุ่น

มาตรวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น HI 8424 ของบริษัท Hanna Instruments ประเทศอิตาลี

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic-21 ของบริษัท Bausch&Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ (evaporator) รุ่น RE 52 เครื่องดูดให้เป็นสูญญากาศ (vacuum aspirator) รุ่น BP-51 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องกำเนิดคลื่นอัลตราโซนิค (sonicator) ยี่ห้อ Delta รุ่น Ultrasonic Cleaner D 200 ของบริษัท D.S.C. group ประเทศไต้หวัน

ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น IN-81 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) รุ่น LC-8A และเครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (Fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300-5L ใบพัดแบบ 6 blade turbine ตัวควบคุมสภาวะ (bioprocess controller)รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องอัดอากาศ (air compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (circulation type) รุ่น TRC-108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรดมะนาวชนิดปราศจากน้ำ	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไอโซซิตริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดทาร์ทาริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดฟอสฟอริก	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
กรดซัลฟิวริก	J.T. BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดซัลฟิวรัส	ไทยวา	ประเทศไทย
กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไฮโดรคลอริก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แคลเซียมคาร์บอเนต (เกรด OMEGA)	ศิลาทิพย์	ประเทศไทย
แคลเซียมซัลเฟต	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
แคลเซียมคลอไรด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โซเดียมคลอไรด์	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมซัลเฟต	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมเฮปตาไฮเดรต	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
พี.จี.โอ. เอนไซม์	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เปปโตน	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แป้งมันสำปะหลัง	ไทยวา	ประเทศไทย
สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ประเทศไทย
สารสกัดจากมอลต์	FIS	ประเทศไทย
เอนไซม์ BAN 240L	NOVO NORDISK	ประเทศเดนมาร์ก
เอนไซม์ DEXTROZYME225/75L	NOVO NORDISK	ประเทศเดนมาร์ก
ออโธ-ไดอะนิซิดีน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แอมโมเนียมคลอไรด์	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

เมธานอล	J.T. BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กากมันสำปะหลัง	กิจรุ่งเรือง	ประเทศไทย

หมายเหตุ IBGE = สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FIS = Food Ingredients Specialities.

2.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นยีสต์สายพันธุ์ *Candida oleophila* NN-39 ซึ่งได้ผ่านการคัดเลือกแล้วโดย เชาวรีย์ เรืองวิไลทรัพย์ (2539)

2.3 การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

2.3.1 การเก็บรักษาเชื้อ

ถ่ายเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) ลาก (streak) บนอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) สูตรอาหาร YM (ภาคผนวก ก 1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เก็บเชื้อในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

2.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็งลาดเอียงสูตร YM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.1) โดยเติมน้ำที่ฆ่าจัดไอออนซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2.5 มิลลิลิตรต่อหนึ่งหลอดของเชื้อบนอาหารแข็งลาดเอียง ปิเปตต์เซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ซึ่งวิธีนี้จะทำให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นวัดโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรประมาณ 0.05 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม (rotary shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที นาน 15 ชั่วโมง

2.3.2.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร

ปิเปตต์หัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.1 ลงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2) ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น ประมาณ 0.7 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบวงกลมควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

2.3.2.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาณอาหารเริ่มต้น 2.7 ลิตร ปริมาณ 300 มิลลิลิตร ปริมาตรรวมในถังหมักเท่ากับ 3 ลิตร คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นประมาณ 0.7 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมตามภาคผนวก ก 2.1.3 นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น ควบคุมภาวะในการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

2.4 วิธีวิเคราะห์

2.4.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ใช้มาตรวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

2.4.2 การละลายเกลือแคลเซียมซิเตรทในน้ำหมัก (ตามวิธีของ Nakanishi และคณะ, 1972)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อจะต้องทำการละลายเกลือแคลเซียมซิเตรทที่เกิดขึ้นก่อน โดยการทดลองในระดับขวดเขย่า นำน้ำหมักมา 25 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ประมาณ 1.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100.00 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว ส่วนการทดลองในระดับถังหมัก 5 ลิตร นำน้ำหมักมา 5 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ประมาณ 1.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว

2.4.3 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตต์สารละลายที่ได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ไปกรองผ่านกระดาษกรอง whatman GF/C ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนโดยใช้เครื่องกรองอย่างละเอียด (Millipore Filter) และเครื่องสูบสูญญากาศ ล้างเซลล์ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว 50 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิเคเตอร์ นำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งหน่วยเป็นกรัมต่อลิตรด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด ส่วนสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองเอาเซลล์ออกแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และหาน้ำตาลที่เหลือต่อไป

2.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกโดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟฟี (HPLC) (สมศักดิ์,2537)

ปิเปตต์สารละลายตัวพาปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการกรองในข้อ 3 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท ฉีดสารละลายที่เตรียมได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะดังนี้

คอลัมน์	: Selectosil 5 C18 ขนาด (I.D.) 4.6 มิลลิเมตร ยาว 25 เซนติเมตร
สารละลายตัวพา	: ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต($(NH_4)_2HPO_4$) 5 กรัมต่อลิตร ในน้ำที่กำจัดไอออนแล้วเป็นอย่างดี ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.0 ด้วยกรดฟอสฟอริก
สารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน	: กรดทาร์ทาริกเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ในน้ำปราศจากไอออน
อุณหภูมิที่ใช้	: 40 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	: คลื่นอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร

โดยใช้สภาวะดังกล่าวเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดมะนาวประมาณ 5.8 นาที และกรดไอโซซิตริกประมาณ 3.6 นาที คำนวณหาปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกจากกราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0-5.0 กรัมต่อลิตร และกราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิตริกในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งกราฟมาตรฐานที่ใช้นั้นเป็นกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดมะนาวหรือกรดไอโซซิตริกกับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของกรดต่อสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (ภาคผนวก ง 1 และภาคผนวก ง 2)

2.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ดัดแปลงจากวิธี Bernfeld, 1955)

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค 2) ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที

แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็น 5 นาที เติมน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำที่กำจัดไอออนแล้วและผ่านขั้นตอนข้างต้นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ง 3)

2.4.6 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ พี.จี.โอ. เอนไซม์ (Huggett and Nixon, 1957)

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายพี.จี.โอ. เอนไซม์(ภาคผนวก ค 4) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปมในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ใช้น้ำที่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย