บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องบันทึกการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Spectronic 20 บริษัท Baush Lomb , U.S.A.

เครื่องบันทึกการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Shimadzu UV-20 บริษัท Shimadzu , Japan

เครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ (Bench top centrifuge) International Equipment , U.S.A.

เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated centrifuge) Beckman Model JA14 บริษัท Beckman Instrument Inc., U.S.A.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (Shaking water bath) Gyrotary water bath shaker Model G-76 New Brunswick Scientific Edison , N.J. , U.S.A. Heto lab Equipment บริษัท Heto lab Equipment , Denmark

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (Controlled environment incubator shaker , Psycrotherm) บริษัท New Brunswick Scientific Edison , N.J. , U.S.A.

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) PHM 33 pH meter บริษัท Radiometer Copenhagen , Denmark

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) Model HA-30 บริษัท Hirayama Manufacturing Cooperation , Japan

ตู้อบแสงอุลตร้าไวโอเลต (Larminar Flow) Model BVT-124 บริษัท International Scientific Supply Co.Ltd , Thailand

ตู้อบ อุณหภูมิ 60 °ซ สำหรับอบเซลล์ และกัม บริษัท Memmert, Germany

เครื่องมือวัดความหนืด (Brookfield Viscosmeter) Model RVT บริษัท Brookfield Engineering Laboratories, INC. Stoughton, MA USA.

เครื่องมือวัดความหนืด ที่แนะนำออกแบบโดยออกแบบโดย ดร. เลอสรรชนะสุกาญจน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี (ชื่อทางการค้า)	บริษัทผู้ผลิต
แซนแทน กัม (Xanthan Gum)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
กลูโคส (D(+)-Glucose monohydrate)	Reidel-dehaenag Sulfehannover, Germany
เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
กลูโคส ออกซิเดส (Glucose oxidase)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
โครโมเจน (Chromogen)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
กรดเปอร์คลอริก (Perchloric acid)	Reidel-dehaenag Sulfehannover, Germany
ซูโครส (Sucrose)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
กรดไพรูวิก (Pyruvic acid)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
NADH (β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
แลคติค ดีไฮโดรจีเนส (L-Lactic Dehydrogenase,LDH)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
ไตรเอททาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์ (Triethanolamine Hydrochloride)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
แอลกอฮอล์ (Ethanol 95%)	องค์การสุรา กรมสรรพสามิต
แอมโมเนียมไนเตรต (Ammonium nitrate)	E.Merck Co., Germany
โปแตสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)	E.Merck Co., Germany

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และสารเคมีทั่วไปชนิดอื่นๆทุกชนิดเป็นผลิตภัณฑ์ analytical สั่งซื้อมาจากบริษัท Sigma Chemical Co., ประเทศสหรัฐอเมริกา ,บริษัท B.D.H., ประเทศอังกฤษ เป็นต้น

2.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาวิจัย คือ *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 ที่ได้มาจากสถาบัน NRRL (Northern Religion Research laboratory), Perollia, สหรัฐอเมริกา เป็นสายพันธุ์แม่แบบซึ่งนิยมนำมาใช้ในการศึกษา (U.S.Pat.3,355,447, Kenedy และ Bradshow 1984)

2.3 อาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

2.3.1 อาหารอุดม

ในสูตรอาหาร 1 ลิตร นี้ประกอบด้วย

Nutrient broth	8	กรัม
Agar	20	กรัม

2.3.1 อาหารเก็บเชื้อ Wakimoto Agar

ในสูตรอาหาร 1 ลิตร นี้ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	300	กรัม
แคลเซียมไนเตรต	0.5	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
ซูโครส	20	กรัม
Agar	15	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.2 สูตรอาหารเลี้ยงสำหรับทำ Inoculum

ในสูตรอาหาร 1 ลิตร นี้ประกอบด้วย

แอมโมเนียมไนเตรต	0.6	กรัม
เปปโตน	3	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต	0.1	กรัม
กลูโคส	11	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.4

2.3.3 สูตรอาหารสร้างแซนแทน กัม (จากสูตร McNeely, 1968) (1 ลิตร)

แอมโมเนียมไนเตรต	0.6	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1	กรัม
กลูโคส	22.5	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.4

2.3.4 สูตรอาหารสร้างแซนแทน กัม (ปรับปรุงใหม่)

ในสูตรอาหาร 1 ลิตร นี้ประกอบด้วย

แอมโมเนียมไนเตรต	0.8	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	4	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1	กรัม
กลูโคส	30	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.4

2.4 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เนื่องจากเชื้อ *X. campestris* NRRL B-1459 มีการแปรผันสูง(high variation)

ในขณะที่ถ่ายเชื้อทำให้การผลิตกัมลดลง จึงต้องเก็บรักษาเชื้อโดยเจริญแบคทีเรีย 1 โคโลนีบนอาหารแข็ง W.A. (จากข้อ 2.3.1) ที่อยู่ในหลอดแก้ว ในลักษณะลาดเอียง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทพาราฟินเหลวทับจนท่วมอาหารและแบคทีเรีย เก็บไว้ที่-20 °ซ นานประมาณ 1 ปี หรือเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น Master plate ในระหว่างทำการทดลอง นอกจากนี้แล้วน่าไปทำการเก็บเชื้อด้วยวิธีแช่แข็ง (Lyophilization) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 10 ปีขึ้นไป (Cadmus และคณะ,1976)

2.5 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย

2.5.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter inoculum)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีจากเชื้อที่ได้ ทำการ subculture ลง plate ใหม่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับทำ Inoculum (จากข้อ 2.3.2) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส นานประมาณ 17-20 ชั่วโมง

2.5.2 การถ่ายเชื้อและติดตามการเจริญ

ใส่เชื้อตั้งต้น 2 % ลงในอาหารสูตรสร้างแซนแทน กัม (จากข้อ 2.3.3) 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีที่ห่อด้วยผ้าขาวบางจำนวน 50 ขวด บ่มและเขย่าในเครื่อง Psycrotherm ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ติดตามการเจริญของแบคทีเรียทุก 24 ชั่วโมง นำไปบันทึกผลการทดลองดังนี้

ก. วัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

ข. นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable cell count) โดยการเจือจางเซลล์อยู่ในช่วง 10^{2}-10^{30} เท่าด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ เรียกว่านอร์มอลซาลีน กระจายแบคทีเรียบนเพลทที่มีอาหารสูตรอุดม บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นให้อยู่ในช่วง 200-300 โคโลนี

ค. วัดน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight) โดยการนำเซลล์มาปั่นแยกออกจากอาหาร ใช้เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีที่ 4 °ซ ล้างเซลล์ 1 ครั้ง ด้วยอาหารที่ปราศจากกลูโคส นำไปปั่นแยกเซลล์อีกครั้ง แล้วนำเข้าอบในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง จึงนำมาชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง

ง. pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะๆ

นำส่วนน้ำใส (supernate) ที่ได้จากข้อ ค. ไปหาค่าต่อดังนี้

จ. ปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยวิธีของ Bergmeyer และคณะ (1965) (ตามคำอธิบายข้อ 2.6.1 และ 2.7)

ฉ. ปริมาณกรดไพรูวิก โดยวิธีของ Duckworth และ Yaphe(1970) (ตามคำอธิบายข้อ 2.6.2 และ 2.8)

ช. ความหนืด โดยเครื่องมือวัดความหนืดแบบ Brookfield Viscosimeter model R.V.T (ตามคำอธิบายข้อ 2.9.1)

ช. ความหนืด โดยเครื่องมือวัดความหนืดที่ดัดแปลงขึ้นเอง (ตามคำอธิบายข้อ 2.9.2)

ฌ. ปริมาณกัม โดยการเติมเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเกลือละลายหมดแล้วจึงเติมเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ ปริมาณเป็น 2 เท่าของส่วนน้ำใส เขย่าให้เข้ากันจะพบกัมมีลักษณะเป็นแผ่นสีขาวคล้ายวุ้นลอยขึ้นมา นำไปปั่นแยกออกจากน้ำใส โดยใช้เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 °ซ แล้วนำเข้าตู้อบ 60 °ซ เป็นเวลา 17 ชั่วโมง จึงนำมาชั่งน้ำหนักกัมแห้ง จากนั้นนำไปบดให้เป็นผงซึ่งจะได้สีขาวขุ่น (ครีม) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

2.6 การเตรียมสารละลาย

2.6.1 สารละลายที่ใช้ในการวัดปริมาณกลูโคส (Bergmeyer และคณะ,1965)

2.6.1.1 สารละลายผสมบัฟเฟอร์และเอนไซม์(ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 7.0 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 2.07 กรัม, โซเดียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.2H_2O$) 1.09 กรัม, เปอร์ออกซิเดส 6 กรัม และกลูโคสออกซิเดส 38 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นได้นาน 2-3 วัน

2.6.1.2 โครโมเจน

ละลายออโธไดอะนิซีดินไดไฮโดรคลอไรด์ (Orthodianicidine dihydrochloride) 10 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2-3 วัน

2.6.1.3 สารละลายกลูโคสรีเอเจนต์ (Glucose reagent)

ผสมสารละลายในข้อ 2.6.1.1 50 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ 2.6.1.2 0.5 มิลลิลิตร เตรียมขึ้นใหม่ทุกครั้งที่ใช้

2.6.1.4 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ละลายกลูโคส 25 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมกรดเปอร์คลอริก 70 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.625 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 ° ซ

2.6.1.5 สารละลายกรดเปอร์คลอริก

ละลายกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 2.9 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.6.2 <u>สารละลายที่ใช้ในการวัดปริมาณกรดไพรูวิก</u> (Duckworth และ Yaphe,1970)

2.6.2.1 สารละลายไตรเอทธาโนลามีน บัฟเฟอร์

ละลายไตรเอทธาโนลามีนไฮโดรคลอไรด์ 7.6 กรัม ด้วยน้ำกลั่นและเติมไดโซเดียม-เอทธิลีนไดอะมีนเตตระอะซิเตต (EDTA) 2 กรัม ก่อนปรับ pH ให้เป็น 7.5 แล้วจึงปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2.6.2.2 สารละลาย NADH

ละลาย NADH 10 มิลลิกรัม ด้วย 1 เปอร์เซนต์ของโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 1 มิลลิลิตร

2.6.2.3 เอนไซม์แลกเตตดีไฮโดรจีเนส (Lactate Dehydrogenase Enzyme)

นำเอนไซม์ 1700 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มาเจือจาง 10 เท่า ด้วยบัฟเฟอร์ (ข้อ 2.6.2.1) และนำมาใช้ 8 ไมโครลิตรต่อครั้งของการวิเคราะห์

2.6.2.4 สารละลายกรดไพรูวิกมาตรฐาน

ละลายไพรูเวต 82.5 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °ซ

2.7 การวัดปริมาณกลูโคส (Bergmeyer และ Bent, 1965)

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณกลูโคส 0.1 มิลลิลิตร มาผสมกับกรดเปอร์คลอริก (ข้อ 2.6.1.5) 1.0 มิลลิลิตร (เพื่อตกตะกอนโปรตีน) เขย่าแรงๆแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใส 0.2 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายกลูโคส รีเอเจนต์ (ข้อ 2.6.1.3) 5 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 30 นาที วัดความเข้มข้นของสีน้ำตาลอมแดงซึ่งเกิดขึ้นที่ 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectronic 20 เปรียบเทียบปริมาณกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส (ข้อ 2.6.1.4)

2.8 วิธีการวัดปริมาณกรดไพรูวิก (Duckworth และYaphe, 1970)

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณกรดไพรูวิก 8 มิลลิลิตร มาทำการไฮโดรไลซ์ในน้ำมัน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 5 นอร์มอลปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 6 นอร์มอลปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปิเปตสารละลายมา 2 มิลลิลิตร ลงในคิวเวตแบบควอทซ์ (Quartz cuvette) ขนาด 3 มิลลิลิตร เติมสารละลายไตรเอทธาโนลามีน บัฟเฟอร์ (ข้อ 2.6.2.1) 1 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมสารละลาย NADH (ข้อ 2.6.2.2) 50 ไมโครลิตร และเอนไซม์แลคเตสดีไฮโดรจีเนส (ข้อ 2.6.2.3) 8 ไมโครลิตร ตามลำดับ ติดตามผลของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่องบันทึกการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Shimadzu UV-20 เปรียบเทียบปริมาณกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดไพรูวิก (ข้อ 2.6.2.4)

2.9 วิธีการวัดค่าความหนืด

2.9.1 วัดด้วยเครื่องวัดความหนืด Brookfield Dial Reading Viscosimeter model R.V.T ใช้เข็มวัด No.1 ความเร็ว 20 รอบต่อนาที ที่ 25 °ซ ในการวัดแต่ละครั้งควรใช้สารตัวอย่างที่จะวัดค่าความหนืดมีไม่ต่ำกว่า 200 มิลลิลิตร ตามรูปที่ 2 เข็มที่ใช้วัดและความเร็วในการหมุน (รอบต่อนาที) สามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อความหนืดเพิ่มมากขึ้น

2.9.2 วัดด้วยเครื่องวัดความหนืดที่ดัดแปลงขึ้นเอง เรียกว่า model viscosimeter ที่แนะนำการออกแบบโดย ดร. เลอสรร ธนะสุกาญจน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ตามรูปที่ 3) โดยใช้การจับเวลาการวิ่งของลูกเหล็กที่มีขนาด 1/8 นิ้ว ผ่านสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัด ซึ่งสารละลายตัวอย่างถูกดูดอยู่ในปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร เริ่มจับเวลาเมื่อลูกเหล็กวิ่งผ่านขีด 0 จนถึงขีด 0.9 ซึ่งเป็นระยะทาง 16.8 เซนติเมตร โดยที่เวลาในการวิ่งผ่านของลูกเหล็กจะขึ้นกับความหนืดของสารละลายแล้ว ยังขึ้นอยู่กับการเอียงเป็นมุมของปิเปต ซึ่งในการทดลองนี้กำหนดไว้ 4 มุม คือที่มุม 15, 20, 25 และ 30 องศา ณ. อุณหภูมิ 25 °ซ นำมาวาดกราฟระหว่างเวลาและชั่วโมงที่เก็บสารละลายตัวอย่างต่างๆกันที่มุมต่างๆ และนำมาเทียบหาความสำคัญเพื่อจะคำนวณหาเป็นกรัมเปอร์เซนต์

2.10 การขยายระดับการผลิตสู่ถังหมัก

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแซนแทนในระดับห้องปฏิบัติการแล้ว จึงนำไปขยายระดับการผลิตแซนแทนในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) แบบ air bubble ที่ออกแบบโดย ศ. ดร. สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีรายละเอียดดังนี้

2.10.1 อุปกรณ์

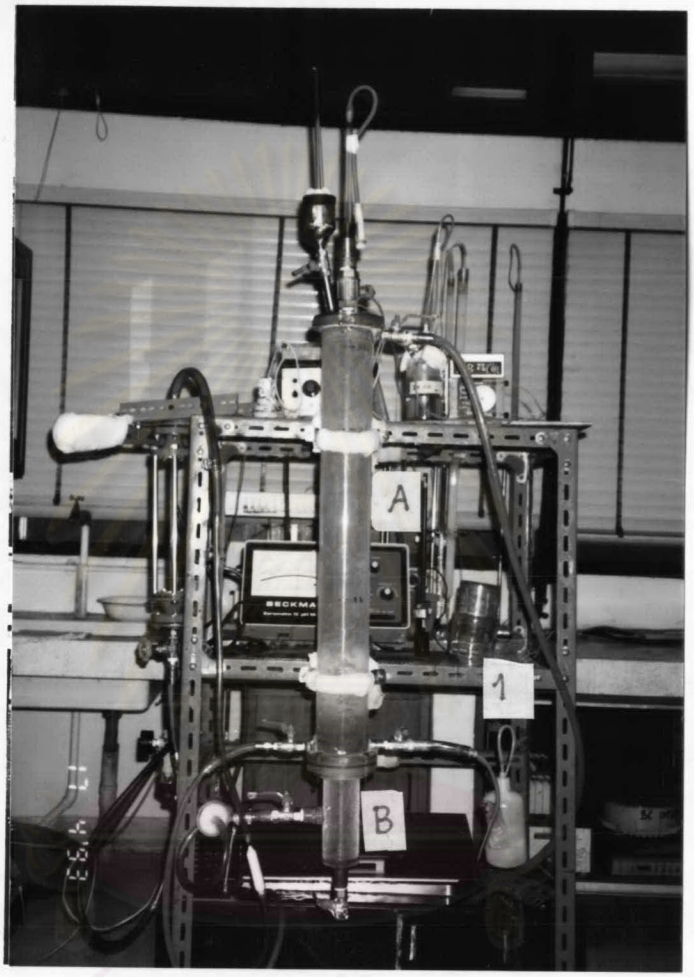
รูปที่ 4.1 แสดงรูปถังหมักชีวปฏิกรณ์ (Bioreactor) แบบฟองอากาศ (Air bubble) ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญคือ

2.10.1.1 ส่วนให้อากาศ

ส่วนให้อากาศมีลักษณะดังรูป 4.2 ตัวคอลัมน์ทำด้วยพลาสติกชนิดโพลีอะคริลิก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 6.4 เซนติเมตร สูง 19 เซนติเมตร ด้านบนมีลักษณะเปิด สามารถวางแผ่นกระจายอากาศ (air distributor) ซึ่งทำจากแผ่นสแตนเลสเจาะรูเล็กๆ ทั่วแผ่น เพื่อให้อากาศสามารถกระจายสู่คอลัมน์หมักได้อย่างทั่วถึง และมี O - ring ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร ส่วนด้านล่างของท่อที่ทำด้วยพีวีซี และมีวาวล์สามารถไขเพื่อล้างทำความสะอาดได้ง่ายส่วนด้านข้างจะต่อเข้ากับท่ออากาศที่ผ่านมาจากตัวกรองอากาศ (air filter) ซึ่งต่อกับ Rotameter และ ปั๊ม (pump) อีกที

รูปที่ 2 แสดงเครื่องมือวัดความหนืด Brookfield Dial Reading Viscosimeter Model R.V.T.

รูปที่ 3 แสดงเครื่องมือวัดความหนืดที่ดัดแปลงขึ้นเอง (Model Viscosimeter) พร้อมอุปกรณ์ที่ช่วยในการวัด

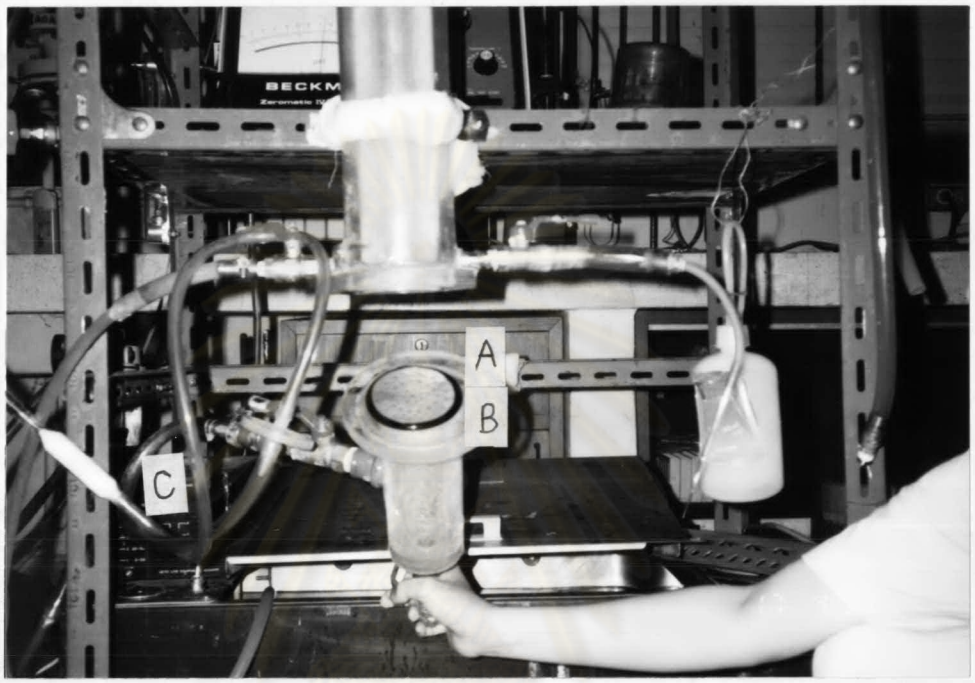


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.1 แสดงถังหมักชีวปฏิกรณ์ขนาด 2.5 ลิตร ประกอบด้วย

A. คอลัมน์หมัก และส่วนชักตัวอย่าง (1)

B. ส่วนให้อากาศ



รูปที่ 4.2 แสดงส่วนที่ให้อากาศ ที่ประกอบด้วย

A. แผ่นกระจายอากาศ (Air Distributor)

B. O-ring

C. ตัวกรองอากาศ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.10.1.2 ส่วนคอลัมน์หมัก

มีลักษณะดังรูป 4.1 A ตัวคอลัมน์ทำด้วยพลาสติกชนิดโพลีอะคริลิก 2 ชั้น ชั้นนอกเป็นส่วนผ่านน้ำเพื่อควบคุมอุณหภูมิ 30 °ซ ชั้นในเป็นส่วนสำหรับหมัก มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 6.4 เซนติเมตร และสูง 83 เซนติเมตร ด้านบนสามารถต่อเข้ากับแผ่นเหล็กที่เป็นรูปกรวยสำหรับถ่ายเชื้อลงสู่คอลัมน์หมัก และมีท่อสำหรับอากาศออก ส่วนด้านล่างเจาะท่อที่มีวาวล์ปิดเปิดสำหรับชักตัวอย่างออกมาวิเคราะห์

สำหรับส่วนประกอบอื่นๆที่สำคัญมีดังนี้

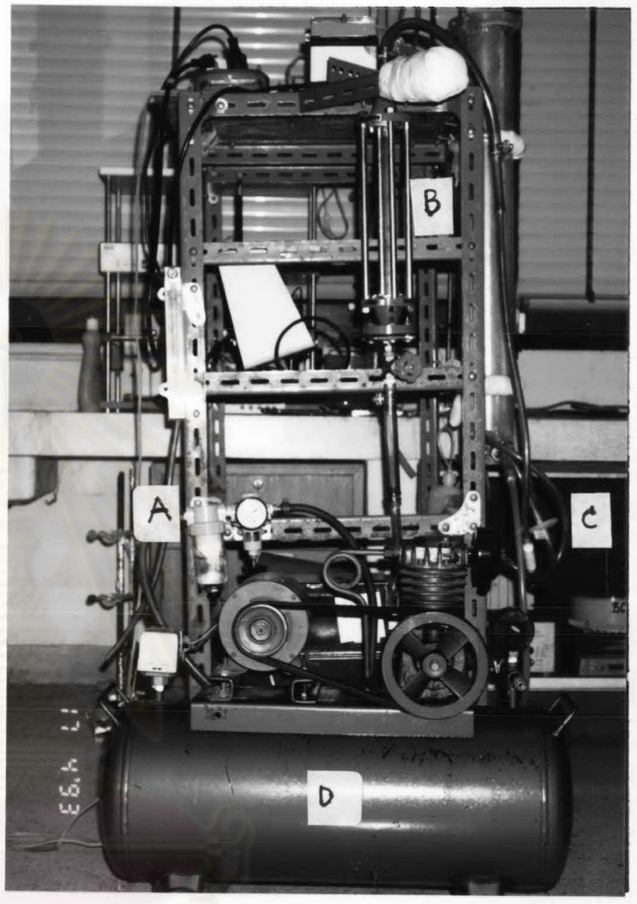
ก. Air Regulator เป็นอุปกรณ์สำหรับควบคุมการผ่านเข้าของอากาศจากปั๊มสู่คอลัมน์หมักให้คงที่ตลอดเวลา (ดังรูป 4.3 A)

ข. Rotameter เป็นอุปกรณ์ใช้วัดเพื่อกำหนดอัตราการผ่านของอากาศจากปั๊มเข้าสู่ถังหมัก (ดังรูป 4.3 B)

ค. Air Filter เป็นตัวกรองอากาศก่อนเข้าสู่คอลัมน์หมัก ในการทดลองนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที (ดังรูป 4.3 C)

ง. แผ่นเหล็กส่วนบนที่สามารถนำมาต่อกับคอลัมน์หมัก ตามรูป 4.4 ซึ่งประกอบด้วย

- ท่อกรวย ที่มีวาวล์ปิด-เปิด ใช้สำหรับถ่ายเชื้อสู่คอลัมน์หมัก และมีจุดยางอุดอีกครั้งหนึ่ง (รูป 4.4 A)
- ท่อสำหรับอากาศออก มีวาวล์ ปิด-เปิด เช่นกัน อุดด้วยจุกยางที่เจาะรูตรงกลางสำหรับใส่ท่อแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.8 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตรโดยที่ปลายท่อจะต่อเข้ากับสายยางซึ่งมีสำลีอุดอยู่ (รูป 4.4 B)
- ท่อสำหรับเติมสารลดฟอง (Antifoam) ใช้ Adecanol ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับ Air filter ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 มิลลิลิตร ยาว 10 เซนติเมตร (รูป 4.4 C)
- ท่อสำหรับเติม KOH (2 M) สำหรับปรับ pH ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกัน มีขนาดและความยาวเท่ากับท่อที่เติมสารลดฟอง
- O-ring มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร (4.4 D)



รูปที่ 4.3 แสดงส่วนประกอบสำคัญต่างๆ

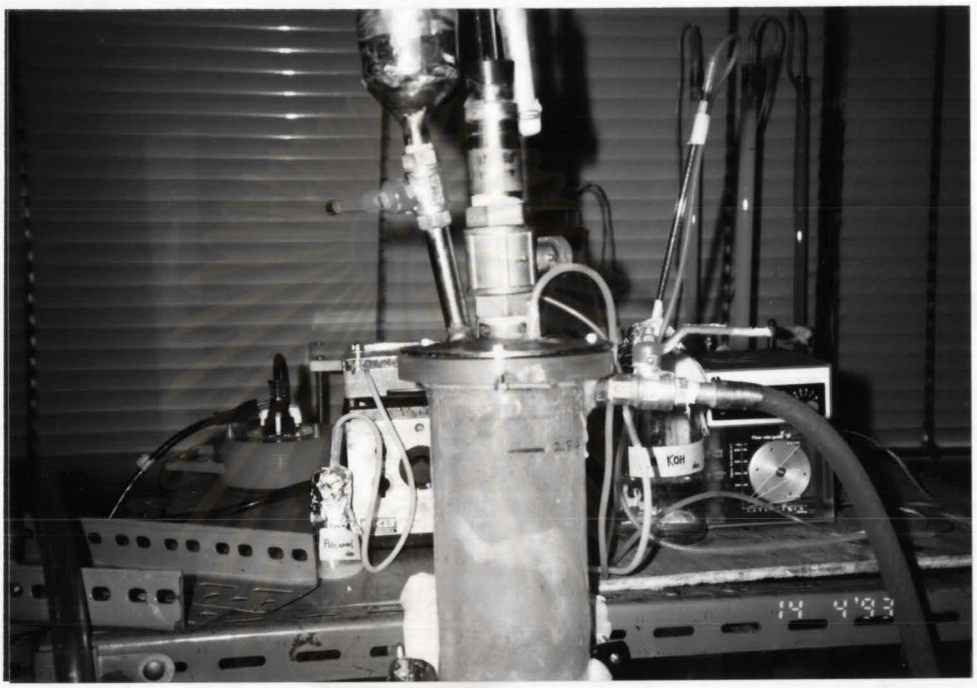
A. Air Regulator

B. Rotameter

C. Air Filter

D. Pump

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แสดงแผ่นเหล็กส่วนบนเมื่อทำการประกอบแล้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.10.2 การเตรียมคอลัมน์หมัก

คอลัมน์หมักทำให้ปราศจากเชื้อโดยแช่ด้วยยาฆ่ารา (เบนเลท) 3 ชั่วโมง แล้วจึงผ่านเอทานอล 70 เปอร์เซนต์เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปฉายแสง UV เป็นเวลา 1 คืน ส่วนหัวคอลัมน์ที่เป็นแผ่นเหล็ก O-ring ตัวกระจายอากาศ (Air distributer) แช่เอทานอล 70 เปอร์เซนต์ แล้วนำไปฉายแสง UV เช่นเดียวกัน สำหรับตัวกรองอากาศ และสายยางต่างๆ ที่ต่อเข้าท่อของคอลัมน์หมัก ให้นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้

การประกอบอุปกรณ์ต่างๆเข้าด้วยกันต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) แล้วจึงนำมาติดตั้ง จากนั้นจึงทำการเตรียมเดินระบบหมัก โดยการใช้น้ำกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

แล้วล้างทำความสะอาดก่อนลงเชื้อ 2 ครั้งโดยวิธี aseptic technique ใช้เวลาล้างประมาณ 10-20 นาที จนหมดกลิ่นแอลกอฮอล์ แล้วจึงถ่ายออกโดยวิธี aseptic technique เช่นกัน

2.10.3 การถ่ายเชื้อเพื่อเริ่มเดินระบบหมัก แชนแทน (Start up)

ทำโดยเตรียมอาหารที่เป็น inoculum ตามข้อ 2.3.2 ให้พอสำหรับ working volume 2 ลิตร เมื่อใส่เชื้อตั้งต้น 4 เปอร์เซนต์ ในการขยายการผลิตแชนแทนใน Bioreactor นี้จะใช้อาหารที่ผ่านการดัดแปลงจากสูตรเดิมของ McNeely (ข้อ 2.3.3) (optimized) ซึ่งประกอบด้วย

แอมโมเนียมไนเตรต	0.08 เปอร์เซนต์
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.4 เปอร์เซนต์
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.01 เปอร์เซนต์
กลูโคส	3 เปอร์เซนต์

ปรับ pH ให้เป็น 7.4

แต่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อในคอลัมน์หมักนี้จะเพิ่มไดโปแตสเซียมไฮโดรเจน-ฟอสเฟตเท่าตัวคือใช้ร้อยละ 0.8 (w/v)

การถ่ายเชื้อลงคอลัมน์หมักที่ผ่านการล้างสะอาด (จากข้อ 2.10.2)ทำโดยวิธี aseptic technique เช่นกัน ควบคุมอัตราการเติม2โมลาร์ KOH เพื่อปรับ pHไม่ให้ต่ำกว่า 6 จนสิ้นสุดการทดลอง ใช้เวลานาน 96 ชั่วโมง โดยทำการชักตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์การหาค่าต่างๆตามข้อ 2.5.2 เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในขวดเขย่าซึ่งเป็นชุดควบคุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i17896238