บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm incubator shaker)	AG แบบ KF-4	บริษัท INFROS ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
	G-25	บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศอเมริกา
เครื่องปั่นแยกแบบตั้งโต๊ะ (Bench-Top centrifuge)	Minor 35-MSE	บริษัท MSE ประเทศอังกฤษ
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Spectronic-21	บริษัท Bausch & Lomb ประเทศอเมริกา
เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave)	HA-26	บริษัท Hirayama Manufacturing ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องเขย่า (Vortex Mixer)	Vortex-Genie	บริษัท Scientific Industries ประเทศอเมริกา
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH Meter)	pH-M82	บริษัท Radiometer ประเทศเดนมาร์ก
ไมโครเวฟ (Microwave)	NE-7670	บริษัท National ประเทศญี่ปุ่น
กาซโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography)	GC-7AG	บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

1.2 สารเคมีและเชื้อจุลินทรีย์

1.2.1 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
นอร์มัล พาราฟฟินส์	Exxon Chemicals
Corexit-7664	Exxon Chemicals
แคลเซียมคาร์บอเนต	E.Merck Damstadt
บิวทานอล	E.Merck Damstadt
คลอโรฟอร์ม	E.Merck Damstadt
เอทธานอล	E.Merck Damstadt
เฮปเทน	E.Merck Damstadt
ไฮโดรเจนโบร์ไมด์	E.Merck Damstadt
โปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต	E.Merck Damstadt
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	E.Merck Damstadt
แอมโมเนียมไนเตรต	E.Merck Damstadt
สารสกัดจากยีสต์	E.Merck Damstadt
แมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต($MgSO_4.7H_2O$)	E.Merck Damstadt
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต($MnSO_4.H_2O$)	BDH Chemicals
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต($FeSO_4.7H_2O$)	BDH Chemicals
โปตัสเซียมโบรไมด์(KBr)	BDH Chemicals
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรต($CuSO_4.5H_2O$)	Sigma Chemicals
ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์	Sigma Chemicals
ซิตริคโมโนไฮเดรต	Sigma Chemicals
คอร์นสตีปลิเคอร์ (cornsteep liquor)	Sigma Chemicals
โซเดียมเตตระโบเรต(sodium tetraborate)	Sigma Chemicals

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
โบรโมคลีซอลกรีน	Sigma Chemicals
แอมโมเนียมซัลเฟต	Sigma Chemicals
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต($ZnSO_4.7H_2O$)	Sigma Chemicals
มอลโตส(maltose)	Sigma Chemicals
กาแลคโตส(galactose)	Sigma Chemicals
ฟรุคโตส(fructose)	Sigma Chemicals
ทวีน-80	Sigma Chemicals
แป้งละลายน้ำ(soluble starch)	Sigma Chemicals
2,4-ไดไนโตรฟีนอล	Sigma Chemicals
Triton X-100	Packard
ไทโอยูเรีย(thiourea)	May & Baker
กลีเซอรอล(glycerol)	Bridh Bio-Science
แป้งมันสำปะหลัง	ซื้อจากตลาดทั่วไป
น้ำตาลทราย	ซื้อจากตลาดทั่วไป
กลูโคส	ซื้อจากตลาดทั่วไป
กากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว	ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช

1.2.2 เชื้อจุลินทรีย์

ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆจำนวน 25 สายพันธุ์ได้รับจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์สำหรับภาคพื้นเอเชียอาคเนย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ NRRL(Northern Regional Research Center) และ ATCC(American Type Culture Collection)สหรัฐอเมริกา ดังแสดงใน ตารางที่7

ตารางที่ 7 รายชื่อสายพันธุ์ต่างๆของยีสต์จำนวน 25 สายพันธุ์

สายพันธุ์	สายพันธุ์
Candida tropicalis 5031	Toruropsis glabrata 5241
Candida utilis 5032	Candida tropicalis 5268
Candida tropicalis 5045	Candida sp.5289
Candida tropicalis 5054	Candida tropicalis 5299
Candida pulcherrima 5120	Candida sp.5319
Candida parapsilosis 5126	Candida sp.5327
Pichia guilliermondii 5142	Candida lipolytica Y-311
Candida sp.5143	Candida lipolytica Y-1095
Candida tropicalis 5171	Candida guilliermondii Y-488
Candida tropicalis 5174	Candida intermedia Y-1512
Candida guilliermondii 5206	Candida lipolytica C-24
Cryptococcus albidus 5211	Candida oleophila C-73
Yarrowia lipolytica 5212	

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (อาหารแข็ง) ใช้อาหาร YM (ภาคผนวกที่ 1.1) สูตรอาหารสำหรับหัวเชื้อ (อาหารเหลว) และสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(อาหารเหลว)ที่ใช้เริ่มต้นการทดลอง ใน 1 ลิตรประกอบด้วยนอร์มัล พาราฟฟินส์ 30 กรัมสำหรับหัวเชื้อหรือ 60 กรัมสำหรับการผลิตกรด แอมโมเนียมไนเตรต 4.0

กรัม โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัม แมกเนเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.01 กรัม แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.01 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรต 0.005 กรัม ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.005 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัม ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ 0.001 กรัม และแคลเซียมคาร์บอเนต 100.0 กรัมสำหรับการผลิตกรด สำหรับอาหารเหลวไม่ใส่วุ้น ส่วนอาหารแข็งเติมวุ้นปริมาณ 20 กรัม อาหารทุกชนิดอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ.ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.1.2 การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อ

2.1.2.1 การเก็บรักษาเชื้อ

เขี่ยเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้วลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งลาดเอียง(agar slant) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30° ซ. เป็นเวลา 3 วันเมื่อเชื้อเจริญเติบโตดีแล้ว จึงนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70° ซ.

2.1.2.2 การเตรียมหัวเชื้อ

ถ่ายเชื้อ โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดที่มีอาหารแข็งลาดเอียงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM(อาหารเหลว) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อที่เตรียมได้ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ควบคุมปริมาณเซลล์ให้เท่ากันทุกการทดลอง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 610 นาโนเมตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30° ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.1.2.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อจากอาหารเตรียมหัวเชื้อ ปริมาณร้อยละ 10(ปริมาตรต่อปริมาตร)ลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ซึ่งบรรจุลงในขวดทดลองขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30° ซ. ตรวจหาการเติบโตและปริมาณกรดมะนาว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 10314477

2.2 วิธีการละลายเกลือแคลเซียม (calaium salts)ในน้ำหมัก[28,32]

ก่อนการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกรดมะนาว และติดตามการเติบโตของเชื้อ จะต้องทำการละลายเกลือแคลเซียมที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการหมัก โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0 จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 25 มล.

2.3 วิธีการวิเคราะห์

2.3.1 วิธีวัดการเติบโตของจุลินทรีย์[28]

2.3.1.1 โดยวิธีวัดค่าความขุ่นของเซลล์

หลังการละลายเกลือแคลเซียมตามวิธีในข้อ 2.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์จุลินทรีย์อยู่ 1 มล. เจือจางด้วยสารละลายผสมที่เตรียมล่วงหน้าระหว่างเอ็นบิวทานอล เอทธานอล และคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วนโดยปริมาตร 10:10:1 ตามลำดับ ปริมาตร 19 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

2.3.1.2 โดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

หลังการละลายเกลือแคลเซียมตามวิธีในข้อ 2.1 นำเชื้อที่เติบโตอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมสารละลายผสมของ เอ็น-บิวทานอล เอทธานอล และคลอโรฟอร์ม ที่เตรียมเช่นเดียวกับวิธีในข้อ ก. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า นำมาปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นแยกเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อล้างเซลล์ นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman แบบGF/C และแผ่นกรองอย่างละเอียด ด้วยเครื่องสูบสุญญากาศ อบเซลล์ที่ได้บนกระดาษกรองด้วยเครื่องไมโครเวฟ ด้วยความร้อนระดับดีฟรอส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นชั่งน้ำหนักที่คงที่แล้วด้วยเครื่องชั่งละเอียด

2.3.2 การวิเคราะห์กรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน (Pentabromoacetone Method)[47]

หลังการละลายเกลือแคลเซียมตามวิธีในข้อ 2.1 นำสารละสายที่ได้มาปั่นด้วยเครื่องปั่นแยก ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสมา

วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.3.2.1 การกำจัดสารที่รบกวนปฏิกิริยาเคมี

นำสารตัวอย่างปริมาตร 1.0 มล. เติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 18 โมลาร์ปริมาตร 0.1 มล. แล้วจึงเติมผงอะลันดัม (alundum grain)ลงไปปรับปริมาตรเป็น 3.0 มล.ด้วยน้ำกลั่น นำหลอดทดลองดังกล่าวใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่มีน้ำมันต้มอยู่โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 120° - 140° ซ. ระเหยจนสารละลายในหลอดทดลองเหลือประมาณ 1.0 มล. ทิ้งให้อุณหภูมิเย็นลงจนเท่ากับอุณหภูมิห้อง ซึ่งขั้นตอนนี้จะเป็นการกำจัดสารจำพวกกรดเบต้า-คีโตน(β-keto acids) อะเซทธาดีไฮด์(acetaldehyde) และอะซีโตน (acetone)

2.3.2.2 การเปลี่ยนกรดมะนาวเป็นเพนตาโบรโมอะซีโตน

นำสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.1เติมสารละลายโปตัสเซียมโบรไมด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ลงไป 5 หยด และเติมสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนัก/ปริมาตร)ลงไปอีก 10 หยดทันที เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

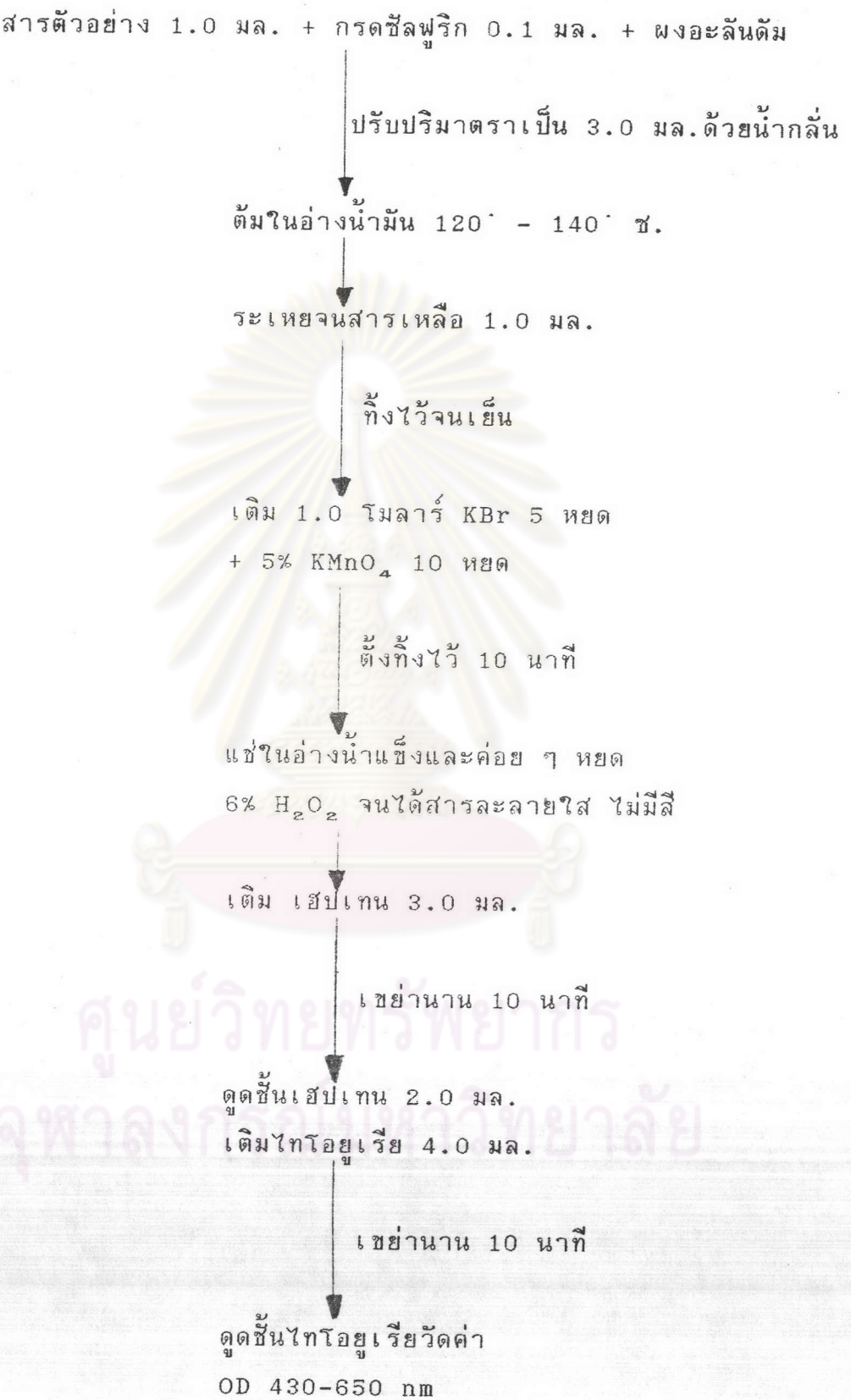
2.3.2.3 การสกัดเพนตาโบรโมอะซีโตนด้วยเฮปเทน

นำหลอดทดลองจากข้อ 2.3.2.2 แช่ในอ่างน้ำแข็งในขณะเดียวกันก็ค่อยๆ หยดสารละลายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 (ปริมาตรต่อปริมาตร)จนได้สารละลายใสไม่มีสี เติมเฮปเทนปริมาตร3.0 มล.ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท สกัดโดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

2.3.2.4 การสกัดด้วยไทโอยูเรีย

ดูดส่วนบนหรือชั้นของเฮปเทนจากหลอดใน ข้อ 2.3.2.3 ปริมาตร 2.0 มล.มาใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติมสารละลายไทโอยูเรีย (ภาคผนวกที่ 2.2)ปริมาตร 4.0 มล.ปิดฝาหลอดทดลองให้แน่น สกัดโดยการเขย่านาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

2.3.2.5 ดูดชั้นบนหรือชั้นเฮปเทนทิ้งไป แล้วจึงนำชั้นล่างหรือชั้นของสารละลายไทโอยูเรียที่สกัดได้จากข้อ 2.3.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่า



รูปที่ 7 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร หักลบจากค่าที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (วิธีการทดลองสรุปได้ดังแสดงรูปที่ 7)

เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดซิตริกโมโนไฮเดรตความเข้มข้นตั้งแต่ 0.02-0.2 กรัมต่อลิตรของกรดซัลฟุริกที่มีความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ใช้สารละลายมาตรฐานของกรดมะนาวดังกล่าวปริมาตร 1.0 มล.แทนสารละลายตัวอย่างแล้วจึงผ่านขั้นตอนต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกรดมะนาวกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เพื่อใช้เปรียบเทียบหาปริมาณของกรดมะนาวในสารละลายตัวอย่าง(ภาคผนวกที่ 6)

2.3.3 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ดัดแปลงจากวิธีของ Bernfeld[57] โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มล.เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค(ภาคผนวกที่ 2.3) ปริมาตร 0.5 มล.เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลานาน 5 นาที นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น(ประมาณ 10 นาที) เติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 5 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้กลูโคสมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-2.0 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบปริมาณกับกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวกที่ 7)

2.3.4 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

โดยวิธี Kjeldahl Gunning Method ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 การย่อย

นำสารตัวอย่าง 0.5 กรัม หรือปริมาตร 10 มล.ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 300 มล.เติมสารคะตะไลส์ (ประกอบด้วย คอปเปอร์ซัลเฟต 5กรัม กับโปตัสเซียมซัลเฟต 95 กรัม)7 กรัมและเติมกรดกำมะถันที่เข้มข้นปริมาตร 15 มล. นำไปย่อยบนเครื่องย่อย (digester) ซึ่งอยู่ในตู้ควัน จนได้สารละลายใสทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปวิเคราะห์ตามวิธีในขั้นตอนที่ 2 ต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน ด้วยเครื่องกลั่น

นำสารตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วจากขั้นตอนที่ 1 มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล.และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 37 (น้ำหนักต่อปริมาตร)ปริมาตร 20 มล.ทำการกลั่นจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายกรดบอริค (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มล.ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ผสม(เมทธิลเรด และเมทธิลีนบลู 0.1 กรัมในเอทธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 150 มล.) อยู่ 3 หยด กลั่นตัวอย่างจนกระทั่งสารละลายกรดบอริกมีปริมาตรเป็น 250 มล.นำสารละลายที่ได้มาติเตรตกับสารละลายมาตรฐานกรดกำมะถัน หาปริมาณไนโตรเจนได้จาก

ร้อยละของไนโตรเจน = (ปริมาตรติเตรตของตัวอย่าง X ความเข้มข้นของกรดกำมะถัน X 1.4)/ ปริมาตรของสารตัวอย่าง

2.3.5 การหาปริมาณนอร์มัล พาราฟฟินส์

2.3.5.1 โดยวิธีกาซโครมาโตรกราฟฟี

สกัดนอร์มัล พาราฟฟินส์ที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก โดยใช้คลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า นาน 1 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที ดูดสารละลายชั้นบนหรือชั้นคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 ไมโครลิตรฉีดเข้าเครื่องกาซโครมาโตกราฟฟี โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้คือ

คอลัมน์ (column)	: OV-1
กาซตัวพา (carrier gas)	: กาซไนโตรเจน
อัตราการไหล (flow rate)	: 40 มล.ต่อนาที
อุณหภูมิของคอลัมน์ (column temperature)	: 180° ซ
อุณหภูมิขณะฉีดสารตัวอย่าง (injection temperature)	: 250° ซ
เครื่องตรวจวัด (detector)	: เฟรมไอออนไนซ์เซชั่น (flame ionization)

เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์มาตรฐานที่มีความเข้มข้นตั้งแต่1.0 ถึง 5.0 กรัมต่อลิตรแทนสารละลายตัวอย่าง ใช้วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับที่กล่าวข้าง

ต้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบหาปริมาณของนอร์มัล พาราฟฟินส์ในสารละลายตัวอย่าง (ภาคผนวกที่ 8)

2.3.5.2 โดยวิธีการวัดปริมาตร[14]

นำสารละลายตัวอย่าง มาปั่นแยกที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นแยก ดูดสารละลายชั้นบน วัดปริมาตร

2.4 การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถเติบโตและผลิตกรดได้โดยใช้นอร์มัลพาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอนบนอาหารแข็ง(agar plate)

2.4.1 คัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถเติบโตบนอาหารแข็งที่มีนอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน

เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนอร์มัลพาราฟฟินส์หรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวกที่ 1.3)ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ(petri dish)เขี่ยเชื้อจากหลอดที่มีอาหารแข็งลาดเอียงลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มล.เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองดังกล่าวปริมาตร 0.1 มล.ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น กระจายเชื้อให้ทั่ว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3-7 วันเชื้อที่สามารถใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ จะสังเกตเห็นโคโลนีของยีสต์เกิดขึ้น

2.4.2 คัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดได้บนอาหารแข็งที่มีนอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน

เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีโบรโมคลีซอลกรีนเป็นอินดิเคเตอร์(ภาคผนวกที่ 1.4)ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ เขี่ยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 2.4.1 จากหลอดที่มีอาหารแข็งลาดเอียงลง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30° ซเป็นเวลา 3-7 วัน สังเกตสีที่เปลี่ยนจากสีน้ำเงินอมฟ้าเป็นสีเหลืองรอบๆ โคโลนีของยีสต์ที่สามารถผลิตกรดได้

2.5 การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.4.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยมีนอร์มัล พาราฟฟินส์ หรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีในข้อ 2.

1.2.3 ตรวจหาการเติบโต และปริมาณของกรดมะนาว โดยวิธีหามวลเซลล์แห้งและวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.1.2 และ 2.3.2 ตามลำดับ คัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้น

2.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ Candida oleophila C-73 ในระดับขวดเขย่า

2.6.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อ

2.6.1.1 ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อ Candida oleophila C-73 ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อตามวิธีในข้อ 2.1.2.2 โดยแปรผันปริมาณ $CaCO_3$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 0.0 0.5 1.0 1.5 และ2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ติดตามการเติบโตของเชื้อตามวิธีในข้อ 2.3.1.1

2.6.1.2 ลักษณะการเขย่า

ใช้ปริมาณที่เหมาะสมของ $CaCO_3$ ที่ศึกษาได้จากข้อ 2.6.1.1 เป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ เปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ Candida oleophila C-73 เมื่อเขย่าให้อากาศแบบวงกลม กับการเขย่าแบบเส้นตรงที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

2.6.1.3 ความเร็วรอบในการเขย่า

ใช้ปริมาณที่เหมาะสมของ $CaCO_3$ และลักษณะการเขย่าที่ศึกษาได้จากข้อ 2.6.1.1 และ 2.6.1.2 ในการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 250 300 รอบต่อนาที

2.6.1.4 อุณหภูมิ

ใช้ปริมาณที่เหมาะสมของ $CaCO_3$ ลักษณะการเขย่า และความเร็วรอบการเขย่าที่ศึกษาได้จากข้อ 2.6.1.1 2.6.1.2 และ 2.6.1.3 ในการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 บ่มที่อุณหภูมิ 25° ซ 30° ซ และ35° ซ

2.6.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว

2.6.2.1 ลักษณะการเขย่า

เตรียมหัวเชื้อของ Candida oleophila C-73 ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว โดยใช้ปริมาณ $CaCO_3$ ที่เหมาะสม ลักษณะการเขย่า ความเร็วรอบการเขย่า และอุณหภูมิที่ศึกษาได้จากข้อ 2.6.1.1 2.6.1.2 2.6.1.3 และ2.6.1.4 ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อดังกล่าวลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวตามวิธีในข้อ 2.1.2.3 เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าแบบวงกลม เปรียบเทียบกับการเขย่าแบบเส้นตรงที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

2.6.2.2 ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวและเขย่าให้อากาศแบบที่ศึกษาจากข้อ 2.6.2.1แปรผันปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 12.5 มล. 25.0 มล. และ 50.0 มล. ในขวดทดลองขนาด 250 มล.

2.6.2.3 อุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยใช้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเขย่าให้อากาศตามที่ศึกษาจากได้จากข้อ 2.6.2.2 แปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเป็น 25° 30° และ 35° ซ.

2.6.3 ชนิดและความเข้มข้นของนอร์มัล พาราฟฟินส์ที่เหมาะสม

แปรผันชนิดและความเข้มข้นของนอร์มัลพาราฟฟินส์ชนิดEXXPAR 25-D EXXPAR 35-D หรือ EXXPAR 451 เท่ากับร้อยละ 4 6 8 10 และ 12 (น้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ส่วนแหล่งอาหารอื่นๆ ใช้ตามสูตรอาหารที่กล่าวไว้ในข้อ 2.1.2.2 เลี้ยงเชื้อโดยใช้ปริมาตรของอาหาร ลักษณะการเขย่า และอุณหภูมิตามที่ศึกษาจากข้อ 2.6.2.1 2.6.2.2 และ 2.6.2.3 หาปริมาณนอร์มัล พาราฟฟินส์ที่เหลืออยู่โดยการใช้กาซโครมาโตกราฟฟี ตามที่กล่าวไว้ในวิธีการทดลองที่ 2.3.5

2.6.4 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้ กลูโคส ซูโครส แป้งที่ย่อยแล้ว (hydrolyzed starch) ฟรุคโตส (fructose) กาแลคโตส (galactose)

มอลโตส (maltose) โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากัน คือ ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ส่วนแป้งละลายน้ำ (soluble starch) น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) หรือนอร์มัล พาราฟฟินส์ จะใช้ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ส่วนแหล่งอาหารอื่นๆ ใช้ตามสูตรอาหารที่กล่าวไว้ในข้อ 2.1.2.2 เลี้ยงเชื้อในสภาวะเดียวกันกับข้อ 2.6.3 หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Bernfeld ตามที่กล่าวไว้ในวิธีการทดลองที่ 2.3.3

2.6.5 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.6.3 และใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆได้แก่แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ คอร์นสตีปลิเคอร์ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้ว(hydrolysate of de fatted soybean meal)โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ให้มีไนโตรเจนทั้งหมดความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 0.03 0.07 0.10 0.14 และ0.20(น้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เลี้ยงเชื้อในสภาวะเดียวกันกับข้อ 2.6.3 โดยหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธีของ Kjeldahl ตามที่กล่าวไว้ในวิธีการทดลองที่ 2.3.4

2.6.6 ความเข้มข้นของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสม

ใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์ และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 2.6.3 และ 2.6.5 สำหรับเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 แปรผันความเข้มข้นของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับร้อยละ 0.005 0.01 0.05 0.10 0.15 และ 0.20(น้ำหนักต่อปริมาตร)

2.6.7 ความเข้มข้นของแมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตที่เหมาะสม

ใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์ แหล่งไนโตรเจนและโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 2.6.3 2.6.5 และ 2.6.6 สำหรับเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 แปรผันความเข้มข้นของแมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเท่ากับร้อยละ 0.0-0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2.6.8 องค์ประกอบอื่นๆของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.6.8.1 อิออนของโลหะบางชนิด

ใช้สูตรอาหาร และสภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับข้อ 2.6.7 สำหรับการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 ศึกษาผลของการเติมอิออนของโลหะบางชนิดได้แก่ Fe^{2+} Zn^{2+} Mn^{2+} และ Cu^{2+} ในรูปของ $FeSO_4.7H_2O$ $ZnSO_4.7H_2O$ $MnSO_4.H_2O$ และ $CuSO_4.5H_2O$ ตามลำดับ แปรผันความเข้มข้นของโลหะครั้งละชนิดโดยแปรผันโลหะ 3 ชนิดแรกตั้งแต่ร้อยละ0.0-0.04(น้ำหนักต่อปริมาตร) และแปรผันความเข้มข้นของ $CuSO_4.5H_2O$ ตั้งแต่ร้อยละ 0.0-0.0025 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของโลหะแต่ละชนิด เพื่อนำมาศึกษาถึงผลของโลหะเมื่อนำมาเติมรวมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.6.8.2 ผลของสารที่ช่วยเสริมการเติบโต

ใช้สูตรอาหาร และสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 2.6.8.1 สำหรับเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 ศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือผลของไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001(น้ำหนักต่อปริมาตร)แล้วจึงแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เท่ากับร้อยละ 0.01 0.05 0.1 0.15 และ 0.20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือแปรผันความเข้มข้นของไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์เท่ากับร้อยละ 0.0001 0.0005 0.001 0.002 และ 0.01 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับการใช้คอร์นสตรีปลิเคอร์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 0.1 0.15 0.2 และ 0.3 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2.6.8.3 ผลของแคลเซียมคาร์บอเนต

ใช้สูตรอาหาร และสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 2.6.8.2 สำหรับการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 แปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตเท่ากับร้อยละ 0 8 10 12 และ 14(น้ำหนักต่อปริมาตร)

2.6.9 การเติมสารพิเศษบางชนิด

2.6.9.1 สารลดแรงตึงผิว(surfactant)

ใช้สูตรอาหาร และสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 2.6.8.3 สำหรับการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 ศึกษาถึงผลของการเติมสารลดแรงตึงผิว 3 ชนิด คือ Tween 80 Triton X-100 และ Corexit 7664 โดยแปรผันความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดเท่ากับร้อยละ 0.001 0.00 0.01 0.015 และ 0.02 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2.6.9.2 สารแยกการควบคู่(uncoupling agent)

ใช้สูตรอาหาร และสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 2.6.9.1 สำหรับการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 ศึกษาถึงผลของการเติม 2,4-ไดไนโตรฟีนอล ความเข้มข้นร้อยละ 5.0×10^{-4} 1.0×10^{-3} และ 2.0×10^{-3} (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการเลี้ยงเชื้อนาน 0 12 24 และ 36 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย