บทที่ 2

วิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psycrotherm incubator shaker)	G-27	บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องปั่นแยก (centrifuge)	J-21C	บริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	Spectronic-20D	บริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave)	HA-30	บริษัท Hirayama Manufacturing ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องผสม (vortex Mixer)	Vortex-Genie 2	บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH Meter)	pH-M 83	บริษัท Radiometer ประเทศเดนมาร์ก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
ตู้อบ (oven)	B-80	บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
กระดาษกรอง	GF/C	บริษัท Whatman Internation ประเทศอังกฤษ
Haemacytometer	Improve Neubauer	บริษัท Boeco ประเทศเยอรมัน
Vernier calipper	-	บริษัท Mitutoyo ประเทศญี่ปุ่น

2. สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
ไซเตียมอัลจิเนต	Sigma Chemicals
แคปปา-คาร์ราจิแนน	Sigma Chemicals
เจลลาติน	BDH Chemical
แคลเซียมคลอไรด์	E.Merck Damstadt
โปตัสเซียมคลอไรด์	E.Merck Damstadt
แคลเซียมคาร์บอเนต	Fluka
เฮปเทน	Mallinkordt
โปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต	Farmitalia Carloerba
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	E.Merck Damstadt
แอมโมเนียมคลอไรด์	May & Baker

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
กลูโคส	Fluka
สารสกัดจากยีสต์	E.Merck Damstadt
สารสกัดจากมอลต์	Difco
เปปโตน	Difco
วุ้นผง (agar)	Difco
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	BDH Chemicals
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4.H_2O$)	E.Merck Damstadt
โปตัสเซียมโบร์ไมด์ (KBr)	Farmitalia Carloerba
ซิตริคโมโนไฮเดรต	Sigma Chemicals
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	E.Merck Damstadt
โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เตรท	E.Merck Damstsdt
โซเดียมเตตระโบเรต (Sodium tetraborate)	BDH Chemicals
ไทโอยูเรีย (thiourea)	BDH Chemicals
โซเดียมเฮคซะเมตาฟอสเฟต	May & Baker

เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อ

1. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นยีสต์ สายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 ซึ่งได้ผ่านการคัดเลือกแล้วจากการวิจัยของเรวดี เลิศไตรรักษ์ (2535)

2. การเก็บรักษาเชื้อยีสต์

ถ่ายเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ แล้วลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งลาดเอียง (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเติบโตดีแล้ว จึงนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 เพื่อการเจริญเติบโต

3.1 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อยีสต์

เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็งลาดเอียง (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทำเซลล์แขวนลอยด้วยน้ำกลั่นที่ฝ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตรหลอดละ 5.0 มิลลิลิตร

3.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโต

ปิเปตเซลล์แขวนลอยของเชื้อยีสต์ซึ่งเตรียมได้ในข้อ 3.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับการเจริญเติบโตปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

4. การเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว ในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร

เลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก) โดยเชื้อเริ่มต้น 0.4 กรัม (น้ำหนักเซลล์แห้ง)ต่อลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นอกจากจะระบุเป็นอย่างอื่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์</u>

จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 เพื่อการเจริญเติบโต นำมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นแยก ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง เก็บเซลล์ไว้ทำการตรึงเซลล์ต่อไป

1. <u>การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต</u> (Kautola et al.,1991)

ผสมเซลล์ยีสต์ 1.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง กับสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 25 มิลลิลิตร หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ กวนเบา ๆ ตลอดเวลาแช่ต่อไปอีก 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์ตรึงด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นอกจากจะระบุเป็นอย่างอื่น

2. <u>การตรึงเซลล์ด้วยแคปปา-คาร์ราจิแนน</u> (Kautola et al.,1991)

ผสมเซลล์ยีสต์ 1.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง กับสารละลายแคปปา-คาร์ราจิแนนความเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หยดลงในสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส กวนเบา ๆ ตลอดเวลา แช่ต่อไปอีก 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์ตรึงด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.3 <u>การตรึงเซลล์ด้วยเจลลาติน</u> (Scardi,1987)

ผสมเซลล์ยีสต์ 1.0 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง กับสารละลายเจลลาตินความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 20 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในเอธานอล 50 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเทลงในจานเพาะเชื้อเก็บที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5 x 0.5 x 0.5 เซนติเมตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิเคราะห์

1. การละลายเกลือแคลเซียมในน้ำหมัก (Nakanishi et al.,1972)

เติมกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 2 โมลาร์ลงในน้ำหมัก จนเกลือแคลเซียมละลายหมด ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นและมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2.0

2. การวัดการเจริญของเชื้อยีสต์ โดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

หลังจากละลายเกลือแคลเซียมในน้ำหมักแล้ว นำน้ำหมักที่ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปผ่านกระดาษกรอง Whatman แบบ GF/C ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ด้วยเครื่องสูบสูญญากาศ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำเซลล์ที่ได้บนกระดาษกรองไปอบด้วยเครื่องไมโครเวฟ ด้วยความร้อนระดับดีฟรอสเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายที่ได้จากการกรองเอาเซลล์ออกแล้ว นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือต่อไป

3. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว โดยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน (Pentabromoacetone Method) (Stern,1957)

3.1 การเปลี่ยนกรดมะนาวเป็นเพนตะโบรโมอะซิโตน

ปิเปตสารละลายที่ได้จากการกรองเอาเซลล์ออกไปแล้ว และผ่านการทำให้เจือจางให้เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาเกลียว เติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโปแตสเซียมโบร์ไมด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ลงไป 5 หยด เติมสารละลายโปแตสเซียมเปอร์มังกาเนตความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไป 10 หยด ทันที เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

3.2 การสกัดเพนตะโบรโมอะซิโตนด้วยเฮปเทน

นำหลอดทดลองที่เปลี่ยนกรดมะนาวเป็นเพนตะโบรโมอะซิโตนแล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 6 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในหลอดทดลองจนสารละลายใส ปิเปตเฮปเทนปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ปิดฝาให้สนิท สกัดโดยใช้เครื่องผสมนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

3.3 การสกัดด้วยไทโอยูเรีย

ปิเปตส่วนบน (ชั้นเฮปเทน) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียวที่มีสารละลายไทโอยูเรีย (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท สกัดโดยใช้เครื่องผสมนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น นำสารละลายชั้นล่าง (ชั้นไทโอยูเรีย) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ใช้สารละลายไทโอยูเรียเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณกรดมะนาวจากกราฟมาตรฐานของกรดมะนาว ในช่วงความเข้มข้น 0.0-0.1 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Bernfeld, 1957)

ปิเปตสารละลายที่ได้จากการกรองเอาเซลล์ออกไปแล้ว และที่ผ่านการเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิคปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด นาน 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.5 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค)

5. ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง