บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องชั่ง รุ่น PG 2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG 285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
3. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25, บริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
4. ตู้เขี่ยเชื้อ ISSCO รุ่น BV-124, บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120 S บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
5. เครื่องเขย่า รุ่น innova 2300 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA
6. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น innova 4330 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
7. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, Germany
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก รุ่น Mikro 20 บริษัท Hettich Zentrifugen, Germany
10. เครื่องกวนแม่เหล็ก รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, USA
11. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง รุ่น Soronex RK 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
12. เครื่องผสมสาร รุ่น Vortex-Genies 2 G-560E บริษัท Scientific Industries, Inc., USA
13. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA และรุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA

14. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan
15. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB14 รุ่น W760 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany และชนิดที่ประกอบเข้ากับเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan
16. เครื่องทำความเย็น รุ่น CCA-1110 บริษัท Eyela, Japan
17. เครื่องดูดอากาศ รุ่น A3-S บริษัท Eyela, Japan
18. อ่างน้ำเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Gyromax SK 939XL บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA และรุ่น GFL 1086 บริษัท Gesellschaft für Labortechnik Co., Ltd., Germany
19. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็งต่ำ -20°ซ บริษัท Sanyo Electric, Japan
20. ตู้บ่มเชื้อ รุ่น INE 500 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
21. ตู้อบความร้อน รุ่น UE 600 และรุ่น UL 80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
22. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
23. ฮีมาไซโทมิเตอร์ บริษัท Schott Duran, Germany
24. หัวกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดความกว้างของรูกรอง 0.20 ไมครอน รุ่น SF-W13 บริษัท Gat Asia, Ltd., Hong Kong
25. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มล. บริษัท Nissho Nipro, Japan
26. ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) สำหรับตรวจสอบปริมาณและชนิดของน้ำตาล
    - ลิควิดโครมาโทกราฟี รุ่น 515 บริษัท Water, Australia.
    - คอลัมน์ชนิดคาร์โบไฮเดรตคอลัมน์ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร บริษัท Water, Australia
    - เครื่องตรวจสอบ รุ่น 410 บริษัท Water, Australia
    - เครื่องบันทึก รุ่น 746 ของบริษัท Water, Australia.
    - กระบอกฉีดยา ขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น EXMSR 100 บริษัท ITO Corporation, Japan.

เคมีภัณฑ์

1. เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม บริษัท Sigma Chemical Co., USA
2. เดกซ์แทรน ที-2000 บริษัท Amersham Biosciences, Sweden
3. ทริปโตน บริษัท Becton Dickinson Company, USA
4. ยีสต์สกัด บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland

5. เบรนฮาร์ทอินฟิวชัน บริษัท Difco Laboratories, USA
6. ซูโครส บริษัท Sigma Chemical Co., USA
7. มอลโทส บริษัท Difco Laboratories, USA
8. ไอโซมอลโทส บริษัท Sigma Chemical Co., USA
9. ไอโซมอลโทไทรโอส บริษัท Fluka Chemie, Germany
10. ไอโซมอลโทเททราโอส บริษัท Fluka Chemie, Germany
11. เมทิลแอลฟาดีแมนโนไพราโนไซด์ (methyl-α-D-mannopyranoside) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
12. โบไวน์ซีรัมแอลบูมิน บริษัท Sigma Chemical Co.,USA
13. โซเดียมไนเตรต บริษัท Carlo Erba Reagents, Italy
14. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
15. โพแทสเซียมคลอไรด์ บริษัท Merck, Germany
16. แมกนีเซียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
17. เฟอร์รัสซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
18. โพแทสเซียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
19. ซีลีเนียม บริษัท Fluka Chemie, Germany
20. เมทิลเรด บริษัท Merck, Germany
21. โบรโมครีซอลกรีน บริษัท Fluka Chemie, Germany
22. กรดบอริก บริษัท Merck, Germany
23. แอมโมเนียมคลอไรด์ บริษัท Ajax Chemicals, Australia
24. แอมโมเนียมไนเตรต บริษัท Mallinckrodt Baker, Inc., USA
25. แอมโมเนียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
26. แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท May&Baker, Ltd., England
27. ทวีน-80 บริษัท Merck, Germany
28. กลีเซอรอล บริษัท Merck, Germany
29. โซเดียมคลอไรด์ บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy
30. กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck, Germany
31. โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck, Germany
32. โซเดียมอะซิเตต บริษัท Merck, Germany

33. กรดอะซิติก บริษัท Merck, Germany
34. ไกลซีน บริษัท Merck, Germany
35. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
36. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
37. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต บริษัท Merck, Germany
38. คอปเปอร์ซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
39. โซเดียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
40. แอมโมเนียมโมลิบเดต บริษัท Merck, Germany
41. กรดซัลฟูริก บริษัท Merck, Germany
42. โซเดียมอาร์ซิเนต บริษัท Ajax Chemicals, Australia
43. โซเดียมคาร์บอเนต บริษัท Merck, Germany
44. สารละลายโฟลิน ฟีนอล รีเอเจนต์ บริษัท Merck, Germany
45. เมทานอล บริษัท Merck, Germany
46. เอทานอล บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland
47. กรดไตรคลอโรอะซิติก บริษัท Merck, Germany
48. อะซิโตไนไทรล์เกรด HPLC บริษัท Merck, Germany
49. อินเวอร์เทส บริษัท Sigma Chemical Co., USA
50. นอร์มัลเฮกเซน บริษัท Merck, Germany

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บและการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1.1 แบคทีเรีย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่ได้รับจาก Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรน (บุญส่ง แสงอ่อน, 2527)

3.1.1.2 รา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เป็นเชื้อที่ทำให้กลายพันธุ์โดย สุวรรณา นพพรพันธุ์ (2538) จากรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่คัดแยกโดย เอก แสงวิเชียร (2531) มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

3.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.2.1 การเก็บเชื้อ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°ซ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนที่ดัดแปลงจาก บุญส่ง แสงอ่อน (2527) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการกระตุ้นการเจริญของเชื้อ จากนั้นขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงทริปโตนซนิดเดียวกับข้างต้น (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ จนเชื้อแบคทีเรียเจริญเต็มที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้ และถ่ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงใหม่ทุกๆ 30 วัน

3.1.2.2 การเก็บเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14

เขี่ยสปอร์ของรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงตามสูตรที่ปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ (1971) ที่มีเดกซ์แทรนความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จนสปอร์เจริญเต็มที่ เก็บไว้ที่ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

3.2 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงจากข้อ 3.1.2.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนที่มีซูโครสความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นถ่ายเชื้อ 10%

โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตน ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในเคลตต์ฟลาสก์ (klett flask) ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.4-0.5 ซึ่งนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการวิจัยต่อไป

3.3 การศึกษารูปแบบการเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อข้างต้นปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนที่มีซูโครสความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในเคลตต์ฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ทุกๆ 2 ชม. จนครบ 24 ชม. นำน้ำหมักเลี้ยงเชื้อที่ได้มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ด้วยการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ (total plate count) แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรน โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงด้วยวิธีของ Lowry (1951) จากนั้นสร้างกราฟแสดงรูปแบบการเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยจะคัดเลือกกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (mid-log phase) เพื่อนำไปใช้ในการวิจัยต่อไป

3.4 การคัดเลือกปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนที่มีซูโครสความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. โดยแปรผันปริมาณกล้าเชื้อตั้งแต่ 5-15% โดยปริมาตร (5, 10 และ 15% โดยปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชม. ตั้งแต่ 0-10 ชม. นำน้ำหมักเลี้ยงเชื้อที่ได้มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ด้วยการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณ

เดกซ์แทรนโดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (1951) ต่อไป

3.5 การคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

3.5.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อ ที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ตามปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนโดยแปรแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ ซูโครส กากน้ำตาล และน้ำอ้อย ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีการปรับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเป็น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเท่ากัน โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดด้วยอินเวอร์เทส โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson (1952) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชม. ตั้งแต่ 0-10 ชม. นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดมาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนโดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (1951) ต่อไป

3.5.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อ ที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ตามปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนที่คัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนได้จากข้อ 3.5.1 โดยแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนตั้งแต่ 0-10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชม. ตั้งแต่ 0-10 ชม. นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนในปริมาณต่างๆ มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะ

เชื้อ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรน โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ และชั่งหาน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (1951) ต่อไป

3.5.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อ ที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ตามปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนที่คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนได้จากข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ทั้งไนโตรเจนอินทรีย์ (ยีสต์สกัด กากถั่วเหลือง และกากถั่วลิสง (โดยใช้กากถั่วเหลืองและกากถั่วลิสงที่ผ่านการสกัดไขมันออกด้วยนอร์มัลเฮกเซนซ้ำ 4 ครั้ง)) และไนโตรเจนอนินทรีย์ (NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $(NH_4)_2HPO_4$) โดยปรับปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเป็น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเท่ากัน โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl ตามวิธีของ A.O.A.C. (1975) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชม. ตั้งแต่ 0-10 ชม. นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนโดยวิธีการตกตะกอนด้วย เอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (1951) ต่อไป

3.5.4 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อ ที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ตามปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนที่คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนได้จากข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ และในการทดลองนี้ใช้ยีสต์สกัดเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันปริมาณของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0-1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชม. ตั้งแต่ 0-10 ชม. นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่ง

ไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรน โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (1951) ต่อไป

3.6 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

3.6.1 ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อ ที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ตามปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนที่คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนได้จากข้อ 3.5 แปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 4.0-8.0 (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชม. ตั้งแต่ 0-10 ชม. นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ด้วยการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนโดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (1951) ต่อไป

3.6.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อ ที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ตามปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนที่คัดเลือกค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นได้จากข้อ 3.6.1 ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. โดยบ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 25-50°ซ (25, 30, 35, 40, 45 และ 50°ซ) บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชม. ตั้งแต่ 0-10 ชม. นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ แล้วนำมาปั่น

เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนโดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (1951) ต่อไป

3.6.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อ ที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ตามปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนที่คัดเลือกค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นได้จากข้อ 3.6.1 ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบตั้งแต่ 0-250 รอบต่อนาที (0, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที) เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชม. ตั้งแต่ 0-10 ชม. นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ด้วยการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนโดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (1951) ต่อไป

3.7 ปริมาณแหล่งวิตามินที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อ ที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณตามปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่คัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนได้จากข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ และที่คัดเลือกแหล่งไนโตรเจนได้จากข้อ 3.5.3 โดยใช้ปริมาณแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเท่ากัน และแปรผันปริมาณยีสต์สกัดตั้งแต่ 0-1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ยีสต์สกัดเพื่อเป็นแหล่งวิตามินให้แก่จุลินทรีย์ (0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชม. ตั้งแต่ 0-10 ชม. นำน้ำหมักที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์สกัดในปริมาณต่างๆ มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ

ส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนโดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (1951) ต่อไป

3.8 การวิเคราะห์การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยการนับจำนวนเซลล์มีชีวิตที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ

นำน้ำหมักของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ภาคผนวก ข) จากนั้นจึงทำการกระจายเชื้อที่ผ่านการเจือจางแล้วลงบนผิวหน้าของอาหารแข็งเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชม. ทำการนับโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าของอาหารแข็ง และรายงานในหน่วยของ colony forming unit (CFU/มิลลิลิตร)

3.9 การเตรียมและแยกเดกซ์แทรนจากน้ำเลี้ยงของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ (ดัดแปลงจากวิธีของ Koepsell และคณะ, 1952 และ Nicholson และ Horsley, 1959)

นำน้ำหมักจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนของเซลล์ออก นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% โดยปริมาตร ปริมาณ 3 เท่าของปริมาตรของส่วนน้ำใส ร่วมกับกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ข) ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรรวมทั้งหมด เพื่อเป็นการกำจัดส่วนของโปรตีน ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน (18-24 ชม.) ที่อุณหภูมิ 4°ซ จากนั้นจึงนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบและเวลาที่เท่ากัน แล้วนำส่วนของตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เพื่อช่วยในการละลายและทำลายเซลล์แบคทีเรียที่ปะปนมา ตกตะกอนซ้ำด้วยวิธีเดิม และนำตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°ซ เป็นเวลา 18 ชม. ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (desiccator) แล้วจึงชั่งหาน้ำหนักแห้งและเก็บรวบรวมเดกซ์แทรนที่ได้ เพื่อใช้เป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสในการทดลองต่อไป

3.10 การผลิตเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ในปริมาณสูงเพื่อใช้เป็นสารชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ถ่ายกล้าเชื้อ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่มีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ตามปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5 และเลี้ยงในภาวะที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6 เป็นเวลา 10 ชม. นำน้ำหมักมาผ่านการแยกเดกซ์แทรนโดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ดังวิธีในข้อ 3.8 จากนั้นนำเดกซ์แทรนที่ผลิตได้เก็บในขวดปิดฝาที่แห้งสนิทเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.11 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ

เติมทวีน-80 ความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ภาคผนวก ข) ลงในหลอดเก็บเชื้อราจากข้อ 3.1.2.2 ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาแขวนลอยในทวีน-80 นับสปอร์และคำนวณให้ได้ปริมาณ $2x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโทมิเตอร์ (haemacytometer) ถ่ายสปอร์แขวนลอย 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงโดยศิโรจน์ ศรีสรากรณ์ (2547) โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 (จากข้อ 3.9) เป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนส โดยปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4.5 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มล.ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนน้ำใสที่ใช้เดกซ์แทรนแต่ละชนิดมาวิเคราะห์แอคติวิตีและปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Somogyi (1952) และ Lowry (1951) ตามลำดับ จากนั้นคำนวณแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสทั้ง 2 ชนิด

3.12 การตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส โดยทำตามวิธีของ Fukumoto และคณะ (1971) ดังนี้ นำสารละลายเดกซ์แทรนที่-2000 ความเข้มข้น 0.625% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 4.5 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.4 มล. และสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 4.5 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเดกซ์แทรนเนสจากข้อ 3.10 ที่ผ่านการกรองแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 0.1 มล. แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 15 นาที นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาโดยวิธีของ Somogyi (1952)

1 หน่วย (unit) ของเดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรนที่-2000 และปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

3.13 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi (Somogyi, 1952)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 1 มล. เติมสารละลายแอลคาไลคอปเปอร์ (alkali copper reagent) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มล. นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วเติมสารละลายเนลสัน (Nelson reagent) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำปลอดประจุ 5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.14 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มล. เติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข) ปริมาณ 5 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที จึงเติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่า

ปริมาณโปรตีน จากกราฟมาตรฐานที่ใช้โบไวน์ซีรัมแอลบูมิน (BSA) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.15 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากซูโครสของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด โดยการย่อยสลายด้วยอินเวอร์เทส เพื่อปรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากซูโครสของแต่ละแหล่งคาร์บอนให้เท่ากัน

จากคุณสมบัติของอินเวอร์เทสในการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสไปเป็นกลูโคสและฟรักโทส ซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่สามารถวิเคราะห์ได้โดยวิธีของ Somogyi (1952) ดังนั้นจึงนำแหล่งคาร์บอนตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด คือ ซูโครส น้ำอ้อย และกากน้ำตาล มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากซูโครส โดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 0.5 มล. เติมสารละลายอินเวอร์เทสในอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดเบส 4.5 (ภาคผนวก ข) ปริมาณ 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นจึงวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีของ Somogyi (Somogyi, 1952) ตามวิธีในข้อ 3.13 โดยเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารละลายอินเวอร์เทส และทำการคำนวณเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากซูโครสเป็น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเท่ากัน

3.16 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์แต่ละชนิดโดยวิธี Kjeldahl ตามวิธีของ A.O.A.C. (1975) เพื่อปรับปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นของแต่ละแหล่งไนโตรเจนให้เท่ากัน

เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด คือ ยีสต์สกัด กากถั่วเหลือง และกากถั่วลิสง มีส่วนประกอบที่เป็นหน่วยย่อยของกรดอะมิโนอยู่มากมายและมีปริมาณที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงปรับให้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์แต่ละชนิดมีปริมาณธาตุไนโตรเจนอิสระเริ่มต้นเท่ากัน โดยนำตัวอย่างไนโตรเจนอินทรีย์แต่ละชนิดที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณ 1.0 กรัม ผสมเข้ากับของผสมเร่งปฏิกิริยา (catalyst mixture) (ภาคผนวก ข) ปริมาณ 1.0 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยตัวอย่าง (kjeldahl tube) และค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 10.0-15.0 มล. ตามลงไป แล้วจึงนำเข้าสู่เตาย่อยตัวอย่างโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 380-400°ซ จนกระทั่งสารตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมฟ้า และไม่มีควันของกรดซัลฟูริก ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 ชม. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยมาทำการกลั่นต่อไป โดยเติมน้ำกลั่นลงไปใน

ตัวอย่างประมาณ 50 มล. เพื่อเป็นการละลายตะกอน และนำตัวอย่างใส่ลงไปในขวดกลั่น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 40% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ข) ปริมาณ 90 มล. และเติมสารละลายกรดบอริกผสมอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 25 มล. ลงในขวดที่รองรับสารจากการกลั่น จากนั้นประกอบเข้ากับชุดกลั่น ทำการกลั่นจนกระทั่งได้สารละลายปริมาตรรวมเป็น 75-100 มล. โดยสารละลายที่ได้จะเป็นสีเขียว และขั้นตอนสุดท้ายคือการนำสารละลายที่ผ่านการกลั่นมาไทเทรตด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวกลายเป็นสีม่วงแดง ซึ่งในขั้นตอนนี้จะทราบปริมาตรที่แน่นอนของกรดซัลฟูริกที่ได้จากการไทเทรต จากนั้นจึงนำมาคำนวณปริมาณธาตุไนโตรเจนอิสระต่อไป

3.17 การสกัดไขมันในส่วนของกากถั่วเหลืองและกากถั่วลิสง ด้วยตัวทำละลายนอร์มัลเฮกเซน (Sun และ Puri, 1997)

นำตะกอนเดกซ์แทรนที่ต้องการวิเคราะห์ใส่ลงในขวดแก้ว เติมตัวทำละลายนอร์มัลเฮกเซนปริมาตร 2 เท่าของน้ำหนักตะกอนที่ต้องการวิเคราะห์ นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำส่วนน้ำที่ผ่านการสกัดใส่ในขวดระเหยที่ทราบน้ำหนักคงที่แล้ว ไปทำการระเหยด้วยชุดเครื่องมือระเหยแบบสุญญากาศ แล้วจึงทำการชั่งหาน้ำหนักแห้งเพื่อนำไปคำนวณปริมาณไขมันที่สกัดได้จากส่วนของกากถั่วเหลืองและกากถั่วลิสงต่อไป

3.18 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

3.18.1 ตรวจสอบจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยกรดซัลฟูริก

นำเดกซ์แทรนที่ผลิตได้จากข้อ 3.10 ปริมาณ 50 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนำไปบ่มในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 120°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองส่วนน้ำใสผ่านแผ่นกรองที่มีขนาด 0.45 ไมครอน เติมสารละลาย

มาตรฐานภายใน (internal standard) เมทิล-แอลฟา-ดี-แมนโนไพราโนไซด์ความเข้มข้น 12.5% (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ต่อสารตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี เลือกใช้คอลัมน์คาร์โบไฮเดรต ชนิดอะมิโนโพรพิล (aminopropyl) ขนาด 4.6x250 มิลลิเมตร ตั้งอุณหภูมิสารละลายตัวพา 30°ซ ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์เข้มข้น 70% โดยปริมาตร (ภาคผนวก ข) เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิดของน้ำตาลปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารมาตรฐาน ได้จากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์

3.18.2 ตรวจสอบจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14

นำเดกซ์แทรนที่ผลิตได้จากข้อ 3.10 ปริมาณ 250 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยใช้ซับสเตรต 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในการทำปฏิกิริยา บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยา โดยเติมเดกซ์แทรนเนส 3 ครั้ง ที่เวลา 0, 1 และ 2 ชม. จนกระทั่งครบ 3 ชม. ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองส่วนน้ำใสผ่านแผ่นกรองที่มีขนาด 0.45 ไมครอน เติมสารละลายมาตรฐานภายใน แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาล ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีเช่นเดียวกับข้อ 3.18.1

3.19 การศึกษาสมบัติของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด จากการใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ

3.19.1 ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ

วิเคราะห์แอคติวิตีของของเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิด ตามวิธีการวิจัยในข้อ 3.12 และ 3.13 ในสารผสมของปฏิกิริยาที่แปรผันความเป็นกรดเบสในช่วงต่างๆ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ของไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดเบส 2.5-3.5 โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดเบส 3.5-6.0 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดเบส 6.0-7.0 (ภาคผนวก ข)

เปรียบเทียบช่วงความเป็นกรดเบสที่เดกซ์แทรนเนสทั้ง 2 ชนิดแสดงแอคติวิตี โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ กับค่าความเป็นกรดเบสของสารผสมปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีสูงสุดของแต่ละการทดลอง)

3.19.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ

วิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิด ตามวิธีการวิจัยในข้อ 3.12 และ 3.13 ในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมจากข้อ 3.19.1 โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มปฏิกิริยาที่ 35, 40, 45, 50, 60, 65 และ 70°ซ ตามลำดับ

เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เดกซ์แทรนเนสทั้ง 2 ชนิดแสดงแอคติวิตี โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มสารผสมปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีสูงสุดของแต่ละการทดลอง)

3.19.3 ความเสถียรต่อความเป็นกรดเบสของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารซักนำ

บ่มเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิด ในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีความเป็นกรดเบสในช่วงต่างๆ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ของไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ในช่วงความเป็นกรดเบส 2.5-3.5 โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ในช่วงความเป็นกรดเบส 3.5-6.0 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดเบส 6.0-7.0 ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดแอคติวิตีภายใต้ภาวะที่เหมาะสมตามวิธีการวิจัยในข้อ 3.12 และ 3.13 จากนั้นเปรียบเทียบช่วงความเป็นกรดเบสที่เดกซ์แทรนเนสทั้ง 2 ชนิดแสดงแอคติวิตี โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับค่าความเป็นกรดเบสของสารผสมปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ไม่ได้บ่ม)

3.19.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารซักนำ

บ่มเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิดในสารผสมของปฏิกิริยา ที่มีความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมจากข้อ 3.19.1 ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70°ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดแอคติวิตีภายใต้ภาวะที่เหมาะสมตามวิธีการวิจัยในข้อ 3.12 และ 3.13

เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เดกซ์แทรนเนสทั้ง 2 ชนิดแสดงแอคติวิตี โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับอุณหภูมิที่ใช้บ่มเดกซ์แทรนเนส (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100%คิดเทียบจากแอคติวิตีของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ไม่ได้บ่ม)

3.19.5 การหาค่าคงที่มิเคลลิส (K_m) ของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยการซักนำด้วย เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ต่อเดกซ์แทรนที-2000

บ่มเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิดในสารผสมของปฏิกิริยา ที่มีความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมจากข้อ 3.19.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนที-2000 ตั้งแต่ 0.15625-2.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25 และ 2.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่

อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.19.2 เป็นเวลา 15 นาที วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการวิจัยในข้อ 3.13 นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟในรูปแบบของไลน์-วิเวอร์เบิร์กระหว่าง 1/ความเร็ว และ 1/[ซับสเตรต] หาจุดตัดแกน X นำค่าไปคำนวณเพื่อหาค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสต่อเดกซ์แทรนที่-2000

3.19.6 การเปรียบเทียบความสามารถของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยการชักนำด้วย เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ในการย่อยสลายซับสเตรตเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ

บ่มเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิดที่มีแอคติวิตีจากการคำนวณปริมาณ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรลงในสารผสมของปฏิกิริยา ที่มีค่าความเป็นกรดเบสและอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.19.1 และ 3.19.2 ตามลำดับ โดยใช้ซับสเตรตเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ ได้แก่ เดกซ์แทรนที่-2000 เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ความเข้มข้น 0.625% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการวิจัยในข้อ 3.13 แล้วเปรียบเทียบความสามารถเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิด