บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) Laboratory Hot Plate PC-101, Corning Glass Works, Corning, NY ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries,Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic-21 ของบริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา และ UV-160 ของบริษัท Shimadzu Corporation, Kyoto ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องกำเนิดคลื่นอัลทราโซนิกส์ (sonicator) ยี่ห้อ Delta รุ่น Ultrasonic Cleaner D 200 บริษัท D.S.C group ประเทศไทย

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (phychrotherm rotary incubator shaker) รุ่น Model G 25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.,Inc. Edison, New Jersey ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องหมุนเหวี่ยง (ultracentrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota Corporationประเทศญี่ปุ่น

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น TE-8D ยี่ห้อ Tempette ของบริษัท Techne ประเทศอังกฤษ

ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น NE-7670 ยี่ห้อ National ของบริษัท Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี รุ่น LC-8A ชุดควบคุมระบบ SLC-8A และเครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-26 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น และรุ่น KT -30SD ของบริษัท ALP Co., Ltd, Tokyo ประเทศญี่ปุ่น

หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร TUV 15W/G15 T8 ของบริษัท Philips ประเทศฮอลแลนด์

เครื่องอบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (hot air oven) รุ่น 94789 ของบริษัท Contherm Scientific Ltd., ประเทศนิวซีแลนด์

ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น MTR 152 ของบริษัท Sanyo Electric Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องอบสุญญากาศ (vacuum drying oven) รุ่น DP 41 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 501 ของบริษัท Sentron ประเทศญี่ปุ่น และมาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH combination electrode) สำหรับถังหมัก ขนาด 5 ลิตร รุ่น D-26 ของบริษัท TOA Electronics Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300 5L ใบพัดแบบ 6 ใบ (6 blade turbine) เครื่องควบคุมภาวะ (bioprocess controller) รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องอัดอากาศ (air compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องควบคุมระบบหล่อเย็น (circulation type handy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรดซัลฟิวริก	บริษัทรวมเคมี	ประเทศไทย
ไนโทรซาลิไซลิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดทาร์ทาริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดมะนาวปราศจากน้ำ	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไอโซซิทริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดฟอสฟอริก	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
กรดไฮโดรคลอริก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แคลเซียมคาร์บอเนต	ศิลาทิพย์	ประเทศไทย

สารเคมี		บริษัทผู้ผลิต
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมเททระบอเรต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	CARLO ERRA	ประเทศอิตาลี
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	บริษัทรวมเคมี	ประเทศไทย
แอมโมเนียมซัลเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
ไทโอยูเรีย	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	บริษัทรวมเคมี	ประเทศไทย
โพแทสเซียมโบรไมด์	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
เมทานอล	J.T.BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ประเทศไทย
เอทานอล	กรมสรรพสามิต	ประเทศไทย
ออร์โท-ไดอะนิซีดีน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอนไซม์ พี.จี.โอ.	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เฟร์ริกคลอไรด์	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
เฮปเทน	MALLINCKRODT	ประเทศสหรัฐอเมริกา

หมายเหตุ IBGE หมายถึง The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ตั้งต้นสำหรับการคัดเลือกเพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว *Bacillus subtilis* ATCC 21610 , *Bacillus licheniformis* ATCC 21667 , *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 , *Achromobacter nucleoacidoves* ATCC 21683 , *Corynebacterium fescians* ATCC 21684 จาก American Type Culture Collection

2.3 การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อ

2.3.1 การเก็บรักษาเชื้อ

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop)ที่ปราศจากเชื้อ เขี่ยเชื้อ แล้วลาก (streak) เชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) Brain Heart infusion (BHI) (ภาคผนวก ก 1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อในตู้เซ่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

2.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ปราศจากเชื้อ เขี่ยเชื้อจากข้อ 2.3.1 ลากลงบนผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียง BM สูตรที่ปรับปรุง(ภาคผนวก ก 1.8) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นปิเปตต์น้ำที่ขจัดไอออน (deionized water) และปราศจากเชื้อแล้วปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อให้กระจายในน้ำ จากนั้นปิเปตต์เซลล์แขวนลอยที่ได้ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวสูตร BM (ภาคผนวก ก 1.7) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในตู้เขย่าแบบวงกลม ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เชื้อจะเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid-log phase) ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.65

2.3.2.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า

ปิเปตต์หัวเชื้อตั้งต้นที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.3.2.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร)) ลงสู่อาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดมะนาวสูตร BM ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก 2.2) ปริมาตร 25 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยเริ่มต้น 1.12-1.18 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าแบบวงกลมที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

2.3.2.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 2.3.2.1 ปริมาณ 300 มิลลิลิตรลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BM ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก 2.2)ปริมาตรเริ่มต้น 2.7 ลิตรซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นประมาณ1.16 กรัมต่อลิตร ควบคุมภาวะในการหมักไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 วิธีวิเคราะห์

2.4.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดโดยใช้มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

2.4.2 การละลายเกลือแคลเซียมซิเทรตในน้ำหมัก (ตามวิธีของ Nakanishi et al, 1972; Wojtatowicz *et al*, 1993)

ก่อนที่จะนำน้ำหมัก (ประมาณ 25 ml) ในขวดรูปชมพู่ ที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งนั้น ต้องทำการละลายเกลือแคลเซียมซิเทรตที่เกิดขึ้น โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ประมาณ 5 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วง 1.6-1.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50.00 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่ขจัดไอออนแล้ว

2.4.3 การวัดการเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ใช้ปิเปตต์ดูดน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.4.2 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยน้ำขจัดไอออน 2 ครั้งปริมาตร 20 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ที่ได้ลงสู่กระทงอะลูมิเนียมฟอยล์ (aluminum foil) อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ (desiccator) แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดหักน้ำหนักของกระทงอะลูมิเนียมฟอยล์ออก จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์แล้วจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก

2.4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้กรดไดไนโทรซาลิไซลิก (ดัดแปลงจาก Bernfeld, 1955; Miller, 1958)

เจือจางตัวอย่างน้ำหมักให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วปิเปตต์น้ำหมักที่ได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโทรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข 1) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม ปิดปากหลอดทดลองนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำเย็น นานประมาณ 5 นาที เติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ส่วนตัวเปรียบเทียบใช้น้ำขจัดไอออนแทนตัวอย่างน้ำหมัก คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร จากกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีไดไนโทรซาลิไซลิก ในช่วงความเข้มข้น 0.00-1.00 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค 1)

2.4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ พี.จี.โอ.เอนไซม์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Huggett and Nixon, 1957)

เจือจางตัวอย่างน้ำหมักให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วปิเปตต์ตัวอย่างน้ำหมักที่ได้ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายพี.จี.โอ เอนไซม์ (ภาคผนวก ข 3) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตรทันที ส่วนตัวเปรียบเทียบใช้น้ำที่ขจัดไอออนแล้วแทนตัวอย่างน้ำหมัก คำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี พี จี โอ เอนไซม์ ในช่วงความเข้มข้น 0.00-0.20 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค 2)

2.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (ดัดแปลงจากวิธีของ Stern, 1957)

ตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์ออกแล้วจากข้อ 2.4.3 นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวตามขั้นตอนดังนี้

2.4.6.1 การเปลี่ยนกรดมะนาวเป็นเพนทะโบรโมแอซีโทน

ปิเปตต์ตัวอย่างน้ำหมัก ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม เติมสารละลายโพแทสเซียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ลงไป 5 หยด จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไป 10 หยด ทันที ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

2.4.6.2 การสกัดเพนทะโบรโมแอซีโทนด้วยเฮปเทน

นำหลอดทดลองจากข้อ 2.4.6.1 มาแช่ในอ่างน้ำแข็งแล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จนน้ำหมักใสไม่มีสี และเติมเฮปเทน ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท สกัดด้วยเครื่องเขย่าผสม เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

2.4.6.3 การสกัดด้วยสารละลายไทโอยูเรีย

ใช้ปิเปตต์ดูดส่วนบนหรือชั้นของเฮปเทนจากหลอดทดลองในข้อ 2.4.6.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองใหม่ แล้วเติมสารละลายไทโอยูเรีย (ภาคผนวก ข 4) ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท สกัดด้วยเครื่องเขย่าผสม เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

2.4.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ดูดส่วนล่างหรือชั้นของสารละลายไทโอยูเรียจากหลอดทดลองในข้อ 2.4.6.3 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเพนทะโบรโมแอซีโทน-ไทโอยูเรีย ที่มีในตัวอย่างน้ำหมักที่สกัดได้ ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ใช้น้ำขจัดไอออนแทนตัวอย่างน้ำหมักเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณกรดมะนาวหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร จากกราฟมาตรฐานของกรดมะนาว ความเข้มข้น 0.0-40.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (ภาคผนวก ค 3)

2.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิทริก โดยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (สมศักดิ์ นาคซื่อตรง, 2537)

ปิเปตต์ตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการปั่นแยกในข้อ 2.4.3 มา 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายตัวพา 9.0 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสแอซีเทตเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะดังนี้

คอลัมน์	: Selectosil 5 C18 ขนาด (I.D.) 4.6 มิลลิลิตร ยาว 25 เซ็นติเมตร
สารละลายตัวพา	: สารละลายไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 2.0(ภาคผนวก ข 5)
สารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน	: สารละลายกรดทาร์ทาริก ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ในน้ำขจัดไอออนแล้ว
อุณหภูมิ	: 40 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	: คลื่นอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร

โดยที่ภาวะดังกล่าว เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดไอโซซิทริกประมาณ 4 นาที และกรดมะนาว ประมาณ 5.8 นาที คำนวณปริมาณกรดไอโซซิทริกและกรดมะนาวโดยใช้กราฟมาตรฐานของไอโซซิทริก ในช่วงความเข้มข้น 0.00-1.00 กรัมต่อลิตร และกราฟมาตรฐานกรดมะนาว ในช่วงความเข้มข้น 0.00-5.00 กรัมต่อลิตร โดยกราฟมาตรฐานที่ใช้นั้นเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดไอโซซิทริกหรือกรดมะนาวกับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของกรดไอโซซิทริกหรือกรดมะนาวต่อสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (ภาคผนวก ค 4และ ค 5)