

## บทที่ 2

### วิธีการทดลอง

#### 2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

##### 2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychrotherm incubator shaker) รุ่น AG Rittergasse 27 ของบริษัท INFORS ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic - 21 ของบริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave) รุ่น HA - 26 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) รุ่น HI 8424 ของบริษัท Hanna Instruments ประเทศอิตาลี

ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น MR 6650 (touch control) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องเพชรตอลติกบีม รุ่น LKB ยี่ห้อ Microperpex ของบริษัท Bromma ประเทศสวีเดน

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

เครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ (evaporator) รุ่น RE 52 เครื่องดูดให้เป็นสุญญากาศ (vacuum aspirator) รุ่น BP -51 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องกำเนิดคลื่นอุลตราโซนิก (sonicator) ยี่ห้อ Delta รุ่น Ultrasonic Cleaner D 200 บริษัท D.S.C group ประเทศไต้หวัน

เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) รุ่น LC- 8A ชุดควบคุมระบบ SLC- 8A และเครื่องวิเคราะห์ผล C- R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD - 300 - 5L ใบพัดแบบ 6 - blade turbine ตัวควบคุมภาวะ bioprocess controller รุ่น MDIAC - SS ของบริษัท B.E. Marubishi Co.,Ltd., Tokyo,Japan เครื่องอัดอากาศ (air compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (circulation type handy cooler) รุ่น TRL -108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (fermentor) ขนาด 30 ลิตร รุ่น MSJ - U2CL ของบริษัท B.E. Marubishi Co.,Ltd., Tokyo,Japan ตัวถังเป็นสแตนเลสมีใบพัดแบบ 6 - blade turbine ตัวควบคุมภาวะเป็น bioprocess controller รุ่น MDIAC - C1 เครื่องอัดอากาศ (air compressor) รุ่น AL 15 SA ของบริษัท Kobelco, Japan.

ถังหมัก (fermentor) ขนาด 300 ลิตร รุ่น MSJ - U300L ของบริษัท B.E. Marubishi Co., Ltd.,Tokyo,Japan ตัวถังเป็นสแตนเลส มีใบพัดแบบ 6 - blade turbine ตัวควบคุมภาวะเป็น bioprocess controller รุ่น MDIAC-C1 เครื่องอัดอากาศ (air compressor) รุ่น AL 15 SA ของบริษัท Kobelco, Japan.

## 2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้จำหน่าย	ประเทศผู้ผลิต
กรดมะนาวชนิดปราศจากน้ำ	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไอโซซิดริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดทาร์ทาริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดฟอสฟอริก	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
กรดซัลฟูริก	MALLINCKRODT	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไฮโดรคลอริก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แคลเซียมคาร์บอเนต	ศิลาทิพย์	ประเทศไทย
แคลเซียมออกไซด์	ศิลาทิพย์	ประเทศไทย
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	บริษัทรวมเคมี	ประเทศอังกฤษ
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	บริษัทรวมเคมี	ประเทศจีน
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	บริษัทรวมเคมี	ประเทศจีน
แอมโมเนียมคลอไรด์	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
แอมโมเนียมคลอไรด์	บริษัทรวมเคมี	ประเทศญี่ปุ่น
สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ประเทศไทย
สารสกัดจากมอลต์	Food Ingredients Specialities	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เปปโตน	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แป้งมันสำปะหลัง	บริษัท ไทยวา	ประเทศไทย
พีจีไอ เอนไซม์	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอนไซม์ BAN 240 L และ Dextrozyme 225/75 L	NOVO NORDISK	ประเทศเดนมาร์ก
ออโต - โคอะนิซิน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เมธานอล	J.T.BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา

## 2.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นยีสต์สายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 ซึ่งได้ผ่านการคัดเลือกแล้วจากการวิจัยของ เรวดี เลิศไตรรักษ์ (2535) และได้ทำการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาพที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า และ ถึงหมักขนาด 5 ลิตรโดย ประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537)

## 2.3 การเก็บรักษาเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

### 2.3.1 การเก็บรักษาเชื้อ

เชื้อเชื้อ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แล้วลาก (streak) บนอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) สูตรอาหาร YM (ภาคผนวก ก1.2 ) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เก็บเชื้อในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ - 70 องศาเซลเซียส

### 2.3.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

#### 2.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็งลาดเอียง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก1.2 ) นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น โดยเติมน้ำที่กำจัดไอออน และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2.5 มิลลิลิตรต่อหลอดอาหารแข็งลาดเอียง ปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ซึ่งวิธีนี้จะทำให้ได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.05 เลี้ยงเชื้อบนเครื่อง

เขย่าแบบวงกลม (rotary shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น

#### 2.3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อที่ 2.3.2.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมี ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 2.1 ลิตร ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมได้ตามภาคผนวก ก1.2 นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น ควบคุมภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น

#### 2.3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อที่ 2.3.2.2 ลงในถังหมักขนาด 30 ลิตร ซึ่งมี ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 21 ลิตร ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมได้ตามภาคผนวก ก1.2 ควบคุมภาวะการเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น

#### 2.3.2.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร

ปีเปิดหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.1 ลงในอาหาร สำหรับผลิต กรดมะนาว (ภาคผนวก ก2.7 ) ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

#### 2.3.2.5 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมี ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.5 ลิตร ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเตรียมได้ตามภาคผนวก ก 2.3 นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น ควบคุมภาวะในการหมักที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น

### 2.3.2.6 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.2 ลงในถังหมักขนาด 30 ลิตร ซึ่งมี ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 21 ลิตร ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อาหารสำหรับผลิตกรด มะนาวเตรียมได้ตามภาคผนวก ก 2.7 นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น ควบคุมภาวะในการหมักที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเป็นไปตามการคำนวณของการกำหนดเกณฑ์การขยาย ส่วน และอัตราการให้อากาศ มีค่า 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที

### 2.3.2.7 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.3 ลงในถังหมักขนาด 300 ลิตร ซึ่งมี ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 210 ลิตร ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อาหารสำหรับผลิตกรด มะนาวเตรียมได้ตามภาคผนวก ก2.8 นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น ควบคุมภาวะในการหมักที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเป็นไปตามภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตที่ได้จาก การศึกษาในถังหมักขนาด 30 ลิตร เพื่อกำหนดเป็นเกณฑ์ในการขยายส่วน อัตราการให้อากาศมี ค่า 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที

## 2.4 วิธีวิเคราะห์

### 2.4.1 ค่าความเป็นกรด - ต่าง

ใช้ เครื่องวัดค่าความเป็นกรด -ต่าง (pH meter)

### 2.4.2 การละลายเกลือแคลเซียมซิเตรทในน้ำหมัก (ดัดแปลงจากวิธีของ Nakanishi และ คณะ ,1972)

ก่อนการวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว และติดตามการเจริญของเชื้อจะต้องทำ การละลายเกลือแคลเซียมซิเตรทที่เกิดขึ้น โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรด - ต่างให้อยู่ในช่วง 1.6 -1.8 จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100.0 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว

#### 2.4.3 วัดการเจริญของเชื้อโดยวิธีห่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปีปแต่น้ำหมักที่ได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF / C ที่ทราบน้ำหนักแห้งแน่นอน โดยใช้เครื่องกรองอย่างละเอียด (Millipore filter) และเครื่องสูญสุญญากาศ ล้างเซลล์ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว 30 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด หักน้ำหนักกระดาษกรองออก จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองเอาเซลล์ออกแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิเตริก และน้ำตาลที่เหลือต่อไป

#### 2.4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ พีจีไอเอนไซม์ (Hugget and Nixon)

ปีปแต่น้ำหมักที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ข 2 ) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ป่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ใช้น้ำที่กำจัดไอออนแล้ว และผ่านขั้นตอนดังข้างต้นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0-0.20 กรัมต่อลิตร หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค 3 )

2.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิเตริกในน้ำหมัก โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) (สมศักดิ์ นาคชื้อตรง , 2537)

ปีปแต่น้ำหมักที่ผ่านการกรองในข้อ 2.4.3 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำตาลละลายตัวพหุ ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง เซลลูโลสอะซิเตท ฉีดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยมีภาวะดังนี้

คอลัมน์	: Selectosil 5 C18 ขนาด (I.D.) 4.6 มิลลิเมตร ยาว 25 เซนติเมตร
สารละลายตัวพา	: ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ 5 กรัมต่อลิตร ในน้ำที่กำจัดไอออนแล้วอย่างดี ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 2.00 ด้วย กรดฟอสฟอริก
สารมาตรฐานเปรียบเทียบ	: กรดทาร์ทริกความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ในน้ำปราศจากไอออน
อุณหภูมิที่ใช้	: 40 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	: 1.0 มิลลิเมตร ต่อ นาที
เครื่องตรวจจับ	: คลื่นอุลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร

โดยใช้ภาวะดังกล่าว เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดมะนาวประมาณ 5.8 นาที และกรดไอโซซิทริกประมาณ 3.6 นาที คำนวณหาปริมาณกรดมะนาว และกรดไอโซซิทริก จากกราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0 - 5.0 กรัมต่อลิตรและกราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิทริกในช่วงความเข้มข้น 0.0 - 0.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งกราฟมาตรฐานที่ใช้ นั้นเป็นกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดมะนาว หรือ กรดไอโซซิทริก กับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของกรดต่อสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (ภาคผนวก ค 1 และ ภาคผนวก ค 2 )

#### 2.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมัน

##### สำปะหลังด้วยเอนไซม์

ซึ่งสารไดอะตอมาเซียสเอิร์ธ 1.0 กรัม ใส่ในจานแก้วที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว ใส่สารละลายตัวอย่างปริมาตร 5.0 มิลลิเมตร อบในตูบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดสิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก หักน้ำหนักจากแก้วและไดอะตอมาเซียสเอิร์ธ จะได้ปริมาณของแข็งทั้งหมด หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร