บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์

วัตถุดิบ และกล้าเชื้อที่ใช้ได้แก่

1. น้ำเวย์จากกระบวนการทำเนยแข็งมอซซาเรลลา จากบริษัทแดซีโซ่จำกัด จังหวัดเชียงใหม่
2. เชื้อ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* TISTR 5695 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
3. เชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 107 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

1. กระดาษกรอง เบอร์ 4 เส้นผ่านศูนย์กลาง 110 และ 125 มิลลิเมตร (Whatman , England)
2. กรวยกรองสุญญากาศ (Ezec-OR, Japan)
3. ขวดรูปชมพู่ (Pyrex, USA)
4. ห้องเย็นอุณหภูมิ -20 และ 4-8 องศาเซลเซียส
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Precisa; XT320M, France)
6. บีกเกอร์ (Pyrex, USA)
7. ถังพลาสติก ขนาด 10 L (Polypropylene, PP)
8. กระบอกตวง (Pyrex, USA)
9. ถุงร้อน (Polypropylene, PP)
10. ถุงเย็น (Polyethelene, PE)
11. กระดาษ (Bleached Kraft pulp)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

1. Adjustable air-displacement pipette (Gilson, France)
2. pipet-tip (Scientific plastic, USA)
3. จานเพาะเชื้อ (Petri dishes; Pyrex, USA)
4. หลอดแก้วทดลอง (Pyrex, USA)
5. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave; MT sterilizer 100, Thailand)
6. ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar air flow, Model CF43s, Australia)
7. ตู้อบฆ่าเชื้อแบบลมร้อน (Memmert, Um 100-UN 800, Germamy)
8. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Consort, Model C 830, Belgium)
9. เครื่องเขย่า (Gallenkamp, England)
10. ขวดดูแรน ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (Schott Duran, Germany)
11. ตู้บ่มเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Termaks)
12. อ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิ (Gallenkamp, England)
13. เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Chiltern Scientific, ZC 301)
14. เครื่องเขย่า (Vortex Genie 2 model G-560b, USA)

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

1. Kjeldahl digestion set (Tecator, USA)
2. ถ้วยอลูมิเนียมหาความชื้น (moisture can)
3. โถดูดความชื้น (desicator) ที่มีสารดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius,Model A Germany)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precisa. BJ 610C, Switzerland)
6. ตู้อบไฟฟ้าควบคุมอุณหภูมิ (Termaks)
7. บิวเรตขนาด 25 และ 50 มิลลิลิตร (Witeg, Germany)
8. ขวดรูปชมพู 250 และ 500 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

9. เตาไฟฟ้า (Heidolph MR 3001, Germany)

10. กระบอกตวง 50, 25, 100 และ 500 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)

11. บีกเกอร์ ขนาด 25, 600, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)

12. ตู้ดูดควัน (Toplab,Thailand)

13. Ebulliometer (Dujardin-Salleron, Paris)

2 สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- Zinc acetate dihydrate (Merck, Germany)
- Acetic acid glacial (Merck, Germany)
- Potassium ferrocyanide (Merck, Germany)
- Copper sulphate (Merck, Germany)
- Sodium hydroxide (Merck, Germany)
- Sodium potassium tartrate (Merck, Germany)
- Methylene blue (Merck, Germany)
- Hydrochloric acid (Merck, Germany)

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- Bacto peptone (Difco, USA)
- Malt extract (Merck, Germany)
- Yeast extract (Merck, Germany)
- Glucose (Fisher chemical, UK)
- Acetic acid glacial, (Merck, Germany)
- Di-Sodium hydrogen phosphate dodecahydrate ($Na_2HPO_4.5H_2O$) (Merck, Germany)
- Ammonum sulphate $(NH_4)_2SO_4$ (Ajax Finechem, Australia)
- Di-ammonuim hydrogen orthophosphate $(NH_4)_2HPO_4$) (Ajax Finechem, Australia)
- Magnesium sulphate ($MgSO_4$) (Ajax Finechem, Australia)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- Citric acid monohydrate (Fisher chemical, UK)
- Absolute ethanol (Merck, Germany)
- Agar (Merck, Germany)
- Ferrous sulphate ($FeSO_4$) (May and Baker, England)
- Sodium chloride (NaCl) (Merck, Germany)
- Sodium hydroxide (NaOH) (Merck, Germany)
- Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4) (Ajax Finechem, Australia)
- น้ำตาลซูโครส (มิตรผล)

3. วิธีการทดลอง

3.1 ศึกษาคุณภาพทางเคมีของน้ำเวย์จากกระบวนการผลิตเนยแข็งมอซซาเรลลา

การเตรียมน้ำเวย์

น้ำเวย์จากกระบวนการทำเนยแข็งมอซซาเรลลา จากบริษัทดีเซโซ่จำกัด การเตรียมน้ำเวย์แสดงดังภาพที่ 3.1

ก. การแยกโปรตีนเวย์ออกจากน้ำเวย์

น้ำเวย์ใส่ในถุง Polypropylene 2.0 ลิตร

↓

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

↓

ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

↓

กรองแยกส่วนใสด้วยสำลีและกระดาษกรองเบอร์ 4 (2ชั้น)

กรองโดยใช้ Buchner funnel ขนาด 1 ลิตร (แยกตะกอนโปรตีน)

↓

น้ำเวย์ที่ผ่านการแยกตะกอนโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. การฆ่าเชื้อน้ำเวย์เพื่อใช้เลี้ยงจุลินทรีย์

น้ำเวย์ที่ผ่านการแยกตะกอนโปรตีน

↓

เติมสารอาหารที่ระดับต่าง ๆ

↓

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

↓

ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

↓

เติมกล้าเชื้อเริ่มต้น เพาะเลี้ยงเชื้อ

ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมน้ำเวย์

3.1.1 ศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ก่อนและหลังการแยกตะกอนโปรตีน

ทำการศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้วิธี Lane and Eynon (AOAC, 2000) ทำการศึกษาน้ำเวย์ที่ผ่าน และไม่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วแยกตะกอนโปรตีนของน้ำเวย์ที่ผ่านการให้ความร้อนออก ทำการสุ่มตัวอย่างน้ำเวย์จากกระบวนการทำเนยแข็งมอซซาเรลลา อาทิตย์ละ 1 ครั้ง ทำการทดลองครั้งละ 2 ซ้ำ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

3.1.2 ศึกษาปริมาณโปรตีนทั้งหมดก่อนและหลังการแยกโปรตีน

ทำการศึกษาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl Method (AOAC, 2000) โดยใช้ตัวอย่างเช่นเดียวกันกับการทดลองในตอนที่ 3.1.1

3.1.3 ศึกษาผลของการสร้างไบโอเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ในน้ำเวย์ที่ผ่าน และไม่ผ่านการแยกตะกอนโปรตีน

ทำการศึกษาการสร้างไบโอเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ในน้ำเวย์ที่ผ่าน และไม่แยกตะกอนโปรตีน และไม่มีการเติมสารอาหารอื่นใดโดยกำหนดกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 วิธีเตรียมกล้าเชื้อทำโดยนำตัวอย่างกล้าเชื้อที่มีแผ่นวุ้นปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่น (National) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(ระดับความเร็วสูงสุด) อัตราเร็ว 4,000 รอบ/นาที นาน 10 วินาที จากนั้นนำกล้าเชื้อที่ได้จากการเตรียมใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นโดยเติมในปริมาณเท่ากับร้อยละ 5 ของปริมาตรน้ำเวย์สุดท้าย เพาะเลี้ยงในสภาวะตั้งทิ้งไว้โดยไม่เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ตรวจวัดปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อ

3.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 107 และ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* TISTR 5695 ที่เจริญเติบโตในน้ำเวย์ที่ไม่มีการเติมสารอาหารอื่นใดเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการทดลอง

3.2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 107 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 107 (*A. xylinum* TISTR 107) 1 ห่วง อายุเชื้อ 72 ชั่วโมงจาก Hestrin and Schramm Agar (HSA) (ภาคผนวก ง) ลงใน Hestrin and Schramm Broth (HSB) 10 ml บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 จาก HSB ร้อยละ 10 ของปริมาตรน้ำเวย์สุดท้าย ลงในน้ำเวย์ที่ผ่านกระบวนการเตรียมตามข้อ 3.1 บ่มเพาะเชื้อนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อในน้ำเวย์ อีกครั้ง ในปริมาณกล้าเชื้อเท่ากับร้อยละ10 ของปริมาตรน้ำเวย์สุดท้าย เพาะเลี้ยงในสภาวะตั้งทิ้งไว้โดยไม่เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 120 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างทุก 2 และ 6 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างครั้งละ 2 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยนำตัวอย่างมาปั่นทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่น (National) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปั่น (ระดับสูงสุด) อัตราเร็ว 4,000 รอบ/นาที นาน 10 วินาที จากนั้นทำการ Spread plate ในHSA บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง แล้วตรวจนับปริมาณเซลล์ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่เซลล์เจริญในช่วงที่มีปริมาณเชื้อ 10^6 cfu/มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* TISTR 5695 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ แตะเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* TISTR 5695 (*K. fragilis* TISTR 5695) อายุเชื้อ 48 ชั่วโมง จากอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt Extract Agar (YMA) (ภาคผนวก ง) ลงใน Yeast Malt Extract broth 10 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อในปริมาณร้อยละ 6 ของปริมาตรน้ำเวย์สุดท้ายลงในน้ำเวย์ที่ผ่านกระบวนการเตรียมตามข้อ 3.1 บ่มเพาะเชื้อ 60 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างครั้งละ 2 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ด้วยวิธีการ Spread plate ใน YMA บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน แล้วตรวจนับปริมาณเซลล์ โดยใช้เซลล์ที่เจริญในช่วงที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^7 cfu/มิลลิลิตร เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาต่อไป

3.3 ศึกษาสภาวะและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* TISTR 5695 ในน้ำเวย์

3.3.1 ศึกษาผลของสารอาหาร ต่อการผลิตแอลกอฮอล์ ของ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* TISTR 5695

ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแอลกอฮอล์ของเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 โดยมีปัจจัยที่ต้องการศึกษาทั้งหมด 5 ปัจจัยได้แก่ น้ำตาลซูโครส, $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$ และปริมาณกล้าเชื้อ โดยทำการกลั่นกรองปัจจัยโดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman การกำหนดปริมาณปัจจัยที่ใช้เติมในการศึกษาทำได้โดยการรวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (ภัททิยา, 2530 ; Moeini *et al*, 2004 ; Grba *et al*, 2002 and Kourkoutas et al, 2002) กำหนดปริมาณการเติมปัจจัยที่ระดับของปัจจัยสูง-ต่ำแสดงในตารางที่ 3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.1 การกำหนดระดับสูง-ต่ำของการใช้สารอาหารในน้ำเวย์ เพื่อศึกษาผลของสารอาหารต่อการผลิตแอลกอฮอล์จากเชื้อ *K. fragilis*. TISTR 5695

สารอาหารที่เติมในน้ำเวย์		ปริมาณที่เติม (ร้อยละ)	
		ระดับสูง	ระดับต่ำ
น้ำตาลซูโครส	(A)	10	0
$(NH_4)_2HPO_4$	(B)	0.2	0.1
$(NH_4)_2SO_4$	(C)	0.3	0.1
$MgSO_4$	(D)	0.06	0.04
ปริมาณกล้าเชื้อ	(E)	6	2

จากปัจจัยดังกล่าวเมื่อวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman มีปัจจัยที่ต้องการศึกษา 5 ปัจจัยเลือก N=12 ดังแสดงในตารางมาตรฐานกำหนดระดับสูงต่ำ (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 การกำหนดระดับของสารอาหารในการใช้แผนการทดลอง Plackett and Burman (N = 12) เพื่อกลั่นกรองชนิดและปริมาณสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
3	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
7	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
9	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
11	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + หมายถึงการกำหนดปัจจัยที่ระดับสูง

- หมายถึงการกำหนดปัจจัยที่ระดับต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากตารางมาตรฐานเมื่อนำระดับสูงต่ำของปัจจัยทั้ง 5 ปัจจัยไปแทนค่าในตารางมาตรฐาน ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 12 สูตร โดยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 13 และ 14 เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลกอฮอล์ของ *K. fragilis*. TISTR 5695

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณที่เติม (ร้อยละ)				
	น้ำตาลซูโครส	ปริมาณกล้าเชื้อ	$(NH_4)_2HPO_4$	$(NH_4)_2SO_4$	$MgSO_4$
1	10	6	0.2	0.1	0.06
2	10	6	0.1	0.3	0.06
3	0	2	0.2	0.3	0.06
4	10	2	0.2	0.3	0.04
5	10	2	0.2	0.1	0.04
6	10	6	0.1	0.1	0.04
7	0	2	0.1	0.1	0.06
8	0	6	0.1	0.3	0.04
9	0	6	0.2	0.1	0.06
10	10	2	0.1	0.3	0.06
11	0	6	0.2	0.3	0.04
12	0	2	0.1	0.1	0.04
13	0	2	0	0	0
14	0	6	0	0	0

เมื่อได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 14 สูตรดังแสดงในตารางที่ 3.3 นำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 14 สูตรไปเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างตรวจวัดปริมาณแอลกอฮอล์เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 12, 14, และ16 ชั่วโมง ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์กลั่นกรองปัจจัยในแต่ละช่วงเวลาเพื่อทำการคัดเลือกหาปัจจัยหลัก คือปัจจัยที่มีผลมาก และปัจจัยรองคือปัจจัยที่มีผลน้อยต่อการผลิตแอลกอฮอล์ แสดงตัวอย่างในภาคผนวก จ

โดยน้ำเวย์ที่เติมสารอาหารตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 350 มิลลิลิตรบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นปิดด้วยจุกสำลีหุ้มด้วยฟอยด์ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ทำการเติมกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 cfu/ml ในปริมาณตามร้อยละปริมาตรสุดท้ายที่กำหนดไว้ในสูตรอาหารนั้น ๆ ปิดปากขวดด้วยสำลีหุ้มด้วยฟอยด์เดิมจากนั้นทำการเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที

3.3.2 ศึกษาผลของสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ ต่อการผลิตแอลกอฮอล์ การใช้น้ำตาล และการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* TISTR 5695

เมื่อได้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตแอลกอฮอล์ของ *K. fragilis* TISTR 5695 ในน้ำเวย์ที่เติมสารอาหารในตอนที่ 3.3.1 จากนั้นทำการศึกษาผลของปัจจัยอีกครั้งโดยกำหนดการเติมปัจจัยในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระดับสูง-ต่ำ เช่นเดียวกับตอนที่ 3.3.1 เพื่อทำการคัดเลือกปัจจัยหาปัจจัยหลัก คือปัจจัยที่มีผลมาก และปัจจัยรองที่มีผลน้อยต่อ การผลิตแอลกอฮอล์ การใช้น้ำตาล และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 โดยมีขึ้นตอนการเตรียมน้ำเวย์สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อและสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับตอนที่ 3.3.1

นำน้ำเวย์ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อทำการวิเคราะห์

- ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เชื้อผลิตได้โดยใช้ Ebulliometer
- ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี Lane and Eynon (AOAC, 2000)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)

3.4 การกลั่นกรองคัดเลือกชนิดและปริมาณสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ ที่มีผลต่อการผลิตไบโอเซลลูโลส จากเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 107

ทำการศึกษากลั่นกรองคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไบโอเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 107 โดยสารอาหารที่ใช้เติมสารอาหารทั้งหมด 8 ชนิดได้แก่ น้ำตาลซูโครส, กรดอะซีติก เอทานอล, $(NH_4)_2HPO_4$, KH_2PO_4, $MgSO_4$, $FeSO_4$ และ ปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman เพื่อทำการคัดเลือกสารอาหารที่มีผลต่อการผลิตไบโอเซลลูโลส การใช้น้ำตาล และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 กำหนดปริมาณสารอาหารที่ใช้เติมที่ระดับสูง และระดับต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 3.4 กำหนดสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากตารางมาตรฐาน และแต่ละสูตรประกอบด้วยปริมาณสารอาหารที่เติมดังแสดงในตารางที่ 3.5 บรรจุน้ำเวย์ที่เติมสารอาหาร 12 สูตร สูตรละ 350 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นปิดด้วยจุกสำลีหุ้มด้วยฟอยด์ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องทำการเติมกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ที่มีจำนวนเซลล์ อยู่ในช่วง 10^6 cfu/ml ในปริมาณตามร้อยละของปริมาตรสุดท้ายที่กำหนดไว้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อปิดปากขวดด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้โดยไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

น้ำหมักในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อหลังผ่านการเลี้ยงเชื้อที่ 14 วันทำการวิเคราะห์

- ปริมาณไบโอเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้ (Krusong *et al*., 2004)
- ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี Lane and Eynon (AOAC, 2000)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)

ตารางที่ 3.4 การกำหนดระดับสูง-ต่ำของการเติมสารอาหารในน้ำเวย์ ใช้แผนการทดลอง Plackett and Burman (N = 12) เพื่อทำการคัดเลือกสารอาหารที่มีผลต่อการสร้างไบโอเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107

สารอาหารที่เติมในน้ำเวย์		ปริมาณที่เติม (ร้อยละ)	
		ระดับสูง	ระดับต่ำ
น้ำตาลซูโครส	(A)	10	4
กรดอะซีติก	(B)	4	2
เอทานอล	(C)	3	1
กล้าเชื้อ	(D)	10	5
$(NH_4)_2HPO_4$	(E)	0.5	0.25
KH_2PO_4	(F)	0.04	0.02
$MgSO_4$	(G)	0.05	0
$FeSO_4$	(H)	0.0002	0

เมื่อทำการกลั่นกรองปัจจัยได้ปัจจัยหลักและปัจจัยรองแล้ว นำปัจจัยที่ได้ไปศึกษาหาปริมาณการเติมที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซลลูโลสในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การกลั่นกรองปัจจัยในการเจริญเติบโตร่วมกันต่อการผลิตไบโอเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 107 เมื่อเจริญร่วมกับเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* TISTR 5695 ในน้ำเวย์

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ร่วมกับเชื้อ *K.* fragilis TISTR 5695 ในน้ำเวย์ โดยมีปัจจัยที่ทำการศึกษาทั้งหมด 5 ปัจจัยได้แก่ น้ำตาลซูโครส, $(NH_4)_2HPO_4$, $MgSO_4$, ปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และปริมาณกล้าเชื้อ โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman (N=12) กำหนดปริมาณการเติมที่ระดับสูง-ต่ำ ดังแสดงตารางที่ 3.6 กำหนดสูตรอาหารตามตารางมาตรฐาน (ตารางที่ 3.2) และแต่ละสูตรประกอบด้วยสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ดังแสดงในตารางที่ 3.7 เพื่อทำการกลั่นกรองปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญร่วมกันเพื่อสร้างไบโอเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695 โดยมีขั้นตอนการเตรียมน้ำเวย์สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับตอนที่ 3.4 โดยกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ที่ใช้เติม ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นอยู่ในช่วง 10^6 cfu/มิลลิลิตรและ 10^7 cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ ศึกษาทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ตามระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.1จากนั้นโดยปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้โดยไม่เขย่านาน 14 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 3.6 ปริมาณ และระดับการเติมสารอาหารในน้ำเวย์ ในระดับสูง-ต่ำ เพื่อทำการคัดเลือกสารอาหารที่มีผลต่อการผลิตไบโอเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อ *K. fragilis*. TISTR 5695

สารอาหารที่เติมในน้ำเวย์		ปริมาณการเติม (ร้อยละ)	
		ระดับสูง	ระดับต่ำ
น้ำตาลซูโครส	(A)	10	0
A. xylinum	(B)	10	5
K. fragilis	(C)	6	2
$(NH_4)_2HPO_4$	(D)	0.5	0.1
$MgSO_4$	(E)	0.05	0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.7 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ เพื่อศึกษาการเจริญร่วมกันเพื่อสร้างไบโอเซลลูโลส ของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 กับ เชื้อ *K. fragilis*. TISTR 5695

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณการเติม (ร้อยละ)				
	น้ำตาลซูโครส	กล้าเชื้อ *A. xylinum*	กล้าเชื้อเชื้อ *K. fragilis*	$(NH_4)_2HPO_4$	$MgSO_4$
1	10	10	2	0.5	0
2	10	5	6	0.5	0.05
3	0	10	6	0.5	0
4	10	10	6	0.1	0.05
5	10	10	2	0.1	0
6	10	5	2	0.1	0.05
7	0	5	2	0.5	0
8	0	5	6	0.1	0.05
9	0	10	2	0.5	0.05
10	35	5	6	0.5	0
11	0	10	6	0.1	0.05
12	0	5	2	0.1	0.05
13	0	5	2	0	0
14	0	10	6	0	0

นำน้ำหมักหลังจากเลี้ยงเชื้อที่ 14 วัน ทำการวิเคราะห์

- ปริมาณไบโอเซลลูโลส (Krusong *et al*., 2004)
- ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด Lane and Eynon (AOAC, 2000)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)
- ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ในรูปกรดอะซีติก (AOAC, 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อได้ปัจจัยหลัก คือปัจจัยที่ส่งผลมาก และปัจจัยรองคือปัจจัยที่มีผลน้อยต่อปริมาณไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยงานทดลองนี้พิจารณาปริมาณไบโอเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้เป็นหลัก จากนั้นนำปัจจัยหลักและปัจจัยรองไปศึกษาหาปริมาณการเติมที่เหมาะสมในการทดลองตอนต่อไป

ตารางที่ 3.5 สารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แผนการทดลอง Plackett and Burman เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซลลูโลส จากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณการเติม (ร้อยละ)							
	น้ำตาลซูโครส	กรดอะซีติก	เอทานอล	ปริมาณกล้าเชื้อ	$(NH_4)_2HPO_4$	KH_2PO_4	$MgSO_4$	$FeSO_4$
1	10	4	1	10	0.5	0.04	0	0
2	10	2	3	10	0.5	0.02	0	0
3	4	4	3	10	0.25	0.02	0	0.0002
4	10	4	3	5	0.25	0.02	0.05	0
5	10	4	1	5	0.25	0.04	0	0.0002
6	10	2	1	5	0.5	0.02	0.05	0.0002
7	4	2	1	10	0.25	0.04	0.05	0
8	4	2	3	5	0.5	0.04	0	0.0002
9	4	4	1	10	0.5	0.02	0.05	0.0002
10	10	2	3	10	0.25	0.04	0.05	0.0002
11	4	4	3	5	0.5	0.04	0.05	0
12	4	2	1	5	0.25	0.02	0	0
13	0	0	0	10	0	0	0	0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved