ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

การเตรียม Culture stock และอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การเตรียม primary culture stock (ดัดแปลงจาก นพพล และคณะ, 2551)

1.1 เตรียม primary culture stock ใน aseptic chamber พร้อมอุปกรณ์และเครื่องมือที่ผ่านการฆ่าเชื้อภายใต้แสงอัลต้าไวโอเลต (ultraviolet) เป็นเวลา 30 นาที และผ่านการทำความสะอาดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตรต่อปริมาตร

1.2 เริ่มจากใช้ตะไบเหล็กสำหรับเลื่อยแก้ว เลื่อยที่ผิวหลอดบรรจุผงจุลินทรีย์ที่ผ่านการเช็ดด้วยผ้ากลอสชุบเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เพื่อให้เกิดรอยบากลึกลงไปในเนื้อแก้ว

1.3 จากนั้นใช้ผ้ากลอสที่มีความหนาพอประมาณชุบเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตรต่อปริมาตร พอหมาด หุ้มหลอดบรรจุผงจุลินทรีย์ แล้วออกแรงกดบริเวณรอยตะไบ เพื่อหักหลอดบรรจุเชื้อจุลินทรีย์

1.4 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ลงในหลอดแล้วผสมผงจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี โดยการเคาะก้นหลอดเบาๆ ก่อนนำสารละลายจุลินทรีย์เข้มข้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ไปเตรียม secondary culture stock

1.5 เทสารละลายจุลินทรีย์เข้มข้นที่เหลือในหลอดบรรจุจุลินทรีย์ลงใน cryovial

1.6 เติมอาหารเลี้ยงเชื้ออีก 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดบรรจุจุลินทรีย์ในข้อ 1.5 เคาะก้นหลอดเบาๆ เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีผงจุลินทรีย์ค้างภายในหลอดบรรจุก่อนเทสารละลายจุลินทรีย์ลงไปรวมกับสารละลายเดิมใน cryovial

1.7 เติมกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปใน cryovial (ข้อ 1.6) เพื่อลดระดับความเสียหายของเชื้อจุลินทรีย์จากผลึกน้ำแข็ง ผสมให้เข้ากันดีโดยการเคาะก้นหลอด cryovial เบาๆ แล้วเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม working culture stock

2.1 เชื้อยีสต์ *Candida utilis* TISTR 5001, 5032, 5043, 5046, 5198, และ 5352 และเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020, 5339, และ 5606

- ปิเปตสารละลายจุลินทรีย์เข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร จาก primary culture stock ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Medium (YM) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เติมกลีเซอรอลในสัดส่วนเชื้อจุลินทรีย์ต่อกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในสัดส่วน 800 ไมโครลิตร ต่อ 200 ไมโครลิตร หรือให้ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุดท้ายใน working stock เท่ากับร้อยละ 16 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* TISTR 361 และ 1261 และ *Klebsiella* spp. TISTR 1383

- ปิเปตสารละลายจุลินทรีย์เข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร จาก primary culture stock ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับ *Klebsiella* spp. และ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ *E. coli* ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง
- เติมกลีเซอรอลในสัดส่วนเชื้อจุลินทรีย์ต่อกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในสัดส่วน 800 ไมโครลิตร ต่อ 200 ไมโครลิตร หรือให้ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุดท้ายใน working stock เท่ากับร้อยละ 16 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 เชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 405, 548, และ 550

- ปิเปตสารละลายจุลินทรีย์เข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร จาก primary culture stock ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Zymomonas Medium (ZM) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง
- เติมกลีเซอรอลในสัดส่วนเชื้อจุลินทรีย์ต่อกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในสัดส่วน 800 ไมโครลิตร ต่อ 200 ไมโครลิตร หรือให้ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุดท้ายใน working stock เท่ากับร้อยละ 16 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* TISTR 061 และ *B. circulans* TISTR 907

- ปิเปตสารละลายจุลินทรีย์เข้มข้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร จาก primary culture stock ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับ *B. circulans* และ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ *B. pumilus* ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที
- วัดและปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เท่ากับ 20 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NB เพื่อทำให้เจือจางหรือเข้มข้นขึ้น
- เติมกลีเซอรอลในสัดส่วนเชื้อจุลินทรีย์ต่อกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในสัดส่วน 875 ไมโครลิตร ต่อ 125 ไมโครลิตร หรือให้ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุดท้ายใน working stock เท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.5 เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus jensenii* TISTR 1342 และ *L. fermentum* TISTR 055

- ปิเปตสารละลายจุลินทรีย์เข้มข้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร จาก primary culture stock ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Lactobacilli de Man, Rogosa, Sharpe medium (MRS) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- เพาะจุลินทรีย์ ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที สำหรับ *L. fermentum* และเพาะเลี้ยง ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่มีอากาศ สำหรับ *L. jensenii* เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง
- วัดและปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เท่ากับ 20 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NB เพื่อทำให้เจือจางหรือเข้มข้นขึ้น
- เติมกลีเซอรอลในสัดส่วนเชื้อจุลินทรีย์ต่อกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในสัดส่วน 875 ไมโครลิตร ต่อ 125 ไมโครลิตร หรือให้ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุดท้ายใน working stock เท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.6 เชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR 3080 และ 3081

- ปิเปตสารละลายจุลินทรีย์เข้มข้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร จาก primary culture stock ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- เพาะจุลินทรีย์ ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที
- ทำ wet dry weight เพื่อวัดปริมาณของเชื้อให้ได้ปริมาณเท่ากันในทุกหลอดที่เก็บ stock
- เติมกลีเซอรอลในสัดส่วนเชื้อจุลินทรีย์ต่อกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในสัดส่วน 875 ไมโครลิตร ต่อ 125 ไมโครลิตร หรือให้ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุดท้ายใน working stock เท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เนื่องจากเชื้อรา *T. reesei* สามารถเก็บ glycerol stock ในอาหารเหลวได้ จึงไม่ทำเป็น spore suspension

2.7 เชื้อรา *Aspergillus fumigatus* TISTR 3239, 3100, และ 3464

- อบฆ่าเชื้ออาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ YM ณ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นจนอาหารแข็งตัว
- ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยสปอร์หัวเชื้อราจากหลอด primary culture stock ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน
- ใช้ cork borer เจาะบนจานเลี้ยงเชื้อที่ราเจริญแล้ว ใช้เข็มเขี่ยจิ้มวุ้นไปวางในอาหารแข็งที่เตรียมไว้ในขวด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน
- ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดน้ำกลั่นที่ผสม Tween-80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 15 มิลลิลิตร ลงในขวดเลี้ยงเชื้อ
- ทำการขูดเชื้อราใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ปรับจำนวนสปอร์ให้ได้ประมาณ 10^7 - 10^8 เติมกลีเซอรอลในสัดส่วนเชื้อจุลินทรีย์ต่อกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตรต่อปริมาตร สัดส่วน 875 ไมโครลิตร ต่อ 125 ไมโครลิตร หรือให้ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุดท้ายใน working stock เท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อรา *T. reesei* สามารถเก็บ glycerol stock ในอาหารเหลวได้ จึงไม่ทำเป็น spore suspension

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ ก1 ตัวอย่าง working culture stock ของ *C. utilis* TISTR 5198

3. อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

ทำการฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละแบบที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ณ ความดัน 1 บรรยากาศ เป็นเวลา 15 นาที ด้วยถังความดันฆ่าเชื้อแบบเคลื่อนย้ายได้

ภาพที่ ก2 อาหารเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์ (inoculum media) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.1 อาหารเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ทำการฆ่าเชื้อสารละลายเข้มข้นกลูโคส และแหล่งอาหารไนโตรเจนแยกจากกัน แล้วจึงนำมาผสมเมื่อของเหลวในแต่ละขวดเย็นลง จากนั้นใช้ dispenser (Optifix® BASIC, Item Code 002.02.004, Wertheim, Germany) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วรินอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ ก่อนเก็บโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.1 Nutrient Broth (NB)

ละลายแหล่งอาหารไนโตรเจนที่ประกอบด้วยสารสกัดเนื้อวัว 3 กรัม และเปปโตน 5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และทำการฆ่าเชื้อ

3.1.2 Yeast Medium (YM)

- ละลายกลูโคส 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 ลิตร
- ละลายแหล่งอาหารไนโตรเจนที่ประกอบด้วยสารสกัดยีสต์ 3 กรัม สารสกัดมอลท์ 5 กรัม และ เปปโตน 5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 ลิตร
- ทำการฆ่าเชื้อ

3.1.3 Zymomonas Medium (ZM)

- ละลายกลูโคส 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 ลิตร
- ละลายแหล่งอาหารไนโตรเจนที่ประกอบด้วยสารสกัดยีสต์ จำนวน 10 กรัม และเปปโตน 10 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 ลิตร
- ทำการฆ่าเชื้อ

3.1.4 Lactobacilli de Man, Rogosa, Sharpe Medium (MRS)

ละลายอาหาร MRS สำเร็จรูป 52 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และทำการฆ่าเชื้อ

4. แหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผลิต PAC

4.1 Nutrient Broth เข้มข้น (Conc. NB)

- ละลายสารสกัดเนื้อวัว 18.75 กรัม และเปปโตน 31.25 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 0.25 ลิตร
- ทำการฆ่าเชื้อ

4.2 Yeast Medium เข้มข้น (Conc. YM)

- ละลายสารสกัดยีสต์ 75 กรัม สารสกัดมอลท์ 125 กรัม และเปปโตน 125 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
- ทำการฆ่าเชื้อ

4.3 Zymomonas Medium เข้มข้น (Conc. ZM)

- ละลายสารสกัดยีสต์ 62.5 กรัม และ เปปโตน 62.5 กรัม ในน้ำกลั่น 0.25 ลิตร
- ทำการฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. สารผสมอาหารเลี้ยงเชื้อจากเศษของแข็งเหลือทิ้งที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดด้วยกากน้ำตาลเข้มข้น

เตรียมจากสารสกัดเศษของแข็งเหลือทิ้งสัดส่วนร้อยละ 12.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และปรับความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดให้มากกว่า 120 กรัมต่อลิตร ด้วยกากน้ำตาลเข้มข้นที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 131.30 ± 1.95 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ ก1) ตามวิธีคำนวณปริมาตรสารสกัดเศษของแข็งเหลือทิ้งและกากน้ำตาลเพื่อเตรียมสารผสมดังนี้

<u>กำหนดให้</u>

1) กากน้ำตาลเข้มข้นมีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 675.80 ± 3.17 กรัมต่อลิตร (C_1)
2) เศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นสัดส่วนร้อยละ 12.5 โดยน้ำหนักต่อปริมตร มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 16.36 ± 0.48 กรัมต่อลิตร (C_2)
3) ระดับความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 120 กรัมต่อลิตร (C_3)
4) ปริมาตรกากน้ำตาลเข้มข้น (V_1)
4) ปริมาตรสารสกัดเศษของแข็งเหลือทิ้ง (V_2)
4) ปริมาตรสารผสมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการคือ 1 ลิตร (V_3)

<u>วิธีคำนวณ</u>

กากน้ำตาลเข้มข้น	+	เศษของแข็งเหลือทิ้ง	=	สารผสม
C_1V_1	+	C_2V_2	=	C_3V_3
$(675.80 \times V_1)$	+	$(16.36 \times V_2)$	=	$120 \times (V_1 + V_2)$ -- สมการที่ 1
		V_1	=	$0.1865 \times V_2$

แทนค่า V_1 ในสมการที่ 1 ได้

$(675.80 \times (0.1865 \times V_2)) +$		$(16.36 \times V_2)$	=	$120 \times (1)$
		V_2	=	0.843 ลิตร
		V_1	=	0.157 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ก1 ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดของกากน้ำตาลเข้มข้น

กากน้ำตาลเข้มข้น	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)			
	ซูโครส	กลูโคส	ฟรุกโตส	น้ำตาลทั้งหมด
1	461.20	80.40	126.70	668.30
2	461.90	82.00	129.20	673.10
3	460.90	79.30	125.60	665.80
4	460.20	81.20	126.40	667.80
5	461.40	75.30	128.40	665.10
6	465.40	82.70	146.30	694.40
7	465.50	83.20	133.20	681.90
8	466.10	77.40	128.80	672.30
9	466.00	84.00	134.10	684.10
10	467.80	83.30	134.50	685.60
ค่าเฉลี่ย	463.60	80.90	131.30	675.80
ค่าความคลาดเคลื่อน	0.87	0.89	1.95	3.17

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การเตรียมอะซิเตตบัฟเฟอร์

1.1 ปิเปตกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 99.7 ปริมาตร 11.47 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

1.2 ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมล่าร์

1.3 ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น โดยรักษาระดับ pH ให้เท่ากับ 5.0 จนถึงระดับปริมาตรที่ต้องการ ได้อะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมล่าร์

2. การเตรียมซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 มิลลิโมล่าร์

2.1 ละลายกรดซิตริก 12.6 กรัม ในน้ำกลั่น

2.2 ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.0 ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4.5 โมล่าร์

2.3 ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น โดยรักษาระดับ pH ให้เท่ากับ 6.0 จนถึงระดับปริมาตรที่ต้องการ

3. การเตรียม $NADH_2$ ในโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตบัฟเฟอร์

- เตรียม $NADH_2$ 0.045 กรัม และโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.1 กรัม
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลาย $NADH_2$ ในโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 120 มิลลิโมล่าร์

4. การเตรียมคาร์โบไลเกสบัฟเฟอร์ pH 6.4

4.1 ผสมสารเคมีในสัดส่วนต่อไปนี้

- กรดซิตริก ($HOC(COOH)(CH_2COOH)_2 \cdot H_2O$)	1.921	กรัม
- ไทอามีนไพโรฟอสเฟต ($C_{12}H_{19}ClN_4O_7P_2S$)	0.046	กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.246	กรัม
- โซเดียมไพรูเวต ($C_3H_3NaO_3$)	1.100	กรัม
- เอทานอล (C_2H_5OH)	6.904	กรัม
- เบนซาลดีไฮด์ (C_7H_6O)	0.425	กรัม

4.2 ปรับปริมาตรให้ได้ 35 มิลลิลิตร โดยรักษาระดับ pH ให้เท่ากับ 6.4 ด้วยโพแทสเซียม-ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมล่าร์ จนถึงระดับปริมาตรที่ต้องการ

4.3 ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 50 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การเตรียม developing reagent สำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นฟอสเฟตไอออน

5.1 เตรียมสารเคมีดังต่อไปนี้

- แอมโมเนียมโมลิปเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}•4H_2O$) ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ร้อยละ11 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- ไอรอน (II) ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4•7H_2O$) ร้อยละ 2.7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

5.2 ผสมสารในข้อ 5.1 ในสัดส่วนแอมโมเนียมโมลิปเดตต่อกรดซัลฟิวริกต่อไอรอน (II) ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต เท่ากับ 2 ต่อ 2 ต่อ 1

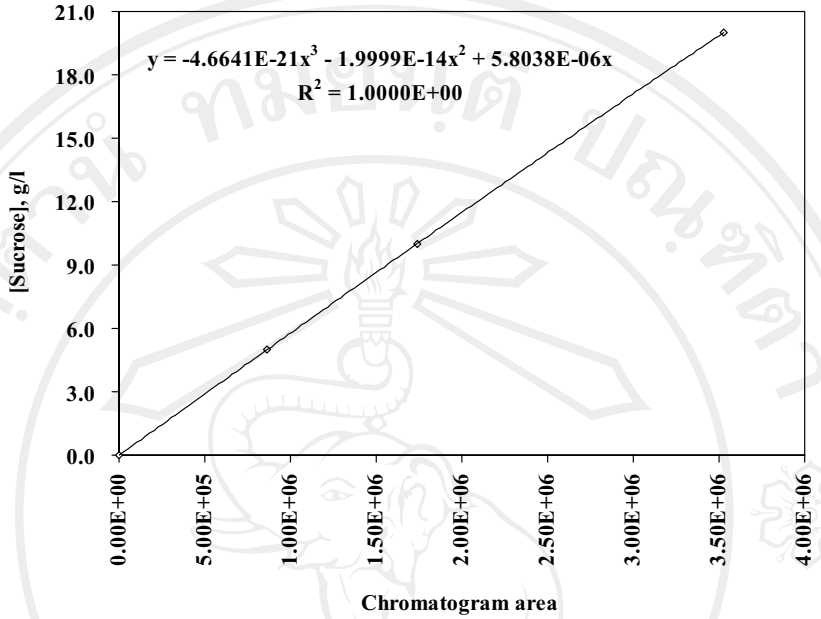
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

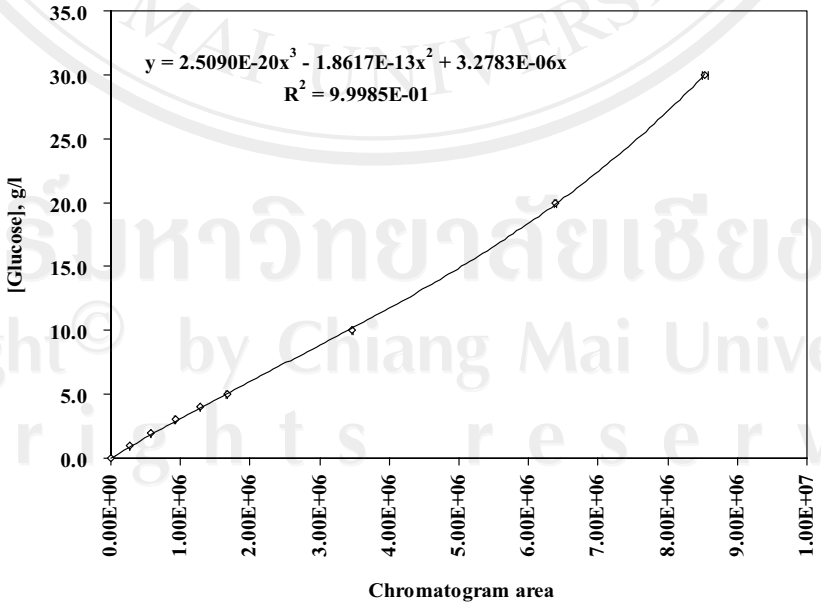
เส้นโค้งมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. เส้นโค้งมาตรฐานจาก HPLC

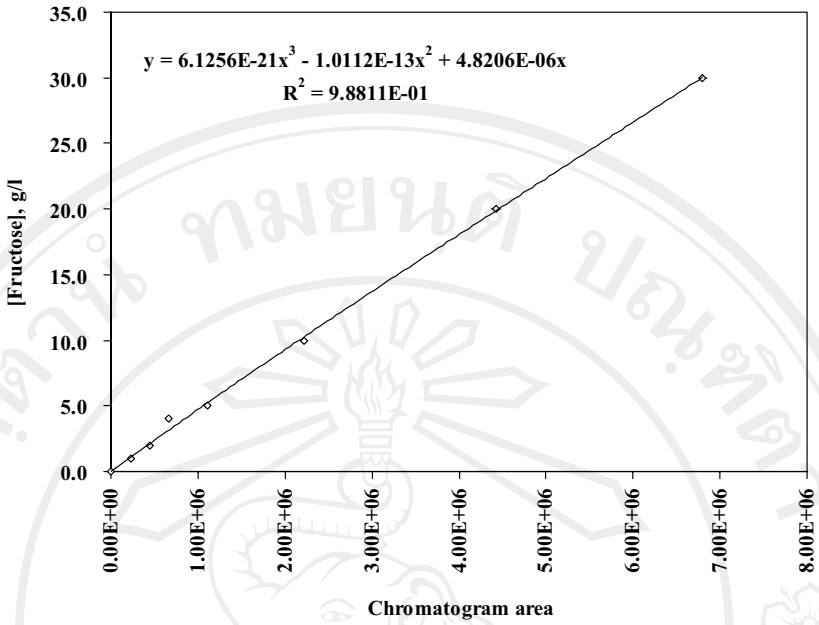


ภาพที่ ค1 เส้นโค้งมาตรฐานสำหรับน้ำตาลซูโครส ช่วงความเข้มข้น 0 – 20 กรัมต่อลิตร ที่ retention time 5.90 – 5.95 นาที

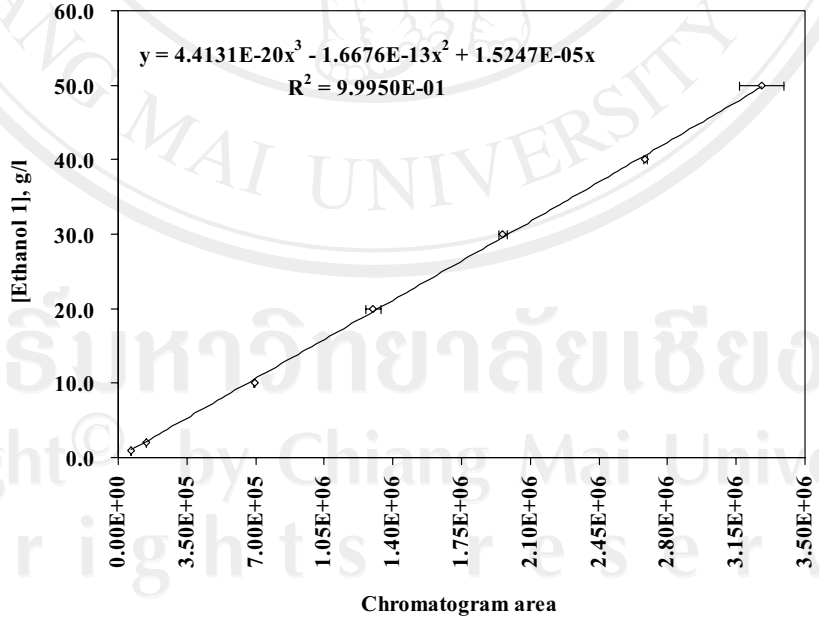


ภาพที่ ค2 เส้นโค้งมาตรฐานสำหรับน้ำตาลกลูโคส ช่วงความเข้มข้น 0 – 30 กรัมต่อลิตร ที่ retention time 6.90 – 7.05 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



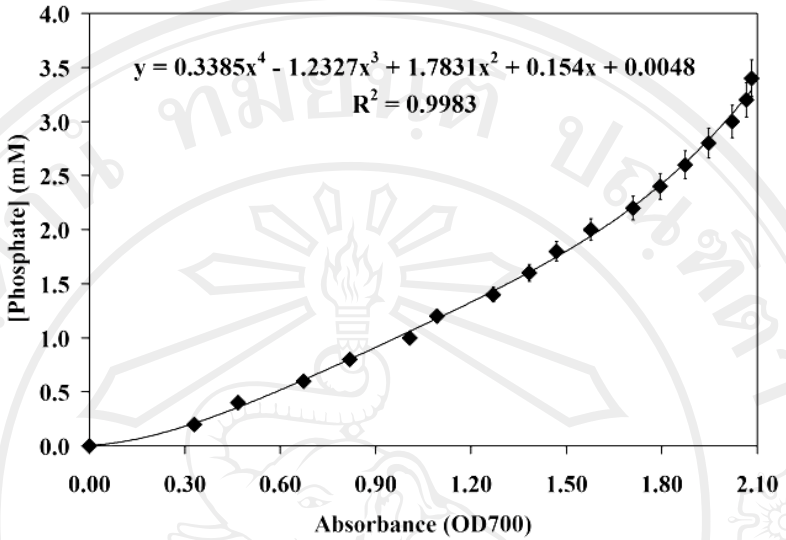
ภาพที่ ค3 เส้นโค้งมาตรฐานสำหรับน้ำตาลฟรุกโตส ช่วงความเข้มข้น 0 – 30 กรัมต่อลิตร ที่ retention time 7.64 – 7.65 นาที



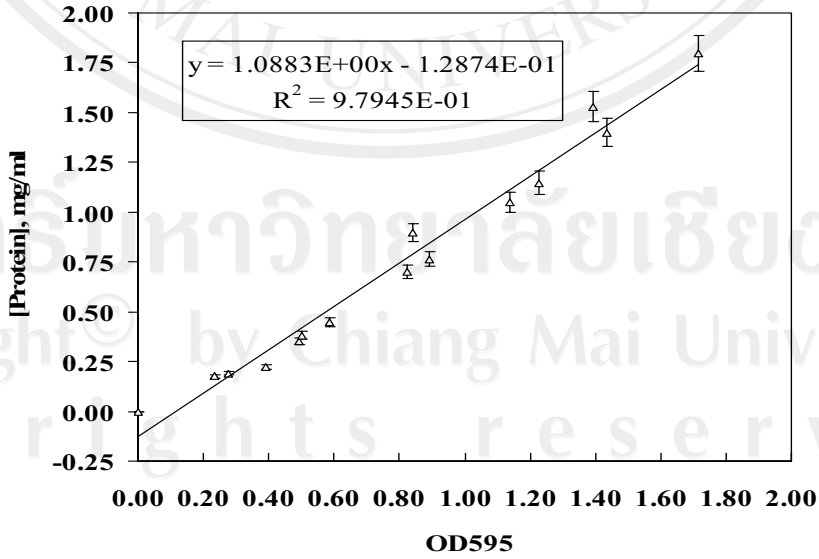
ภาพที่ ค4 เส้นโค้งมาตรฐานสำหรับเอทานอล ช่วงความเข้มข้น 0 – 50 กรัมต่อลิตร ที่ retention time 16.93 – 17.12 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. เส้นโค้งมาตรฐานจาก double-beam spectrophotometer



ภาพที่ ค5 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นฟอสเฟตไอออน สำหรับสารละลายฟอสเฟตมาตรฐาน ช่วง 0 – 3.5 มิลลิโมล่าร์ ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร



ภาพที่ ค6 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นโปรตีน สำหรับสารละลายมาตรฐาน albumin bovine fraction V ช่วง 0 – 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

การคำนวณคะแนนประสิทธิภาพการสกัดน้ำตาล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณคะแนนประสิทธิภาพการสกัดน้ำตาลคำนวณจากความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ผลิตได้ต่อเศษของแข็งเหลือทิ้ง 100 กรัม โดยกำหนดเงื่อนไขให้สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อของเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูงสุดได้คะแนนเต็ม 100 ส่วนความเข้มข้นที่น้อยกว่านั้นให้คิดเป็นสัดส่วนคะแนนเทียบกับความเข้มข้นสูงสุด และให้สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อของเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในหน่วยกรัมต่อลิตร น้อยกว่า 10 กรัมต่อลิตร มีคะแนนเป็นศูนย์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร

ตัวอย่างที่ 1

การย่อยเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นสัดส่วนร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 6.57 ± 0.18 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 5.50 ± 0.14 กรัมต่อเศษของแข็งเหลือทิ้ง 100 กรัม ทั้งนี้สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งร้อยละ 12.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรมีค่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่ระดับ 6.10 ± 0.26 กรัมต่อเศษของแข็งเหลือทิ้ง 100 กรัม ให้คะแนนเต็มเป็น 100 คะแนน คะแนนของสัดส่วนร้อยละ 5.0 เท่ากับ 90.16 ((5.50/6.10) x 100) คะแนน แต่ที่สัดส่วนร้อยละ 5.0 มีค่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดน้อยกว่า 10 กรัมต่อลิตร จึงให้คะแนนเท่ากับศูนย์

ตัวอย่างที่ 2

การย่อยเศษของแข็งเหลือทิ้งต่อน้ำกลั่นสัดส่วนร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 10.18 ± 0.17 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 5.48 ± 0.36 กรัมต่อเศษของแข็งเหลือทิ้ง 100 กรัม ทั้งนี้สัดส่วนเศษของแข็งเหลือทิ้งร้อยละ 12.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรมีค่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่ระดับ 6.10 ± 0.26 กรัมต่อเศษของแข็งเหลือทิ้ง 100 กรัม ให้คะแนนเต็มเป็น 100 คะแนน ดังนั้นคะแนนของสัดส่วนร้อยละ 7.5 เท่ากับ 89.84 ((5.48/6.10) x 100) คะแนน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก จ

ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสในตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐานด้วยวิธีการวัดค่ากิจกรรมการทำงานแบบดีคาร์บอกซิเลส ตามวิธีของ Bergmeyer and Grabl (1983) เป็นการดำเนินปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชั่นควบคู่ไปกับปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่นที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยการเติมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 6.0 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2.7 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28.5 องศาเซลเซียส ลงใน cuvette เติม $NADH_2$ ในสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 120 มิลลิโมล่าร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่แช่ในน้ำแข็งเกล็ด เติมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮด์โดจีเนส 200 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่แช่ในน้ำแข็งเกล็ดปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมโซเดียมไพรูเวตความเข้มข้น 1.0 โมล่าร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง และ blank หรือตัวอย่างที่ต้องการวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่แช่ในน้ำแข็งเกล็ด วัดอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเวลา 2 นาที เพื่อนำไปคำนวณค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ตามสมการ

$$E_{decarbox} = (V_{assay}/V_{sam}) \times A_r \times (1/ \varepsilon \lambda)$$

$$= 4.7 \times A_r$$ หน่วยเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสต่อมิลลิลิตร

A_r อัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณในช่วงเวลา 2 นาที หลังจากเกิดปฏิกิริยา (ต่อนาที)

V_{assay} ปริมาตรสุดท้ายของ assay ที่ใช้วิเคราะห์ (2,700 + 50 + 50 + 100 + 100 = 3,000 ไมโครลิตร)

V_{sam} ปริมาตรของ blank หรือ ตัวอย่าง (100 ไมโครลิตร)

λ ระยะทางที่แสงผ่าน cuvette (1 เซนติเมตร)

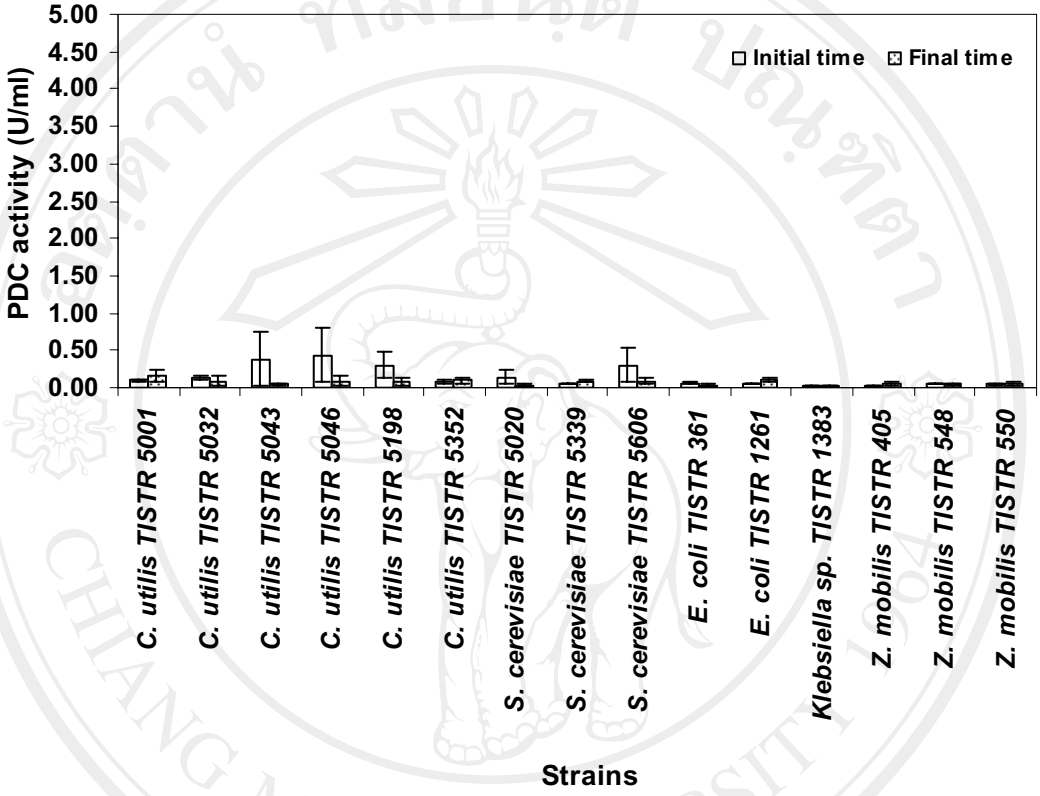
ε ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ $NADH+H^+$ ที่ 340 นาโนเมตร (6.3 มิลลิลิตร•ไมโครโมลต่อเซนติเมตร)

$E_{decarbox}$ ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส

นิยามค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส 1 หน่วย หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนไพรูเวต 1 ไมโครโมลให้เป็นอะเซตาลดีไฮด์ต่อนาที ที่ระดับ pH เท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Rosche *et al*., 2002) โดยควบคุมค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ระหว่างการวิเคราะห์ให้อยู่ในช่วงเชิงเส้นตรงระหว่าง 0.3 – 0.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผลิตเอทานอลและอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลจำนวน 15 สายพันธุ์ ด้วยสารสกัดเศษของแข็งเหลือทิ้งผสมกากน้ำตาลเข้มข้น ในสภาวะตั้งนิ่ง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส ในรูป จ1



ภาพที่ จ1 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) ที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง

ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส มีค่าความคลาดเคลื่อนค่อนข้างสูง สังเกตจากแถบความคลาดเคลื่อนที่ค่อนข้างกว้างและไม่สัมพันธ์กับระดับปริมาณเอนไซม์ที่เซลล์มีอยู่ คือที่เวลาเริ่มต้นมีค่ากิจกรรมการทำงานในระดับที่สูงกว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลได้ในระดับสูงกลับมีค่าต่ำกว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลได้น้อย ทำให้การคำนวณค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ในหน่วย U/ml (หน่วยต่อมิลลิลิตร) ผิดพลาดไปด้วย ซึ่งเป็นไปได้ว่าการตรวจวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสม จึงควรเปลี่ยนวิธีการตรวจวัดเป็นการทำปฏิกิริยาเพื่อผลิตอาร์-ฟีนิลแอซีติลคาร์บินอลจากไพรูเวตและเบนซาลดีไฮด์โดยตรง ด้วยวิธีการคาร์โบไลเกสแอคติวิตี้ (carboligase activity)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายวรายุทธ เนติกานต์
วัน เดือน ปีเกิด	14 พฤศจิกายน 2525
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนศรีสวัสดิ์วิทยาคาร จังหวัดน่าน ปีการศึกษา 2543
	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยี-การอาหาร มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ปีการศึกษา 2547

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved