

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LG โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส (sucrose) 10 กรัม, KH_2PO_4 0.15 กรัม, yeast extract 0.2 กรัม, K_2HPO_4 0.05 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 กรัม, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม และ $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002 กรัม เติมน้ำ DI 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 6.8 ด้วย 1M NaOH นำเชื้อไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.1 การวัดความหนืด

ทำการวัดความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วยเครื่องวัดความหนืด (viscometer) และเครื่องวัดแรงเฉือน (rheometer) ทำการวัดความหนืดและแรงเฉือนที่อุณหภูมิห้อง (25 °ซ) กำหนดให้อัตราเฉือนอยู่ที่ 12 s^{-1} และความเร็วรอบที่ 12.90 rpm โดยใช้ cone C-21 (Pena และคณะ, 1997) ความเค้นเฉือน (shear stress; τ) คำนวณโดยใช้สูตร (1)

$$\text{ความเค้นเฉือน } (\tau) = \text{ค่าความหนืดปรากฏ } (\mu) \times \text{อัตราเฉือน } (\gamma) \quad (1)$$

โดยที่: ความเค้นเฉือน (shear stress) = แรงเฉือนปกติต่อหน่วยพื้นที่ของ plate ($\text{cP} \cdot \text{s}^{-1}$)
 อัตราเฉือน (shear rate) = การเปลี่ยนแปลงความเร็วของๆไหลต่อระยะทาง (s^{-1})
 ความหนืดปรากฏ (Apparent viscosity) = ความสามารถในการต้านทานการไหลของของไหล (cP)

2.2.2 การวัดการเจริญของเซลล์

ทำการวัดการเจริญของเชื้อโดยวิธีการนับจำนวนเซลล์มีชีวิตบนอาหาร LG โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชม.

อัตราการเจริญจำเพาะ (μ, h^{-1}) คำนวณโดยใช้สูตร (2)

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (2)$$

โดยที่:	x	=	จำนวนเซลล์ที่เวลาสุดท้าย
	x_0	=	จำนวนเซลล์ที่เวลาเริ่มต้น
	t	=	เวลา
	μ	=	อัตราการเจริญจำเพาะ (t^{-1})

ตามสมการที่ (2) นำค่าที่ได้ไปพลอตกราฟระหว่าง $\ln x$ กับเวลา (t) ซึ่งจะได้กราฟเส้นตรงซึ่งมีความชัน (μ) การพลอตกราฟโดยใช้สมการนี้นิยมนำมาใช้ในการหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะซึ่งจะให้ค่าที่ค่อนข้างคงที่

2.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) โดยใช้ RI-1530 detector (Jasco, Japan) ใช้ Phenomenex® Rozex RPM-Monosaccharide column (300 x 7.8 mm) ควบคุมอุณหภูมิที่ 75 °ซ ในการทำการทดลองใช้น้ำ DI (deionized water) เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 0.6 มล./นาที

อัตราการใช้น้ำตาล (sugar utilization rate; g/L/h) คำนวณโดยใช้สูตร (3)

$$S = S_0 \times e^{\text{Sugar utilization rate} \times t} \quad (3)$$

โดยที่:	S	=	ความเข้มข้นของน้ำตาล ณ เวลา (กรัม/ลิตร)
	S_0	=	ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)
	t	=	เวลา (ชม.)

2.2.4 การวิเคราะห์กรดอินทรีย์

ทำการวิเคราะห์หากรดอินทรีย์บางชนิดโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) โดยใช้ UV 6000 LP detector กำหนดค่าความยาวคลื่นที่ 210 nm ใช้ The Phenomenex® Rozex ROA organic acid column (300 x 7.8 mm) ควบคุมอุณหภูมิที่ 55 °ซ ในการทดลองใช้ 0.005 N of H_2SO_4 เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที

2.2.5 การวัดความเข้มข้นของอัลจินท

การหาความเข้มข้นของอัลจินททำตามวิธีดังต่อไปนี้ โดยดูดตัวอย่างเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวปริมาณ 10 มล. นำมาผสมกับ EDTA (0.1 M) 1 มล. และ NaCl (1.0 M) 1 มล. ต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเติมด้วย isopropanol 30 มล. นำมาเขย่าให้ผสมเข้ากัน หลังจากทิ้งไว้ 10 นาทีนำตัวอย่างที่ได้มารองด้วยกระดาษกรอง (เบอร์ 1) อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก (Pena *et al.*, 1997)

ผลผลิตอัลจิเนต (yield of alginate; Yp/s, g/g) จำนวนโดยใช้สูตร (4)

$$Yp/s = P / S \quad (4)$$

โดยที่: P = ผลผลิตอัลจิเนตที่ผลิตได้ (กรัม)
S = สารตั้งต้นที่ใช้ไป (กรัม)

2.2.6 การหาน้ำหนักโมเลกุล

การหาน้ำหนักโมเลกุลของอัลจิเนตจะใช้วิธี gel permeation chromatography (GPC) โดยใช้เครื่อง HPLC ซึ่งจะใช้ RI-1530 detector และ Water® Ultrahydrogel 500 column (300 x 7.8 mm) ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °ซ โดยใช้ 0.1 M NaNO₃ เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 0.9 มล./นาที โดยใช้ pullulans ของ *Aureobasidium pullulans* เป็นน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Shodex, Japan; Pena และคณะ, 1997)

2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอัลจิเนตในระดับฟลasks

2.3.1 แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้น

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองคือสูตรอาหาร LG ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 2.1 โดยจะนำมาเพิ่มแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่แตกต่างกันไป โดยในการทดลองจะใช้คาร์บอนจากทั้งหมด 11 แหล่งประกอบไปด้วย กลูโคส (glucose), อะราบินโนส (arabinose), มอลโตส (maltose), แรมโนส (rhamnose), แลคโตส (lactose), แมนโนส (mannose), ฟรุคโตส (fructose), ทรีฮาโลส (trehalose), ไซโลส (xylose) ซอร์บิทอล (sorbital) และซูโครส (sucrose) โดยจะใช้แหล่งคาร์บอนเหล่านี้มาแทนที่แหล่งคาร์บอนเดิมในสูตรอาหาร LG โดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของคาร์บอนแต่ละชนิดจากตั้งแต่ 0-40% (w/v) ขั้วระยะห่างความเข้มข้นทุกๆ 5% จากหนึ่งฟลask ไปยังฟลask อื่นๆ นำมาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6) แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.3.2 อุณหภูมิ

ในการวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่มีต่อการผลิตอัลจิเนตจะใช้สูตรอาหาร LG ในการทดลอง โดยทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตั้งแต่ 20-37 °ซ ตามวิธีของ Clementi และคณะ (1999) นำมาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6) แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป อุณหภูมิที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.3.3 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น

สูตรอาหาร LG และวิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 และ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6) ตามลำดับ โดยค่าความเป็นกรด-ด่างจะปรับให้อยู่ในช่วงตั้งแต่ 5-9 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.3.4 แหล่งไนโตรเจน

ในการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่มีต่อการผลิตอัลจินทิกจะใช้อาหาร LG ในการทดลอง โดยในการทดลองจะใช้ไนโตรเจนจากทั้งหมด 3 แหล่ง ประกอบไปด้วย แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl), ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) โดยจะใช้แหล่งไนโตรเจนเหล่านี้มาแทนที่แหล่งไนโตรเจนเดิมในสูตรอาหาร LG โดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจนแต่ละชนิดจาก 0-20 กรัม/ลิตร ขยับระยะห่างความเข้มข้นทุกๆ 5 กรัม/ลิตร จากหนึ่งฟลากลไปยังฟลากลอื่นๆ นำมาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6) แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอัลจินทิกในระดับถังหมัก

2.4.1 ปริมาณออกซิเจน

ทำการวิเคราะห์หาอัตราการไหลของอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจินทิกในระดับถังหมัก โดยจะทำการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของอากาศจาก 0 - 5 vvm (ปริมาตรของอากาศ/ปริมาตรของของเหลว/นาฬิกา) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (micro DCU-300, B. Braun Biotech international, Germany) โดยใช้ปริมาณในการทำงานที่ 1.5 ลิตรและใช้สภาวะที่เหมาะสม (แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และแหล่งไนโตรเจน) ที่ได้จากการทดลองในระดับฟลากลมาใช้ในการทดลอง ในระหว่างกระบวนการหมักจะทำการเก็บตัวอย่างภายใน 24 ชม. ทุกๆ 4 ชม. และหลังจาก 24 ชม. ผ่านไปแล้วจะทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชม. นำตัวอย่างที่ได้มาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6) อัตราการไหลของอากาศที่เหมาะสมจะถูกเลือกมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.4.2 การกวน

ทำการวิเคราะห์หาความเร็วในการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลจินทิกโดยเริ่มต้นทำการทดลองในระดับถังหมัก โดยจะทำการเปลี่ยนแปลงความเร็วในการกวนตั้งแต่ 100-600 rpm ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาณในการทำงานที่ 1.5 ลิตร แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป นำตัวอย่างที่ได้มาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6)

2.5 การเพิ่มคุณสมบัติของการผลิตอัลจินทิก

2.5.1 การเติมกรดอินทรีย์ในระดับฟลากล

การเติมกรดอินทรีย์ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มคุณสมบัติของการผลิตอัลจินทิกหรือมอลเชลล์ ยกตัวอย่างเช่น การผลิตอัลจินทิก ความหนืดปรากฏ และการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย โดยสภาวะที่เหมาะสมทั้งหมดที่ได้จากการทดลองในระดับฟลากลจะถูกนำมาใช้ในการทดลองโดยใช้กรดอินทรีย์ทั้งหมด 9 ชนิด ประกอบด้วย กรดซักซินิก (succinic acid), กรดฟูมาริก (fumaric acid), กรดโพรพิโอนิก (propionic acid),

กรดไฟติก (phytic acid), กรดมาลิก (malic acid), กรดอะดิปิก (adipic acid), กรดแลคติก (lactic acid), กรดทาร์ทาริก (tartaric acid) และกรดโฟ-อะมิโนไฮดรอกซีเบนโซอิก (4-aminohydroxybenzoic acid) ที่ความเข้มข้น 0.1% w/v นำมาเติมในอาหาร LG กรดอินทรีย์ชนิดที่ผลิตอัลจินทได้สูงที่สุด รวมถึงความหนืดปรากฏ และการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย จะถูกนำมาใช้ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ตั้งแต่ 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2% (w/v) นำตัวอย่างที่ได้มาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 (ยกเว้นข้อ 2.2.6) ชนิดกรดอินทรีย์และความเข้มข้นที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอัลจินท ความหนืดปรากฏ และการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียในถังหมักขนาด 2 ลิตร

2.5.2 กรดอินทรีย์ต่อการผลิตอัลจินทในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ทุกสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในระดับฟลัสก์ (แหล่งและความเข้มข้นของคาร์บอน, อุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และแหล่งไนโตรเจน) และถังหมักขนาด 2 ลิตร (ความเร็วในการกวนและอัตราการไหลของอากาศ) จะถูกนำมาใช้ในการเพิ่มคุณภาพของอัลจินทในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาณในการทำงานที่ 1.5 ลิตร ในระหว่างกระบวนการหมักทั้งหมดจะทำการเก็บตัวอย่างใน 24 ชม. ทุกๆ 4 ชม. และหลังจาก 24 ชม. ผ่านไปแล้วจะทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชม. นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ตามข้อ 2.2

2.6 การผลิตอัลจินทในถังหมักขนาด 5 ลิตร

แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น แหล่งไนโตรเจน ความเร็วในการกวน ปริมาณออกซิเจนและชนิดกรดอินทรีย์ที่เหมาะสมจะถูกนำมาใช้ในการผลิตอัลจินทในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาณในการทำงานที่ 3 ลิตร เป็นเวลา 72 ชม. ทำการควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วย 0.1 N H_2SO_4 หรือ 1 N NaOH ลิตร ในระหว่างกระบวนการหมักทั้งหมดจะทำการเก็บตัวอย่างใน 24 ชม. ทุกๆ 4 ชม. และหลังจาก 24 ชม. ผ่านไปแล้วจะทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชม. นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ตามข้อ 2.2 ยกเว้นข้อ 3.2.6

2.7 การตรึงเอนไซม์บีต้าอะไมเลสโดยใช้อัลจินท

2.7.1 การตรึงเอนไซม์

นำอัลจินท (อัลจินทที่ผลิตจากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* 2.5 % (w/v) และอัลจินทจากสาหร่าย 2% (w/v) มาผสมกับเอนไซม์บีต้าอะไมเลส 200 mg/L (Sigma, Singapore)) ผสมส่วนผสมที่ได้ออกมาโดยใช้พาสเจอร์ไปเปด (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มม.) ใส่สารละลาย $CaCl_2$ 5% (w/v) กวนเบาๆเป็นเวลา 2 ชม. โดยจะได้เม็ดอัลจินทขนาดประมาณ 3 มม. เม็ดแคปซูลที่ได้จะถูกนำกลับมาใช้โดยการกรองผ่านกรวยบุชเนอร์ (Buchner funnel) แล้วนำไปล้างด้วย 0.02 M acetate buffer (pH 4.8) เพื่อนำเอา $CaCl_2$ และเอนไซม์ที่ตกค้าง

อยู่ออกไป นำอัลจินท์ที่ได้มาผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองเป็นเวลา 2 ชม. เมื่อดอัลจินท์ที่ได้จะนำไปเก็บใน 0.02 M acetate buffer ที่อุณหภูมิ 4 °ซ (Konsoula และคณะ, 2006; Chang และ Juang, 2005)

2.7.2 การประเมินกิจกรรมของเอนไซม์

วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์บีต้าอะไมเลสอิสระโดยใช้วิธีดังต่อไปนี้ (Bergmeyer, 1983) โดยใช้สารละลายแป้ง (starch solution; 0.5% v/v) ซึ่งเตรียมได้จากการใช้ soluble starch จาก potato (Sigma, Singapore) 0.25 กรัม ละลายลงใน 0.02 M ของ acetate buffer (pH 4.8) โดยให้ความร้อนเล็กน้อยเพื่อช่วยให้ละลาย หลังจากทิ้งไว้ให้เย็น นำตัวอย่างสารละลายที่ได้มา 37.5 มล. ชั่งสารโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.073 กรัม เติมนลงในตัวอย่างสารละลายทันที ส่วนการเตรียมสารละลายเอนไซม์จะทำการเติมเอนไซม์บีต้าอะไมเลสลงในน้ำ DI ที่มีส่วนผสมของ Lugol reagent (0.01 M I_2 and 0.08 M KI in 0.02 M HCl) และ 0.02 M acetate buffer (pH 4.8) ต่อจากนั้นคลุกสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมไว้มา 0.1 มล. และสารละลายแป้ง 0.5 มล. นำมาผสมกับน้ำ DI 0.9 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.02 M HCl 2 มล. นำตัวอย่างที่ได้มาเจือจางโดยการเติม Lugol reagent 0.5 มล. และน้ำ DI 1 มล. นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 601 nm ด้วยเครื่อง UV/ Visible spectrophotometer (Ultraspec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Bitech, England) หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ (U) กล่าวคือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยแป้ง 10 มก. ภายในเวลา 10 นาที

กิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงจะนำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์เอนไซม์อิสระ แต่มีการดัดแปลงวิธีเล็กน้อย โดยจะใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยอัลจินท์แล้ว 0.05 กรัมและสารละลายแป้ง 0.5 มล. ผสมกับน้ำ DI 1 มล. นำไปบ่มเป็นเวลา 15 นาที (Change และ Juang, 2005)

2.7.3 ความสามารถในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่

เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วยอัลจินท์แล้วจะถูกนำมาเก็บไว้ใน 0.02 M of acetate buffer (pH 4.8) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 7 วันก่อนการนำมาใช้ โดยเอนไซม์ที่ถูกตรึงแล้วจะถูกนำกลับมาใช้ใหม่ 8 ครั้งในทุกๆ 3 วัน และทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ตามข้อ 2.7.2 หลังจากผ่านแต่ละขั้นตอนจะทำการล้างเมืออัลจินท์ด้วย 0.02 M of acetate buffer แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

