

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด ปรับพีเอชให้มีค่าตามต้องการด้วย 1M HCl และ 1 M NaOH ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1. อาหารแข็ง yeast extract peptone dextrose (YPD agar)

yeast extract	10.0	กรัม
peptone	20.0	กรัม
glucose	20.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2. อาหารเหลว 0.5% methanol

2.1 basal medium

NH ₄ Cl	7.63	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.81	กรัม
EDTA. 2 Na	0.45	กรัม
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.59	กรัม
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.055	กรัม
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0.0375	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2.2 metal solution (เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

MnSO ₄ · 3H ₂ O	1.7	กรัม
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.2	กรัม
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.4	กรัม
CoCl ₂ · 2H ₂ O	0.28	กรัม
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.26	กรัม
H ₃ BO ₃	0.40	กรัม
KI	0.06	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2.3 vitamin solution (เตรียมเสร็จแล้วกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส)

biotin	5	มก.
thiamin	500	มก.
น้ำกลั่น	100	มล.

basal medium ปริมาตร 1 ลิตร เติม metal solution ปริมาตร 10 มล. แล้วนำไปฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นเติม vitamin solution ปริมาตร 1 มล. และเมทานอลที่มีความเข้มข้นตามต้องการคือ 0.5% (โดยปริมาตร)

3. อาหารแข็ง 0.5% methanol

ใช้สูตรเดียวกับอาหารเหลว 0.5% methanol แต่เติม Bacto agar 20 กรัมต่อลิตร

4. อาหารเหลว 1% methanol

ใช้สูตรเดียวกับอาหารเหลว 0.5% methanol แต่เติมเมทานอลความเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร)

5. อาหารเหลว basal medium (Suryadi *et al.*, 2000)

NH_4Cl	4.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 6

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและการวิเคราะห์

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและการวิเคราะห์

1. การเตรียมน้ำยาสเปรย์สำหรับตรวจสอบสารประกอบโพลิออล

1.1 สารละลาย 1

KIO ₄	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

1.2 สารละลาย 2

ประกอบด้วยสารละลาย A และ B ผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

สารละลาย A

Sat-Tetrabase	1	กรัม
2 N acetic acid	100	มล.

สารละลาย B

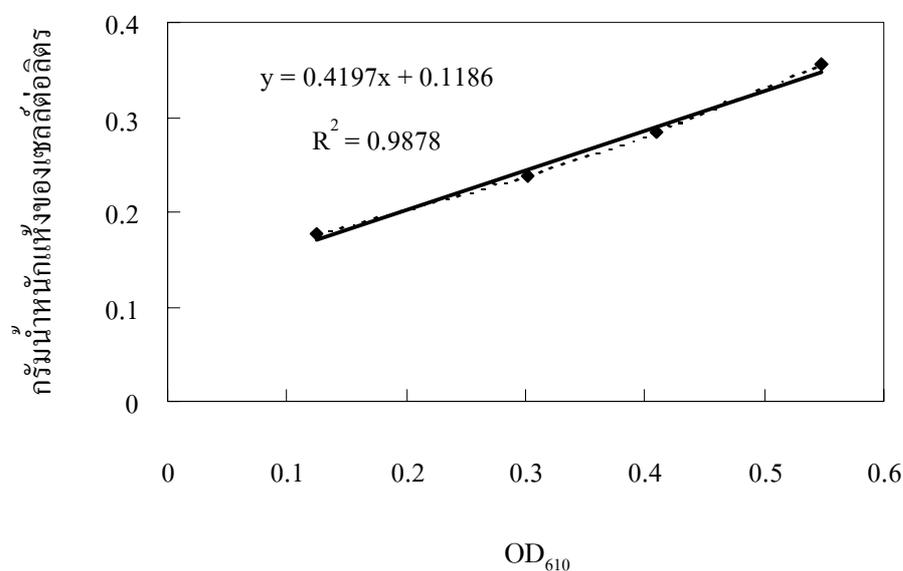
MnSO ₄	15	กรัม
น้ำกลั่น	85	มล.

ตรวจสอบสารประกอบโพลิออลโดยสเปรย์สารละลาย 1 บนแผ่น TLC แล้วเป่าลมให้แห้ง หลังจากนั้นจึงสเปรย์ด้วยสารละลาย 2 ซึ่งสารประกอบโพลิออลจะปรากฏเป็นสีขาบบนพื้นสีฟ้า

2. การวิเคราะห์การเจริญ

วิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยการวัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอยด้วยเครื่อง spectrophotometer (Jenway 640 UV/vis, U.K.) ที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610}) โดยการนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความขุ่นในช่วง 0.05-0.45 แล้วเปรียบเทียบเป็นน้ำหนักแห้งกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610}) กับน้ำหนักแห้ง

การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ทำโดยการเก็บตัวอย่างที่ระยะปลาย log phase ของการเจริญนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เซลล์แขวนลอยมีความขุ่นอยู่ในช่วง 0.05-0.45 ที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610}) จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 1 ลิตร มากรองเซลล์ด้วย membrane filter จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน dessicator นำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำค่าน้ำหนัก membrane filter ที่อบแห้งมาลบออก ผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ต่อ 1 ลิตร



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นของเซลล์แขวนลอยที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610}) กับน้ำหนักแห้งของเมทิลโลโทรฟิยีสต์รหัส N22

3. การวิเคราะห์ปริมาณไซโลสและไซลิทอล

วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC series 1100, Hewlett Packard, Germany) โดยมีสภาวะที่ใช้วิเคราะห์ดังนี้

column	: Ultron PS – 80C (Shimadzu, Japan)
column temperature	: 80 องศาเซลเซียส
mobile phase	: deionized water
flow rate	: 1.2 มล. ต่อนาที
detector	: Refractive Index Detector (RID)
standard mixture	: สารละลายมาตรฐาน ที่มีน้ำตาลดี-ไซโลส เข้มข้น 1% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และไซลิทอล เข้มข้น 1% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

สอบเทียบปริมาณไซโลสและไซลิทอลกับสารละลายมาตรฐาน โดยวิธี single point calibration

ภาคผนวก ก

สูตรคำนวณ

ภาคผนวก ค

สูตรคำนวณ

1. ปริมาณกล้าเชื้อ

$$\text{คำนวณจากสูตร } V_1 = (N_2 \times V_2) / N_1$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรกล้าเชื้อที่ต้องใช้

V_2 = ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

N_1 = ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยของกล้าเชื้อ

N_2 = ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ

$$\text{คำนวณจากสูตร } \mu = (\ln X_t - \ln X_0) / t$$

เมื่อ μ = อัตราการเจริญจำเพาะ

X_t = ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยที่เวลา t

X_0 = ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยเริ่มต้น

t = ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง

3. ค่าผลได้ของไซลิทอล

$$\text{คำนวณจากสูตร } Y_{p/s} = \Delta P / \Delta S$$

เมื่อ $Y_{p/s}$ = ผลได้ของไซลิทอล

ΔP = ผลผลิตของไซลิทอล

ΔS = ไซโลสที่ถูกใช้ไป

ภาคผนวก ง

ผลการทดลอง

