ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Nutrient Broth (NB)

ส่วนประกอบ

อาหาร NA สำเร็จรูป 28.0 กรัมต่อลิตร

pH 7.0 ± 0.1

นำอาหาร NB สำเร็จรูป ละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอช แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Yeast Peptone Dextose (YPD)

ส่วนประกอบ

Yeast Extract	10	กรัมต่อลิตร
Peptone	20	กรัมต่อลิตร
Glucose	20	กรัมต่อลิตร

pH 5.5 ± 0.1

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร ปรับพีเอชแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Batch Production Medium (BMP)

ส่วนประกอบ

แหล่งคาร์บอน	20	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	2.2	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.5	กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4	1.8	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
Trace Element Solution	1	มิลลิลิตรต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร ปรับพีเอชตามความต้องการของจุลินทรีย์ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศา 15 นาที

* ในกรณีที่ต้องการเตรียมอาหารที่ความเข้มข้นมากขึ้น สามารถทำได้โดยนำส่วนประกอบทั้งหมด (ยกเว้น $MgSO_4.7H_2O$ และ แหล่งคาร์บอนที่ต้องแยกใส่ภาชนะอื่น เพื่อป้องกันการเกิดสารประกอบในขณะฆ่าเชื้อ และทำให้เกิดการเปลี่ยนสีและสภาพของอาหาร) มาละลายในน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 1 ลิตร นำส่วนประกอบทั้งหมดไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

4. การเตรียม Trace Element

ส่วนประกอบ

แอมโมเนียมเฟอริคซิเตรท	0.006	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์	0.01	กรัมต่อลิตร
บอริคแอซิด	0.0003	กรัมต่อลิตร
โคบอลคลอไรด์	0.0002	กรัมต่อลิตร
ซิงซัลเฟต	0.0001	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสคลอไรด์	0.00003	กรัมต่อลิตร
โซเดียมโมลิบเดท	0.00003	กรัมต่อลิตร
นิกเกิลซัลเฟต	0.00002	กรัมต่อลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟต	0.00001	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดแยกละลายในน้ำกลั่น จากนั้นผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรรวมให้เป็น 1 ลิตร แช่เย็นจนกว่าจะใช้ผสมกับอาหาร production medium ในการเตรียมนิยมเตรียมที่ความเข้มข้นประมาณ 10 เท่า

5. การเตรียม 4 N NaOH

ใช้สำหรับควบคุมค่า pH ของการเพาะเลี้ยง มีวิธีการคือ

5.1 ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 160 กรัม

5.2 ละลายให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร

5.3 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเก็บใส่ขวดเพื่อนำไว้ใช้ต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. การเตรียม 2 N HCl

ใช้สำหรับควบคุมค่า pH ของการเพาะเลี้ยง มีวิธีการคือ

6.1 ตวงกรดไฮดรอลิคเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 166 มิลลิลิตร

6.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

6.3 เก็บใส่ขวดเพื่อนำไว้ใช้ต่อไป

7. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method)

ชั่ง DNS (3,5 dinitrosalicylid acid) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) ทีละน้อย คนให้ข้ากัน นำไปอุ่นในน้ำร้อนจนสารละลายใส เติมโพแทสเซียมทาเทรต 300 กรัม ตามลำดับ ทำให้เย็นแล้วปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ค้างคืนก่อนนำมาใช้งาน

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน โดยชั่งกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

หลอดที่	ปริมาณสารละลายกลูโคส (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0.0	1.0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

8. การย่อยเดกซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง

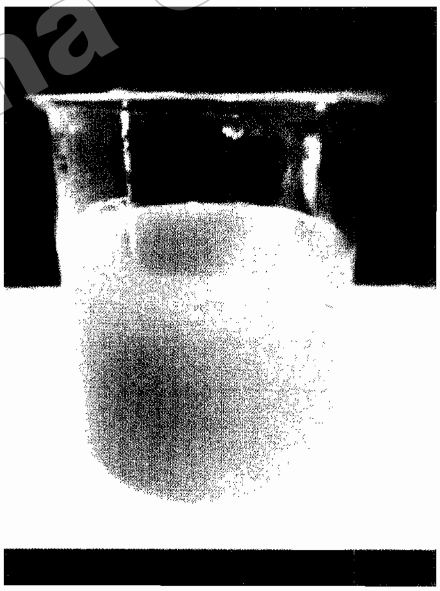
การย่อยเดกซ์ทรินในการวิจัยครั้งนี้ ดัดแปลงมาจากวิธีการย่อยแป้งของ ฉวีวรรณ สว่างวัน (2548) โดยมีสภาวะในการย่อยดังนี้

1. เตรียมอุปกรณ์และเครื่องมือ สำหรับการย่อยแป้งได้แก่ ถังย่อยแป้งขนาด 5 ลิตรที่มี Jacket เพื่อควบคุมอุณหภูมิ ปั๊ม สายยางซิลิโคน อ่างควบคุมอุณหภูมิ มอเตอร์และใบพัดสำหรับการกวนผสม (ภาคผนวก ข)

2. ติดตั้งอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้พร้อมใช้งาน โดยตั้งค่าอุณหภูมิอ่างควบคุมอุณหภูมิ เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส ต่อเข้ากับ Jacket ของถังย่อยแป้ง ใช้อัตราการกวนผสมของใบพัดเท่ากับ 400 รอบต่อนาที

3. เติมน้ำในถังย่อยแป้งส่วนหหนึ่ง รอจนอุณหภูมิในถังได้ประมาณ 70 องศาเซลเซียส ทำการเติมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) รหัส GC 358 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จากนั้นค่อย ๆ เติมแป้งมันสำปะหลังจนหมด (ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปรับปริมาตรจนครบตามที่ต้องการ

4. รอจนอุณหภูมิเท่ากับ 95 องศาเซลเซียสจึงเริ่มจับเวลา 4 ชั่วโมง จะได้สารละลายเดกซ์ทริน ซึ่งจะมีลักษณะเป็นของเหลวที่มีความหนืดเล็กน้อย เป็นสีส้มขุ่น (ภาพภาคผนวก ก-1)



ภาพภาคผนวก ก-1 สารละลายเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

9. การย่อยกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลัง

การย่อยกลูโคสจากแป้งมัสำหลัง เป็นกระบวนการที่ทำต่อจากการย่อยเดกซ์ทริน โดย

1. หลังจากที่ได้สารละลายเดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งในข้อ 8 แล้วทำการลดอุณหภูมิภายในถังย่อยแป้งจนเหลือ 60 องศาเซลเซียส

2. จากนั้นทำการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส รหัส GC 140 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

3. ทำการกวนผสมต่อเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จะได้สารละลายกลูโคสที่มีลักษณะหนืดเล็กน้อย สีเหลืองใส (ภาพภาคผนวก ก-2)

ภาพภาคผนวก ก-2 สารละลายกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University