บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychrotherm incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J, U.S.A.

ถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300 และชุดควบคุมสภาวะ ของบริษัท L.E. Marubishi, Tokyo, Japan

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น spectronic 21 ของบริษัท Bosch & Lomb, U.S.A.

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงลำแสงคู่ (double beam spectrophotometer) รุ่น 210-5763 ของบริษัท Hitachi Ltd., Tokyo, Japan

เครื่องวัดค่าพีเอช (ph meter) รุ่น ϕ 70 ของบริษัท Beckman, U.S.A.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan

เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co.Ltd.,Japan

เครื่องแกสโครมาโตกราฟ (gas chromatograph) รุ่น 163 ของบริษัท Hitachi Ltd., Tokyo, Japan

เครื่องเขย่าสำหรับสกัดแยกสาร (KM shaker) รุ่น V-DN และกรวยสำหรับแยกสาร (separating funnel) ของบริษัท Iwaki Ltd. ,Japan

2. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัย

กรดลิโทโคลิก (lithocholic acid, LCA) กรดคีโนดีออกซีโคลิก (chenodeoxycholic acid, CDCA) และกรดดีออกซีโคลิก (deoxycholic acid,DCA) ของบริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A

เฮกซะฟลูออโรไอโซโพรพานอล (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol HFIP) และกรดไตรฟลูออโรอะซีติก แอนไฮดรายด์ (trifluoroacetic acid anhydride TFA) ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

แป้งมันสำปะหลังชนิดที่มีคุณภาพสูง (super grade) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท ไทยวา จำกัด ประเทศไทย

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่นๆ เป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (analitical grade) จากบริษัทต่างๆซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

3. การเก็บและการเลี้ยงจุลชีพที่ใช้ในการวิจัย

3.1 การเก็บเชื้อ Absidia sp. BA 16

เชื้อสปอร์ (spores) ของเชื้อ Absidia sp. BA 16 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โปเตโตเดกซ์โตรสอการ์ (potato dextrose agar, PDA ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 2-3 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มหลอดแล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -70°ซ.

3.2 การเลี้ยงเชื้อ Absidia sp. BA 16 เพื่อเติมหมู่ไฮดรอกซีบน LCA ในขวดแก้วทรงกรวย

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อปริมาณ 2.4 x 10^7 สปอร์ ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (sabouraud dextrose broth ภาคผนวกที่ 1.2) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 45°ซ. ด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นนำหัวเชื้อนี้มา 5 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับการเติมหมู่ไฮดรอกซีบน LCA (ภาคผนวกที่ 1.3) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 45°ซ. ความเร็ว 250 รอบ/นาที

012475

i 10293826

3.3 การเลี้ยงเชื้อ Absidia sp. BA 16 เพื่อการเติมหมู่ไฮดรอกซีบน LCA ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อปริมาณ 2.4 x 10^7 สปอร์ ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.2) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30^{o}ซ. ด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชม. เตรียมหัวเชื้อนี้ ให้ได้ปริมาตรรวม 300 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ (ภาคผนวกที่ 1.4) ปริมาตร 3 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง คือครั้งแรกที่อุณหภูมิ 121^{o}ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที กวนและให้อากาศเป็นเวลาประมาณ 10 ชม. และครั้งที่ 2 ที่อุณหภูมิ 121^{o}ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลวแล้วจึงเริ่มต้นการหมัก โดยใช้อัตราการกวน (agitation speed) 300 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ 1.2 ลิตร/1 ลิตรของปริมาตรอาหาร/นาที และใช้น้ำมันซิลิโคนอะดีคานอล(silicone adecanol) เป็นสารกำจัดฟอง (antifoamer) เก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ครั้งละ 40-50 มล. ในชม. ที่ 18 หลังการเติมหัวเชื้อ และเก็บซ้ำทุก 6 ชม.หลังจากนั้นจนถึงเวลา 102 ชม. ของการหมัก

3.4 การเตรียมเซลระยะพัก (resting cells) ของ Absidia sp. BA 16

เลี้ยงเชื้อ Absidia sp. BA 16 ตามวิธีการในข้อ 3.2 ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 48 ชม. ซึ่งขณะนั้นเชื้ออยู่ในระยะการเจริญช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) กรองและล้างเซลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำเซลเปียกที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

4. วิธีการวิเคราะห์

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณของผลิตภัณฑ์ (3α, 15β-DHC) ที่เกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซีบน LCA

4.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณของผลิตภัณฑ์หลังจากการหมัก

ปรับความเป็นกรดด่างของตัวอย่างปริมาตร 5 มล. ให้มีพีเอชเป็น 2-3 ด้วยกรดเกลือเข้มข้น 3 โมลาร์ เติมสารละลายมาตรฐาน DCA เข้มข้น 1,600 มก/มล. 250 ไมโครลิตร สกัดของผสมทั้งหมดด้วยเอทิลอะซีเตท (ethyl acetate) 25 มล. ในกรวย

แยกสารขนาด 200 มล. บนเครื่องเขย่าสำหรับสกัดแยกสารเป็นเวลา 30 นาที นำชั้นของเอทิลอะซีเตทที่ได้จากการสกัดมาขจัดน้ำโดยใช้โซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate, Na_2So_4) นำชั้นของเอทิลอะซีเตทที่ขจัดน้ำออกแล้วนี้มา 10 มล. ระเหยให้แห้งที่อุณหภูมิ 50^{o}ซ. โดยใช้เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสูญญากาศ เตรียมกรดน้ำดีพีสกัดได้นี้ให้อยู่ในรูปเอสเทอร์ โดยการเติม HFIP และ TFA 100 และ 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในกรดน้ำดีที่สกัดได้และทำให้แห้งแล้ว บ่มของผสมนี้ที่อุณหภูมิ 37^{o} - 40^{o}ซ. เป็นเวลา 1 ชม. ระเหยให้แห้งภายใต้สภาวะสูญญากาศ นำไปวิเคราะห์ปริมาณของกรดน้ำดีโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี (17) ตามวิธีการดังต่อไปนี้

ละลายอนุพันธ์ของกรดน้ำดีที่เตรียมไว้ด้วยอะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile) 300 ไมโครลิตร ฉีดสารละลายนี้ 1 ไมโครลิตรเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟ (Hitachi 163) ซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์แก้วขนาด 3 มม. x1 ม. ที่บรรจุยูนิพอร์ท (uniport) HP 80/100 เมช (mesh) เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) ซึ่งเคลือบด้วย 2% ซิลิโคน DC-QF-1 โดยควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ (column temperature) และอุณหภูมิของตำแหน่งที่ฉีดตัวอย่าง (injection temperature) เป็น 220^{o} และ 240^{o}ซ. ตามลำดับ ใช้แกสไนโตรเจนเป็นตัวพา (carrier gas) ด้วยความดัน 1.2กก./ซม.^{2} ตรวจวัดปริมาณของกรดน้ำดีด้วยเครื่องตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน(flame ionization detector) วัดปริมาณของกรดน้ำดีโดยคำนวณจากอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของกรดน้ำดีที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการเติมหมู่ไฮดรอกซีบน LCA กับพื้นที่ใต้พีคของกรดน้ำดีมาตรฐาน DCA เทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยที่กรดน้ำดีแต่ละชนิดมีรีเทนชันไทม์ (retention time) ดังนี้คือ LCA 3.5 นาที DCA 6.5 นาที CDCA และ 3α, 15β-DHC 8 นาที

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้ CDCA เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ (external standard) โดยเตรียม CDCA ปริมาณ 800-6,400 ไมโครกรัม เติมกรดน้ำดีมาตรฐาน DCA ตัวอย่างละ 800 ไมโครกรัม นำไปผ่านขบวนการเตรียมอนุพันธ์และฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนโดยมล. ของ CDCA และ DCA กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ CDCA และ DCA

สำหรับการวัดปริมาณของ LCA ทำได้โดยใช้ LCA เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ โดยเตรียม LCA ปริมาณ 200-4,000 ไมโครกรัม เติมกรดน้ำดีมาตรฐาน DCA ตัวอย่างละ

800 ไมโครกรัม นำไปผ่านขบวนการเตรียมอนุพันธ์และฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนโดยน.น.ของ LCA และ DCA กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ LCA และ DCA

4.1.2 <u>การวิเคราะห์ปริมาณของผลิตภัณฑ์ (3α, 15β-DHC) เมื่อใช้เซลระยะพัก</u>

เตรียมเซลระยะพักตามวิธีการในข้อ 3.4 ซึ่งเซลเปียก 1 กรัมมากระจาย (suspend) ในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (tris-hydrochloride buffer) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 20 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 125 มล. เติม LCA 20 มก. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 45°ซ. ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 6 ชม. นำตัวอย่างมา 1 มล. ปรับพีเอชเป็น 2-3 ด้วยกรดเกลือเข้มข้น 3 โมลาร์ เติม DCA เข้มข้น 1,600 ไมโครกรัม/มล. 200 ไมโครลิตร สกัดของผสมนี้ด้วยเอทิลอะซีเตท 5 มล. นำชั้นของเอทิลอะซีเตทมาขจัดน้ำโดยใช้โซเดียมซัลเฟต นำชั้นของเอทิลอะซีเตทที่ขจัดน้ำออกแล้วนี้มา 3 มล. ระเหยให้แห้งที่อุณหภูมิ 50°ซ. โดยใช้เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสูญญากาศ วิเคราะห์ปริมาณของกรดน้ำดีโดยการเตรียมกรดน้ำดีที่สกัดได้และทำให้แห้งแล้วนี้ให้อยู่ในรูปของเอสเทอร์ ฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 4.1.1

4.2 <u>การหามวลของเซลโดยวิธีหาน.น.เซลแห้ง</u>

นำตัวอย่างปริมาตร 30 มล. มากรองเพื่อแยกส่วนที่เป็นเซลออกจากส่วนน้ำใส ล้างเซลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°ซ.เป็นเวลา 12 ชม. ชั่งน.น. เซลแห้ง

4.3 <u>การวัดค่าพีเอช</u>

โดยใช้เครื่องวัดค่าพีเอช

4.4 <u>การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด</u> (total soluble solid)

โดยการอบถ้วยเหล็กที่อุณหภูมิ 100°ซ. เป็นเวลา 3 ชม. ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (desicator) ชั่งน.น.ละเอียดถึง 0.1 มก. นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการกรองเซลมา 5 มล. ใส่ลงในถ้วยเหล็กที่ทราบน.น.แน่นอนแล้ว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100°ซ. เป็นเวลา 5 ชม. ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน.น.

4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar)

โดยวิธีการของ Bernfeld (18) ดังนี้ เตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid, DNSA) โดยละลาย 1 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodiumhydroxide, NaOH) เข้มข้น 2 โมลาร์ปริมาตร 20 มล. เติมน้ำกลั่น 50 มล. และเติมโปแตสเซียมโซเดียมตาเตรท (potassiumsodiumtartrate, $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) 30 กรัม ทำปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น เติมสารละลายนี้ 1 มล. ลงในตัวอย่าง 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่น 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.1 - 1.0 มก./มล. ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสง

4.6 การวิเคราะห์หาปริมาณแป้งที่เหลือ

โดยการย่อยสลายด้วยกรด (acid hydrolysis) (19) ตามวิธีการดังนี้ นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการกรองเซลมา 5 มล. ใส่ลงในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. เติมกรดเกลือเข้มข้นร้อยละ 25 ปริมาตร 10 มล. และน้ำกลั่น 85 มล. ปิดขวดด้วยจุกไม้คอร์กย่อยสลายในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 2 ชม. 30 นาที ทิ้งให้เย็น เติมบรอมไทมอลบลู (bromthymol blue) 2-3 หยด และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 โมลาร์ 20 มล. ทำให้เป็นกลาง (neutralization) โดยการติเตรท (titrate) กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ โดยที่จุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียว (greenish blue) วัดปริมาตรสุดท้าย นำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการของ Bernfeld เมื่อนำปริมาณน้ำตาลริดิวซ์ที่ได้ลบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนการย่อยแป้งด้วยกรด ก็จะทราบปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากแป้งในอาหาร

ทำการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ในการเตรียมอาหารด้วยกรดโดยวิธีดังกล่าวข้างต้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแป้งมันสำปะหลังกับปริมาณน้ำตาลริดิวซ์ที่ได้ใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ

4.7 การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมไนเตรท

โดยวิธีการของ Bhatty และ Townshend (20) ดังนี้ นำสารละลายตัวอย่าง

มา 5 มล. ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 มล. เติมโทลูอีน (toluene) 5 มล. และสารละลายกรดซัลฟูริก : น้ำ (sulfuric : H_2O)(3:1) 15 มล. ปิดจุกแล้วเขย่าเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็น นำชั้นของโทลูอีนไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 284 นาโนเมตร

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายโซเดียมไนเตรทมาตรฐานเข้มข้น 5-25 ไมโครกรัม/มล. และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ เขียนกราฟระหว่างปริมาณของโซเดียมไนเตรทกับค่าดูดกลืนแสง