บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1. เคมีภัณฑ์

1.1. เคมีภัณฑ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

ดี(+)กลูโคสโมโนไฮเดรต (D(+)glucose monohydrate) ของ E.Merck Darmstadt Germany

แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ของ Fluka AG Buch Switzerland

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogenphosphate) ของ May and Baker Ltd. Dagenham England

แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate) ของ May and Baker Ltd. Dagenham England

แมงกานีสซัลเฟต (manganese sulfate) ของ May and Baker Ltd. Dagenham England

เฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate) ของ May and Baker Ltd. Dagenham England

แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) ของ Fluka AG Buch Switzerland

แซคคาโรส (saccharose) ของ E. Merck Darmstadt Germany

ฟรุกโตส (fructose) ของ E. Merck Darmstadt Germany

มอลโตส (maltose) ของ Difco laboratories Detroit U.S.A.

กาแลคโตส (galactose) ของ Difco laboratories Detroit U.S.A.

ราฟฟิโนส (raffinose) ของ Difco laboratories Detroit U.S.A.

แลคโตส (lactose) ของ Difco laboratories Detroit U.S.A.

ผงสกัดยีสต์ (yeast extract) ของ Difco laboratories Detroit U.S.A.

โซเดียมไนเตรต (sodium nitrate) ของ May and Baker Ltd. Dagenham England

แอมโมเนียมไนเตรต (ammonium nitrate) ของ E. Merck Darmstadt Germany

ยูเรีย (urea) ของ Matheson Coleman & Bell Ohio U.S.A.

1.2. เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์กรดกลูโคนิค

แอมโมเนียมออกซาเลต (ammonium oxalate) ของ May and Baker Ltd. Dagenham England

โซเดียมออกซาเลต (sodium oxalate) ของ May and Baker Ltd. Dagenham England

โปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต (potassium permanganate) ของ BDH laboratory Chemicals Ltd. Pools England

กรดซัลฟุริก (sulphuric acid) ของ Mallinckrodt Inc. Kentucky U.S.A.

1.3. เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

กรดไดไนโตรซาลิซิลิก (dinitrosalicylic acid) ของ E. Merck Darmstadt Germany

โซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตรต (sodium potassium tartrate) ของ May and Baker Ltd. Dagenham England

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ของ E. Merck Darmstadt Germany

พีจีโอ เอนไซม์ (PGO enzymes) ของ Sigma St.Louis U.S.A.

ไดอะนิซิดีน (O-dianisidine) ของ Sigma St.Louis U.S.A.

ฟีนอล (phenol) ของ E. Merck Darmstadt Germany

2. <u>เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย</u>

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-10 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. U.S.A.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. U.S.A.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)รุ่น spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb U.S.A.

เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น 70 ของบริษัท Beckman U.S.A.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-3D ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation Tokyo Japan

ตู้อบแห้ง (dryer) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert GmbH Germany

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co.Ltd. Tokyo Japan

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการทดลอง

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153 ที่ได้แยกและคัดเลือกจากดินในประเทศไทยพบว่ามีความสามารถในการผลิตกรดกลูโคนิคได้สูงจากงานวิจัยของ รศ.กรรณิกา จันทรสอาด ซึ่งได้รับทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ2530 เลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งโปเตโตเดกซ์โตรส(potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก.) จนเติบโตดีแล้วเก็บรักษาที่ 4-8 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ตลอดการทดลอง

2. การเตรียมหัวเชื้อ

2.1. หัวเชื้อที่เป็นสปอร์แขวนลอย (spore suspension)

เลี้ยง Aspergillus sp.สายพันธุ์G153 ในอาหารแข็งโปเตโตเดกซ์โตรสที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)นาน 5 วัน เติมน้ำกลั่นผสม Tween 80 0.1% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ เขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาลอยในน้ำ ปรับจำนวนให้เท่ากับ $2.5\text{-}5.0\times10^{7}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรหรือตามที่ระบุในแต่ละการทดลองโดยนับจำนวนด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)

2.2. หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ที่งอกแล้ว (germinated spore)

นำสปอร์แขวนลอยของ Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 ที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 2.1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่2 (ภาคผนวก ก.) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 16 ชั่วโมง

3. การเลี้ยงเชื้อรา Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153 เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค

ถ่ายหัวเชื้อชนิดสปอร์แขวนลอยหรือสปอร์ที่งอกแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่1 (ภาคผนวก ก.)หรือสูตรอื่นๆตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วันหรือตามสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ระบุในแต่ละการทดลอง

4. การเก็บเกี่ยว (harvest) กรดกลูโคนิค

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรา Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 ครบตามเวลาที่ต้องการแล้ว นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราเติบโตอยู่มากรองแยกสายใยด้วยกระดาษกรอง Whatmanเบอร์ 1 นำน้ำใสที่ได้ไปตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิค ปริมาณน้ำตาล ตามวิธีการในข้อ 5 และ 6 ตามลำดับ ส่วนสายใยนำไปตรวจการเติบโตตามวิธีการในข้อ 7

5. การตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิค

ใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่ละลาย (soluble calcium analysis)(38,39) โดยนำน้ำหมักที่ได้จากการกรองในข้อ4 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตที่มีความเข้มข้น 2.5 % ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปต้มเดือดเบาๆเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็น กรองตะกอนที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Toyo เบอร์ 5C 2 ชั้น ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน 4-5 ครั้ง ละลายตะกอนที่ได้นั้นด้วยกรดซัลฟุริกที่มีความเข้มข้น 20% 2-3 ครั้ง นำไปติเตรตหาปริมาณกรดกลูโคนิคกับสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

6. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

6.1. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ใช้วิธีการทำปฏิกิริยากับฟีนอลและกรดซัลฟุริก (phenol and sulphuric acid)(40) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล 5% ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาณ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง หาค่าปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน

6.2. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ใช้วิธีของ Bernfeld (41) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่มีหมู่รีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก (Dinitrosalicylic acid reagent) (ภาคผนวก ข.) ปริมาณ 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร หาค่าปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน

6.3. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ใช้ระบบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสร่วมกับกลูโคสออกซิเดส (Peroxidase and Glucose oxidase : PGO enzymes)(42) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายพีจีโอเอนไซม์ (ภาคผนวก ข.) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

7. <u>การตรวจการเติบโตของเชื้อรา Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153</u>

นำสายใยที่ได้จากการกรองแช่ในกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 30-50 % เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นกรองสายใยออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างสายใย อบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักแห้งของสายใย

8. <u>การหาองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงสุด</u>

8.1. การหาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูง

ถ่ายหัวเชื้อชนิดสปอร์แขวนลอยของ <u>Aspergillus</u> sp สายพันธุ์ G153 ขนาด $2.5\text{-}5.0 \times 10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่1 (ภาคผนวก ก.) แปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนดังนี้:-

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

ผงสกัดยีสต์	0.05	0.1	0.2	0.4 และ 0.6%	(น้ำหนักต่อปริมาตร)
ยูเรีย	0.05	0.1	0.2	0.4 และ 0.6%	(น้ำหนักต่อปริมาตร)

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

โซเดียมไนเตรต	0.05	0.1	0.2	0.4 และ 0.6%	(น้ำหนักต่อปริมาตร)
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.05	0.1	0.2	0.4 และ 0.6%	(น้ำหนักต่อปริมาตร)
แอมโมเนียมไนเตรต	0.05	0.1	0.2	0.4 และ 0.6%	(น้ำหนักต่อปริมาตร)

เลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดตามวิธีในข้อ 3,4,5

8.2. การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อรา <u>Aspergillus</u> sp.สายพันธุ์ G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก.)ซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้หัวเชื้อชนิดสปอร์แขวนลอยที่มีขนาด 2.5-5.0x10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กันดังนี้ คือ กลูโคส ซูโครส มอลโตส ฟรุกโตส ราฟฟิโนส กาแลคโตสและแลคโตส 25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อรา ตามวิธีในข้อ 3 แล้วหาปริมาณการผลิตกรดตามวิธีการในข้อ 5

8.3. การหาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนจากการทดลองข้อ 8.2 ซึ่งให้ผลผลิตกรดสูงคือ กลูโคส ซูโครสและมอลโตส มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองนี้โดยแปรผันความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 เป็น 5 10 15 20 25 30 35 และ 40% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้หัวเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 8.2 ตรวจสอบปริมาณการผลิตกรดตามวิธีการในข้อ 5

8.4. การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจน

ถ่ายสปอร์แขวนลอยขนาด 2.5-5.0x10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่1 ใช้กลูโคส 25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เลือกแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งให้ผลผลิตกรดสูงเป็นแหล่งไนโตรเจน แปรผันอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจนคือ กลูโคส:แอมโมเนียมซัลเฟต เป็น 125:1 125:2 125:3 125:4 และ 125:5 เลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดและการเติบโตตามวิธีการในข้อ 5 และ 7

9. <u>การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิค</u>

9.1. การเตรียมหัวเชื้อที่ให้ผลผลิตกรดสูง

9.1.1. การทดลองหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้เชื้อรา <u>Aspergillus</u> sp.สายพันธุ์ G153 สร้างสปอร์จำนวนมากและที่ทำให้สปอร์งอกได้ดี

9.1.1.1. เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้สร้างสปอร์ได้จำนวนมาก

เพาะสปอร์ของ Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 1 ลูป (loop) ลงบนอาหารแข็ง 3 ชนิด คือ อาหารแข็งโปเตโตเดกซ์โตรส อาหารแข็งที่มีสูตรเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่2 (ภาคผนวก ก.) (ซึ่งให้ผลผลิตกรดสูงที่สุด) และอาหารแข็งสูตรที่ 3 (ภาคผนวก ก.) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 วัน ทำให้ได้สปอร์แขวนลอยด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นับจำนวนสปอร์ที่ได้ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ เปรียบเทียบจำนวนสปอร์จากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

9.1.1.2. เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้สปอร์งอกได้ดี

ถ่ายหัวเชื้อชนิดสปอร์ที่แขวนลอยขนาด $2.5\text{-}5.0\text{x}10^{7}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ อาหารเหลวโปเตโตเดกซ์โตรส อาหารเหลวสูตรที่ 2 และอาหารเหลวสูตรที่ 4 (ภาคผนวก ก.)ปริมาณ 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการงอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกชั่วโมงจนสปอร์งอกครบ 100%

9.1.2. การทดลองเปรียบเทียบผลผลิตกรดเมื่อใช้สปอร์ที่งอกแล้วในอาหารเหลวต่างชนิดกันเป็นหัวเชื้อ

ถ่ายสปอร์ที่งอกแล้วจากอาหารเหลว 3 ชนิด คือ อาหารเหลวโปเตโตเดกซ์โตรส อาหารเหลวสูตรที่2 และอาหารเหลวสูตรที่4 ในขนาด $2.5\text{-}5.0\text{x}10^{7}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้เวลาในการเตรียมหัวเชื้อ 3 ช่วงเวลาคือ:-

ช่วงที่ 1 ชั่วโมงที่สปอร์งอกครบ 100% ในอาหารเหลวแต่ละชนิด

ช่วงที่ 2 ชั่วโมงที่ 16 หลังจากเริ่มเพาะสปอร์

ช่วงที่ 3 ชั่งโมงที่ 24 หลังจากเริ่มเพาะสปอร์

ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 เลี้ยงเชื้อแล้วเปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิค

9.1.3. การหาชนิดและขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อ 2 ชนิดคือ สปอร์แขวนลอยและสปอร์ที่งอกแล้วเป็นเวลา 16 ชั่วโมงจากอาหารเหลวสูตรที่2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่2 โดยแปรผันขนาดหัวเชื้อทั้ง2ชนิดดังนี้ $2.5\text{-}5.0\times10^{6}$ $2.5\text{-}5.0\times10^{7}$ $2.5\text{-}5.0\times10^{8}$ และ $2.5\text{-}5.0\times10^{9}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดทุกวันจนครบ 8 วัน

9.2. การหาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

ถ่ายหัวเชื้อชนิดสปอร์ที่งอกแล้วจากอาหารเหลวสูตรที่2 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (วิธีการทดลอง 2.2) ขนาด $2.5\text{-}5.0\times10^{7}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 แปรผันปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเป็น 16 20 24 28 และ 32% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยเทียบจากปริมาณกลูโคสที่ใช้ เลี้ยงเชื้อแล้วตรวจสอบผลผลิตกรดทุกวันจนผลผลิตกรดคงที่

9.3. การเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคเมื่อแปรผันความเร็วของเครื่องเขย่าและชนิดของขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อชนิดสปอร์ที่งอกแล้วจากอาหารเหลวสูตรที่2 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (วิธีการทดลอง 2.2) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวย 3 แบบคือ ขวดแก้วทรงกรวยธรรมดา ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบ(baffled flask) และขวดแก้วทรงกรวยที่ใส่ขดลวดสเตนเลสอยู่ภายใน(รูปที่ 5) ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า แปรผันอัตราเร็วเป็น 100 200 และ 300 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง ตรวจปริมาณการผลิตกรดทุกวันเป็นเวลา 8 วัน

9.4. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิค

ถ่ายหัวเชื้อชนิดสปอร์ที่งอกแล้วจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง(วิธีการทดลอง 2.2)ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่2 ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที แปรผันอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อเป็น 25 28 30 33 35 และ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดทุกวันเป็นเวลา 8 วัน

10. <u>การตรวจการเติบโตของ Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153 เมื่อใช้แคลเซียมกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอน</u>

เลี้ยงเชื้อ <u>Aspergillus</u> sp.สายพันธุ์ G153 บนอาหารแข็งสูตรที่ 2 แต่ใช้แคลเซียมกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวแทนน้ำตาลกลูโคส เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน ตรวจการเติบโตโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (colony) ทุกวัน

11. <u>การตรวจการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพภายในขวดเขย่าในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรา Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค</u>

ทำการทดลองโดยเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตกรดสูงจากการทดลองข้างต้นดังนี้:-

หัวเชื้อ : สปอร์ที่งอกแล้ว 16 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2
อาหารเลี้ยงเชื้อ : อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2
สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ : ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบ
อัตราเร็วเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที
อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรด ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ การใช้น้ำตาลและการเติบโตทุกวันจนครบ 8 วัน

12. การผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้น้ำตาลจากการหมักข้าวแทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์

12.1. การเตรียมน้ำตาลจากการหมักข้าว

12.1.1. การหมักข้าวเพื่อให้ได้น้ำตาลโดยใช้เชื้อรา Rhizopus sp.

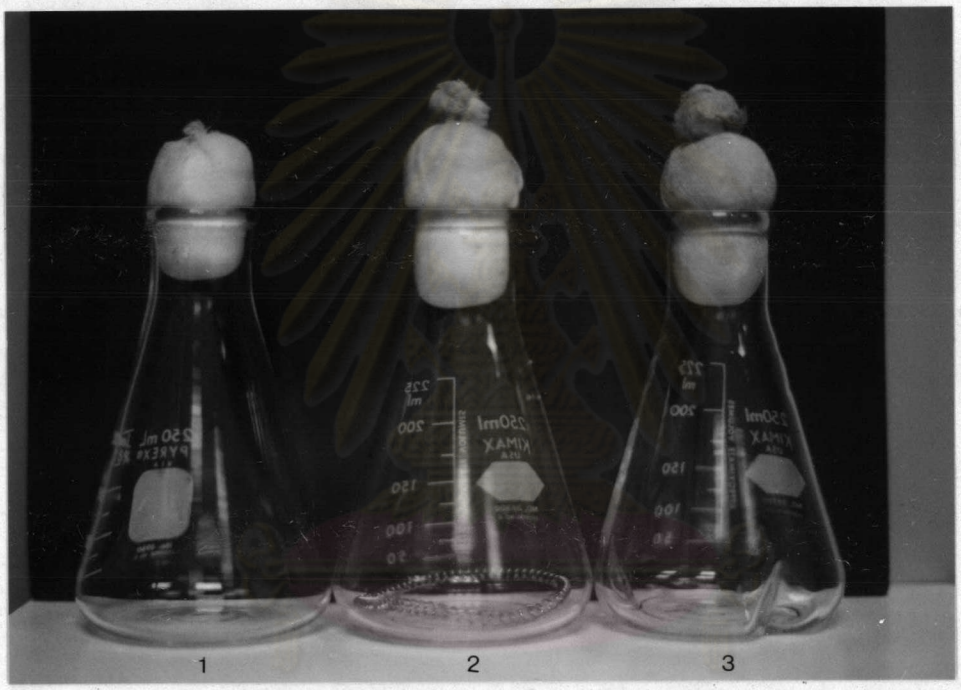
แช่ข้าวเหนียว 1/2 กิโลกรัมในน้ำ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วนำขึ้นมาสะเด็ดน้ำทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง นึ่งเป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วคลุกด้วยเชื้อรา Rhizopus sp.ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสได้สูง อายุ 7 วัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48-52 ชั่วโมง อบแห้งที่ 40-45 องศาเซลเซียส แล้วใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

12.1.2. การสกัดน้ำตาลออกจากข้าวหมัก

แช่ข้าวที่หมักแล้ว 1 ส่วนในน้ำ 2-3 ส่วน บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 12 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อเก็บน้ำหมักไว้ ก่อนนำไปใช้วัดหาความเข้มข้นของน้ำตาลด้วยมาตรดรรชนีหักเห (refractometer) และปริมาณกลูโคสด้วยระบบเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 6.3

12.2. การผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าว

ถ่ายหัวเชื้อชนิดสปอร์ที่งอกแล้วจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (วิธีการทดลอง 2.2) ขนาด $2.5-5.0 \times 10^7$ สปอร์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่2 ซึ่งได้เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวมีความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ25% ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการผลิตกรดทุกวันจนปริมาณกรดคงที่ การใช้น้ำตาลและการเติบโตของสายใยตามวิธีการในข้อ 5 , 6 และ 7 ตามลำดับ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 ลักษณะของขวดแก้วทรงกรวยทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้

(1) คือ ขวดแก้วทรงกรวยธรรมดา

(2) คือ ขวดแก้วทรงกรวยที่มีขดลวดอยู่ภายใน

(3) คือ ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบ