บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1 อุปกรณ์ที่สำคัญและเคมีภัณฑ์

2.1.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ

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

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

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

ตู้อบแห้ง (hot air oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert GmbH, Germany

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

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Memmert GmbH, Germany

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

ถังหมัก (fermenter) รุ่น EIM-FER 8009 MD และชุดควบคุมสภาวะของบริษัท L.E. Marubishi Co.Ltd., Japan

2.1.2 เคมีภัณฑ์

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

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ของบริษัท Fluka Chemica, Switzerland

เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท May and Baker Ltd. Dagenham, England

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$) ของบริษัท May and Baker Ltd. Dagenham, England

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท May and Baker Ltd. Dagenham, England

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท May and Baker Ltd. Dagenham, England

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท May and Baker Ltd. Dagenham, England

โซเดียมออกซาเลต ($C_2Na_2O_4$) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

แอมโมเนียมออกซาเลต ($(COONH_4)_2.H_2O$) ของบริษัท May and Baker Ltd. Dagenham, England

โปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต ($KMnO_4$) ของบริษัท BDH laboratory Chemicals Ltd., England

กรดไดไนโตรซาลิซิลิก ($C_7H_4N_2O_7$) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

กรดซัลฟุริก (H_2SO_4) ของบริษัท Mallinckrodt Inc. Kentucky, U.S.A.

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท E.Merck Darmstadt,Germany

โซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) ของบริษัท May and Baker Ltd. Dagenham, England

ฟีนอล (C_6H_5OH) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

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

ไดอะนิซิดีน ไดไฮโดรคลอไรด์ (O-dianisidine dihydrochloride) ของบริษัท Sigma St.Louis, U.S.A.

2.2 จุลินทรีย์

2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้หมักข้าว เป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอไมเลสและกลูโคอไมเลสได้สูง ได้แก่

Rhizopus oryzae

Aspergillus oryzae

Aspergillus niger

เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับอนุเคราะห์จาก ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิค ได้แก่

Aspergillus sp. G153

เป็นจุลินทรีย์ที่แยกและคัดเลือกจากดินในประเทศไทย และพบว่าสามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้ชนิดเดียว (Homofermentative gluconic acid fungus) จากงานวิจัยของ รศ.กรรณิกา จันทรสอาด ซึ่งได้รับทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชประจำปีงบประมาณ 2530 (กรรณิกา, 2530)

2.2.3 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยงสปอร์ของราทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้ลงบนอาหารแข็งเอียงโพเตโตเดกซ์โตรส (potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก.) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลานาน 5-7 วัน เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์เต็มที่แล้ว จึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ.

2.3 การเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. G153 เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค

2.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ถ่ายสปอร์ของ *Aspergillus* sp. G153 ลงในอาหารแข็งเอียงโปเตโตเดกซ์โตรส บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30-33°ซ.) นาน 5-7 วัน เติมน้ำกลั่นผสมทวีน 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ เขี่ยสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย ผสมให้เข้ากัน ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ 12.5-25x10^8 สปอร์ต่อมล. โดยนับจำนวนด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์(haemacytometer) ถ่ายสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้ปริมาตร 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 สำหรับเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 50 มล. (ภาคผนวก ก.) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. เพาะเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ ที่อุณหภูมิห้อง (30-33°ซ.)ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์งอก และใช้เป็นหัวเชื้อในทุก ๆ การทดลอง

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. G153 เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคในขวดทดลองขนาด 250 มล.

ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 1 มล.(2.5-5.0x10^7 สปอร์งอกต่อมล.) ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 2.3.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. แปรผันชนิดและปริมาณองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิค การเติบโต และการใช้น้ำตาลทุกวันจนสิ้นสุดการทดลอง

2.3.3 การเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. G153 เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมตามวิธีในข้อ 2.3.1 ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคสูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก.) ปริมาตร 2000 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เพาะเลี้ยงเชื้อโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 33°ซ. แปรผันอัตราการให้อากาศและการกวนตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง ตรวจหาปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิค การเติบโต และการใช้น้ำตาลกลูโคสทุก 6 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการทดลอง

2.3.4 การเก็บเกี่ยว (Harvest) กรดกลูโคนิค

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. G153 ครบตามเวลาที่ต้องการแล้ว นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราเติบโตอยู่ มากรองแยกสายใยด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 นำน้ำใสที่ได้ไปตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิค ปริมาณน้ำตาล และการเติบโตตามวิธีการในข้อ 2.4

2.4 วิธีการวิเคราะห์

2.4.1 การวิเคราะห์กรดกลูโคนิค

ใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่ละลาย (soluble calcium analysis) (Takao, 1965; Sasaki และ Takao, 1967)

นำน้ำหมักซึ่งได้กรองแยกสายใยออกแล้วด้วยกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 ปริมาตร 5 มล. ใส่ขวดทดลองขนาด 250 มล. เติมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตเข้มข้น 2.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 8 มล. นำไปต้มให้เดือดเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที กรองเก็บตะกอนที่ได้ด้วยกระดาษกรองโตโยเบอร์ 5 ซี (Toyo filter paper No.5 C) ล้างตะกอนด้วยน้ำปลอดประจุ ละลายตะกอนจนหมดด้วยกรดซัลฟุริกเข้มข้น 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร) กรองแยกตะกอนแคลเซียมซัลเฟตทิ้ง แล้วนำสารละลายกรดออกซาลิกที่ได้ไปติเตรตด้วยสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล แล้วคำนวณหาปริมาณกรดกลูโคนิคโดยคิดจากน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.2 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด

ใช้การทำปฏิกิริยาของฟีนอลและกรดซัลฟุริก (phenol and sulphuric acid) (Hanson และ Phillips, 1981)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มล. มาเติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาตร 5 มล. เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร หาค่าปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน

2.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

โดยวิธีการของ Bernfeld (Bernfeld,1955)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก (DNSA reagent) (ภาคผนวก ข.) ปริมาตร 1 มล. ลงในสารละลายตัวอย่างที่มีปริมาตร 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาค่าปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน

2.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ใช้ระบบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสร่วมกับกลูโคสออกซิเดส (Peroxidase and Glucose oxidase : PGO enzymes) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต (Sigma Chemical Company, 1980) ดังนี้

เติมสารละลายพีจีโอเอนไซม์ (ภาคผนวก ข.) 2.5 มล. ลงในสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.25 มล. เขย่าให้เข้ากัน แช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 37°ซ. นาน 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร หาค่าปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน

2.4.5 การวัดการเติบโตของเชื้อ *Aspergillus* sp. G153

นำสายใยของราที่ได้จากการกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 แช่ในกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 30% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 คืน แล้วกรองสายใยด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 ล้างสายใยด้วยน้ำปลอดประจุ อบแห้งที่ 80°ซ. จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของสายใย

2.4.6 การตรวจสอบเพื่อยืนยันชนิดของกรดที่สร้างขึ้นโดย *Aspergillus* sp. G153

เนื่องจาก *Aspergillus* sp. G153 ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้คัดเลือกมาตั้งแต่ปี พ.ศ.2530 และใช้ในงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตกรดกลูโคนิคมาจนถึงปัจจุบันนี้ จึงมีความจำเป็นต้องทำการตรวจสอบผลผลิตกรดจากเชื้อราสายพันธุ์นี้ว่ายังคงเป็นกรดกลูโคนิคหรือไม่

ได้ทำการตรวจสอบทั้งชนิดของกรด และจุดหลอมเหลวของเกลือแคลเซียมของกรดที่จุลินทรีย์นี้สร้างขึ้น

2.4.6.1 หาจุดหลอมเหลวของเกลือแคลเซียมกลูโคเนตที่สร้างโดย *Aspergillus* sp. G153 และเกลือแคลเซียมกลูโคเนตมาตรฐาน

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้แยกสายใยออกแล้ว มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 70-80°ซ. เพื่อระเหยน้ำออก 35% ตั้งทิ้งไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4-6°ซ. จนกระทั่งเกิดการตกตะกอนของแคลเซียมกลูโคเนตอย่างสมบูรณ์ แยกตะกอนล้างด้วยน้ำเย็น ทำให้แห้ง แล้วนำตะกอนดังกล่าวและแคลเซียมกลูโคเนตมาตรฐาน ไปหาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) model DSC 910 ของบริษัท Dupont

2.4.6.2 การวิเคราะห์หาชนิดของกรดที่สร้างขึ้นโดย *Aspergillus* sp. G153 ด้วยเครื่อง HPLC

นำเกลือแคลเซียมกลูโคเนตที่สร้างโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ มาทำให้ละลายในน้ำอุ่นแล้วเติมกรดซัลฟุริกลงไปในปริมาณที่พอเหมาะ นำน้ำใสไปตรวจสอบชนิดของกรดด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ (Shimadzu LC-3A) โดยใช้ Zorbox-C8 (L-3555)คอลัมน์ ขนาด 25 ซม. x 4.6 มม. ID ของบริษัท Dupont มี 20 มิลลิโมลาร์ กรดฟอสฟอริก pH 2.5 เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1 มล. ต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detector ที่ 210 นาโนเมตร

2.5 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายข้าวด้วยจุลินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน

2.5.1 การเตรียมน้ำตาลจากการหมักข้าว

2.5.1.1 การหมักข้าว ทำโดยแช่ข้าวเหนียว 0.5 กก. ในน้ำนาน 2 ชั่วโมง ทำให้สะเด็ดน้ำ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นึ่งนาน 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วคลุกด้วยเชื้อราที่มีเอนไซม์แอลฟาอไมเลสและกลูโคอไมเลสสูงได้แก่ *Rhizopus oryzae* หรือ *Aspergillus niger* หรือ *Aspergillus oryzae* อายุ 5 วัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48-52 ชั่วโมง อบแห้งที่ 40-45°ซ. แล้วใส่ถุงพลาสติกเก็บที่ 4°ซ. เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.5.1.2 สกัดน้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวด้วยน้ำ โดยใช้อัตราส่วนข้าวที่หมักต่อน้ำ เท่ากับ 1:2 บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ. อย่างน้อย 12 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อเก็บน้ำหมักไว้ วัดปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีการในข้อ 2.4.2 2.4.3 และ 2.4.4

2.5.2 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 1 มล. ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 2.3.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก.) และสูตรที่ 1 ซึ่งเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวจากข้อ 2.5.1.2 โดยปรับให้มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจการผลิตกรดกลูโคนิค เปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาล และการเติบโตของเชื้อตามวิธีในข้อ 2.4

2.6 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้แป้งไฮโดรไลเสสเป็นแหล่งคาร์บอน

2.6.1 ปรับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในแป้งไฮโดรไลเสสซึ่งได้รับจากบริษัทอายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ได้ผ่านการกรองและชนิดที่ไม่ได้ผ่านการกรอง เอาแป้งที่ไม่ได้ถูกย่อยสลายออก ให้เท่ากับ 25% แล้วใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก.) ใช้หัวเชื้อและสภาวะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 2.5.2 วัดผลผลิตกรดกลูโคนิคเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาล และการเติบโตของเชื้อตามวิธีในข้อ 2.4

2.6.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 แต่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในแป้งไฮโดรไลเสสชนิดที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 2.6.1 เป็น 20 25 และ 30% เปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิค

2.7 การใช้กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสสเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแอมโมเนียมซัลเฟต

เพาะเลี้ยง *Aspergillus* sp. G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก.) ซึ่งได้เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งไฮโดรไลเสสชนิดที่ผ่านการกรอง ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 25% และใช้กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสส (ภาคผนวก ก.) เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันปริมาณไนโตรเจนในกากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสสเป็น 10 15

20 25 55 และ 85 มก.ต่อ 100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้หัวเชื้อและสภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.5.2 วัดปริมาณผลผลิตกรดกลูโคนิคเทียบกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.4%

2.8 <u>การใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการผลิตกรดกลูโคนิค</u>

2.8.1 เพาะเลี้ยง *Aspergillus* sp. G153 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก.) ซึ่งได้เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งไฮโดรไลเสสชนิดที่ผ่านการกรองซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 25% ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.4% (85 มก.ไนโตรเจน ต่อ 100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อ) เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้น้ำประปาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้หัวเชื้อ 1 มล. ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มล. เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบผลผลิตกรดกลูโคนิค

2.8.2 เพาะเลี้ยง *Aspergillus* sp. G153 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ หัวเชื้อและสภาวะในการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 แต่ไม่เติมธาตุที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

2.8.2.1 เหล็กในรูป $FeSO_4.7H_2O$

2.8.2.2 เหล็กในรูป $FeSO_4.7H_2O$ และแมกนีเซียมในรูป $MgSO_4.7H_2O$

2.8.2.3 เหล็กในรูป $FeSO_4.7H_2O$ และแมกนีเซียมในรูป $MgSO_4.7H_2O$ และโปตัสเซียมในรูป KH_2PO_4

2.8.2.4 เหล็กในรูป $FeSO_4.7H_2O$ และแมกนีเซียมในรูป $MgSO_4.7H_2O$ และโปตัสเซียมในรูป KH_2PO_4 และแมงกานีสในรูป $MnSO_4.4H_2O$ ตรวจสอบการผลิตกรดกลูโคนิคและเปรียบเทียบผลผลิต

2.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการ เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เพาะเลี้ยง *Aspergillus* sp. G153 ตามวิธีการข้อ 2.3.3 แปรผันสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค ดังนี้

2.9.1 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

แปรผันความเข้มข้นของแป้งไฮโดรไลเสส โดยปรับให้มีน้ำตาลกลูโคส 10 15 20 และ 25% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2.9.2 อัตราการให้อากาศ

แปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 1.25 1.50 และ 1.75 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที

2.9.3 อัตราการกวน

แปรผันอัตราการกวนเป็น 400 500 และ 600 รอบต่อนาที

2.9.4 ปริมาณของหัวเชื้อ

แปรผันปริมาณของหัวเชื้อเป็น 5 7 และ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจสอบการผลิตกรดกลูโคนิค การใช้น้ำตาล และการเติบโตตามวิธีในข้อ 2.4