บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1. เคมีภัณฑ์

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

น้ำตาลซูโครส (Sucrose) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

น้ำตาลมอลโตส (Maltose) ของบริษัท Difco laboratories, U.S.A.

น้ำตาลแลกโตส (Lactose monohydrate) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

น้ำตาลฟรุกโตส(Fructose) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany.

น้ำตาล ดี(+)ไซโลส (D(+)Xylose) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

น้ำตาลทรายขาวมิตรผล ของบริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด

น้ำตาลทรายแดงมิตรผล ของบริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด

กรดมะนาว (Citric acid) ของบริษัท Riedel-deHaen, Germany.

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

แอมโมเนียมไนเตรต ($NH_4 NO_3$) ของบริษัท Fluka AG Buch, Switzerland.

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany.

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7\ H_2O$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

คอร์นสตีพลิเคอร์ (corn steep liquor) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

โซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany.

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Riedel - deHaen, Germany.

โบรมีน (Br_2) ของบริษัท Farmitalia Carlo erba, Italy.

โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

โปตัสเซียมโบรไมด์ (KBr) ของบริษัท Riedel - deHaen, Germany.

โปตัสเซียมไอโอไดด์ (KI) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

แป้ง (soluble starch) ของบริษัท Difco laboratories, U.S.A.

กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

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

ฟีนอล (Phenol) ของบริษัท Riedel - deHaen, Germany.

กรดซัลฟุริก (H_2SO_4) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

เอทธิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด ไดโซเดียมซอลต์ (EDTA disodium) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ ($Na_2Fe(CN)_5No.2H_2O$) ของบริษัท E. merck Darmstadt, Germany.

โซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท E. merck Darmstadt, Germany.

โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) ของบริษัท Clorox Ltd., U.S.A.

2. อุปกรณ์ที่สำคัญ

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

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) รุ่น UV 160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

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

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

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) รุ่น O-270 ของบริษัท Memmert GmbH, Germany.

อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิเมตร ของบริษัท Boeco, Germany.

คอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (glass bubble column) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 6.5 เซนติเมตร ความยาวคอลัมน์ 80 เซนติเมตร ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร.ชินอิชิ คิโนชิตะ (Prof.Dr. Shinichi Kinoshita) แห่งมหาวิทยาลัยออกไกโด ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องอัดอากาศ (air compressor) Puma รุ่น PP-1 ของบริษัท ธีรวัฒน์เครื่องอัดลม จำกัด

แผ่นกรองอากาศ (air filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ของบริษัท Gelman Science Inc., U.S.A.

เครื่องวัดปริมาณอากาศ (airflow meter) รุ่น RK-1050 ของบริษัท KOFLOC, Japan.

ถังหมัก (fermentor) รุ่น MD 300 ขนาด 5 ลิตร และชุดควบคุมสภาวะ ของบริษัท L.E. Marubishi Co., Ltd., Japan.

ไอโอดีนฟลาสก์ (iodine flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร ของบริษัท Bibby Sterilin, Ltd., England.

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

คอลัมน์ Zorbox-C8 (L-8555) ขนาดความยาว 25 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร ของบริษัท Dupont, U.S.A.

คอลัมน์ Spherisorb-C18 (S5ODS2) ของบริษัท Phase Separation, U.S.A.

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

1. <u>จุลินทรีย์</u>

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ *Aspergillus terreus* I 10 มีความสามารถในการผลิตกรดอิตาโคนิก (อุษา กรีอักษร, 2535)

2. <u>การเก็บรักษาเชื้อ</u>

เชื้อสปอร์ของเชื้อรา *A. terreus* I 10 โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อลากลงบนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส (potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก 1) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-6 วัน เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บที่ 4-8 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมหัวเชื้อ

3.1 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์แขวนลอย

เพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 บนอาหารแข็งเอียงโปเตโต-เด็กซ์โตรส ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4-6 วัน เติมน้ำกลั่นผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดกระจายในน้ำ ปรับจำนวนให้เท่ากับ $1-2 \times 10^{8}$ สปอร์ต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร โดยนับจำนวนด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้เป็นหัวเชื้อชนิดสปอร์แขวนลอยเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอก

ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่ปรับจำนวนสปอร์ให้ได้ $5-10 \times 10^{8}$ สปอร์ต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอก (ภาคผนวก ก 2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วใช้เป็นหัวเชื้อสปอร์งอก ที่มีความหนาแน่นของสปอร์เป็น $1-2 \times 10^{8}$ สปอร์งอกต่อ 1 มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. การผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์แขวนลอยหรือสปอร์งอกที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 หรือ 3.2 ตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิกสูตรที่ 1 ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.0 (Pfeifer et al., 1952) (ภาคผนวก ก 3) หรือสูตรอื่นๆ ตามที่ระบุในการทดลอง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีด้วยความเร็ว 200

รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน หรือตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง

5. การเก็บเกี่ยว (harvest) กรดอิตาโคนิก

กรองแยกสายใย *A. terreus* I 10 ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำน้ำใสไปตรวจหาปริมาณกรดอิตาโคนิก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือตามวิธีดำเนินการทดลองในข้อ 7 และ 9 ตามลำดับ ส่วนสายใยนำไปวัดการเติบโตตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 6

6. การวัดการเติบโตของเชื้อ *A. terreus* I 10

นำสายใยที่ได้จากการกรองในข้อ 5 มาทำให้แห้ง โดยอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของสายใย

7. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอิตาโคนิกด้วยวิธีโบรมิเนชัน (Bromination Method) (Friedkin, 1945)

ปิเปตน้ำหมักที่ได้กรองแยกสายใยออกแล้วปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในไอโอดีนฟลาสก์ (ภาคผนวก ง) เติมน้ำโบรมีน (ภาคผนวก ข 1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 10 นาที แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วเติมสารละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์เข้มข้น (ภาคผนวก ข 2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้น 10 นาที จึงนำไปไทเตรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล (ภาคผนวก ข 3) โดยใช้สารละลายแป้งความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นตัวบ่งชี้ คำนวณหาปริมาณกรดอิตาโคนิกโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก จ 1)

8. การวิเคราะห์กรดอิตาโคนิกที่สร้างขึ้นโดย *A. terreus* I 10 ด้วยวิธี HPLC

นำน้ำหมักที่ได้จากการผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ตลอดการวิจัย มาตรวจสอบกรดอิตาโคนิกด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์-ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (Shimadzu LC-3A) โดยใช้คอลัมน์ Zorbox-C8 (L-3555) ขนาดความยาว 25 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร โดยใช้กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 2.5 เป็นตัวนำ อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และคอลัมน์ Spherisorb-C18 (S5ODS2) โดยใช้กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 2.5 เป็นตัวนำ อัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้องตรวจผลโดย UV Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกรดอิตาโคนิกมาตรฐาน และมีกรดกลูโคนิกเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard)

9. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

9.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้การทำปฏิกิริยาของฟีนอลและกรดกำมะถัน (Hansen และ Phillips, 1981)

เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำหมักที่ทำให้เจือจางจนได้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสม เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เขย่าแรง ๆ ตั้งทิ้งต่อไปอีกประมาณ 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตรหาค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค 2)

9.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Bernfeld (Bernfeld , 1955)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA) (ภาคผนวก ข 4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดแก้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค 3)

9.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยใช้วิธี HPLC

นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. ferreus* I 10 มาตรวจสอบด้วยเครื่องไอเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (Shimadzu LC-3A) โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb 10-NH2 (Phenomenex) ใช้อะซิโตไนไตรล์ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย refractive index detector (RID) โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลฟรุกโตสมาตรฐาน

10. <u>การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักโดยใช้วิธีของ Kempers</u> (Kempers, 1974)

นำน้ำหมักที่กรองแยกสายใยออกแล้วมาทำให้เจือจาง ให้ได้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม เติมน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ (ภาคผนวก ข 5) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EDTA (ภาคผนวก ข 6) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพรัสไซด์รีเอเจนท์ (ภาคผนวก ข 7) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์รีเอเจนท์ (ภาคผนวก ข 8) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 25

มิลลิลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 636 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียม และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 636 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค 4) จากนั้นนำมาหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)} = \frac{A_{636} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times 132}{\text{ความชัน} \times 5 \times 1000 \times 28}$$

28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจน ในแอมโมเนียมซัลเฟต

132 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมซัลเฟต

11. <u>การหาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมขององค์ประกอบหลัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก</u>

11.1 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก

เพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในขวดเขย่าโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมโดยวิธีการข้อ 3.1 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 แปรชนิดของแหล่งคาร์บอน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิกเป็น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลแลกโตส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และกรดซิตริก โดยใช้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนเป็น 66 กรัมต่อลิตร วัดปริมาณกรดอิตาโคนิก การเติบโต และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิก เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน

i 17426625

11.2 การหาชนิด และปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดอิตาโคนิก

11.2.1 การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลิตกรดอิตาโคนิกในขวดเขย่า โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 11.1 คือ น้ำตาลซูโครส แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต โดยจัดให้ปริมาณไนโตรเจนในแหล่งไนโตรเจนทุกแหล่งเท่ากับปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต 2.7 กรัมต่อลิตร ใช้ภาวะต่าง ๆ ตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 วัดปริมาณกรดอิตาโคนิก การเติบโต และปริมาณน้ำตาลที่เหลือทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน

11.2.2 การหาปริมาณที่เหมาะสม ของแหล่งไนโตรเจนชนิดที่เหมาะสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลิตกรดอิตาโคนิกในขวดเขย่า โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม จากการทดลองข้อ 11.1 และ 11.2.1 คือ น้ำตาลซูโครส แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต ตามลำดับ โดยแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.44 0.87 1.31 และ 2.62 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.0926 0.1851 0.2777 และ 0.5553 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ โดยแปรผันจากปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิกสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก 3) และแปรผันปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้ในการทดลอง คือ แปรผันปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตเท่ากับ 0.2647 0.5291 0.7938 และ 1.5874 กรัมต่อลิตร วัดปริมาณกรดอิตาโคนิก การเติบโต และการใช้น้ำตาล ทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดและปริมาณต่างกัน

11.3 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณคาร์บอน ต่อปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ผลผลิตกรดอิตาโคนิกสูง

ผลิตกรดอิตาโคนิกในขวดเขย่า โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 11.1 คือน้ำตาลซูโครส และมีชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 11.2 คือ แอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมโดยวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3.1 แปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 300 ต่อ 1 300 ต่อ 2 300 ต่อ 3 300 ต่อ 4 300 ต่อ 5 และ 300 ต่อ 6 วัดปริมาณกรดอิตาโคนิก การเติบโต ปริมาณน้ำตาล ทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน แล้วเปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิก เมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนต่างๆกัน

11.4 การหาปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิก โดย ใช้อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณคาร์บอน และปริมาณไนโตรเจน

ผลิตกรดอิตาโคนิกในขวดเขย่าโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมโดยวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน จัดอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนให้เหมาะสม คือ 300 ต่อ 4 ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 11.3 แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 56 66 และ 76 กรัมต่อลิตร โดยยังคงให้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเหมาะสม วัดปริมาณกรดอิตาโคนิก การเติบโต ปริมาณน้ำตาล ทุกวัน เป็นเวลานาน 10 วัน แล้วเปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิก

12. การหาภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก

12.1 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในขวดเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 66 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟต

ความเข้มข้น 1.75 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งให้อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ 300 ต่อ 4 ที่ได้จากการทดลองข้อ 11 ใช้หัวเชื้อที่เตรียมโดยวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3.1 โดยใช้ภาวะต่าง ๆ ตามวิธีดำเนินการข้อ 4 แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่อการผลิตกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 และ 5.0 โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิก

12.2 การหาอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดอิตาโคนิก

เพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในขวดเขย่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเนื่อการผลิตกรดอิตาโคนิกที่ได้จากการทดลองข้อ 11 (ภาคผนวก ก 4) หรือคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 66 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.75 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 ซึ่งได้จากการทดลอง 12.1 ใช้หัวเชื้อที่เตรียมโดยวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3.1 โดยใช้ภาวะต่าง ๆ ตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 แปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 28 30 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส) เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกเมื่อใช้อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน

13. การเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอกที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอิตาโคนิกสูง

13.1 การหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ทำให้ *A. terreus* I 10 สร้างสปอร์จำนวนมาก

13.1.1 การเตรียมอาหารวุ้นชนิดเอียง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโปเตโตเด็กซ์โตรส (ภาคผนวก ก 1) และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีสูตรเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเนื่อการ

ผลิตกรดอิตาโคนิก (ภาคผนวก ก 4) แต่เพิ่มวุ้นผงหนัก 17 กรัมลงในส่วนผสม ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร ที่มีจุกทำด้วยสำลี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำเอียงด้วยมุมที่เท่ากัน เพื่อให้พื้นที่ผิวของอาหารวุ้นเอียงใกล้เคียงกันมากที่สุด

13.1.2 เปรียบเทียบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ที่ทำให้สร้างสปอร์ได้จำนวนมาก

เพาะสปอร์ของ *A. terreus* I 10 ปริมาณ 1 ห่วง เขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็งเอียงทั้งสองชนิดที่เตรียมได้จากวิธีดำเนินการทดลองข้อ 13.1.1 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 6 วัน เติมน้ำกลั่นผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดกระจายในน้ำ นับจำนวนสปอร์ที่ได้ ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หาค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำนับ 5 ครั้ง เปรียบเทียบจำนวนสปอร์จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดในแต่ละวันทุกวัน เป็นเวลา 6 วัน เลือกอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ทำให้ *A. terreus* I 10 สร้างสปอร์จำนวนมาก สำหรับการทดลองต่อไป

13.2 การหาช่วงเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้สปอร์งอกสมบูรณ์และไม่เกาะกลุ่ม โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด

ชุดที่ 1 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่ เม็ดแก้ว (Glass beads)

เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับวิธีการทดลองข้อ 8.2 โดยถ่ายสปอร์แขวนลอยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอก (ภาคผนวก ก 2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจนับการงอกของสปอร์ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนับทุก 8 ชั่วโมง จนกว่าสปอร์งอกสมบูรณ์หรือ

ไม่งอกเพิ่ม

ชุดที่ 2 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่เม็ดแก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 และ 4 มิลลิเมตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอก (ภาคผนวก ก 2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเม็ดแก้ว หนัก 15 กรัม โดยแปรผันขนาดของเม็ดแก้วเป็น 2 และ 4 มิลลิเมตร โดยมีชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่เม็ดแก้ว บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจนับการงอกของสปอร์ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด โดยนับทุก 3 ชั่วโมง ตรวจการงอก และการเกาะกลุ่มของสปอร์ที่งอกแล้ว โดยเทียบกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่เม็ดแก้ว

13.3 การหาความหนาแน่นที่เหมาะสมของหัวเชื้อสปอร์งอก

ผลิตกรดอิตาโคนิกในขวดเขย่า โดยถ่ายหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมง ที่ได้จากการเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอกตามวิธีการทดลองข้อ 3.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก (ภาคผนวก ก 4) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.5 ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 12.1 ใช้ภาวะต่าง ๆ ตามวิธีดำเนินการข้อ 4 โดยแปรผันความหนาแน่นของหัวเชื้อเท่ากับ $1-2\times10^{7}$ $1-2\times10^{8}$ และ $1-2\times10^{9}$ สปอร์งอก เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกเมื่อใช้หัวเชื้อความหนาแน่นต่าง ๆ กัน

13.4 การหาการเติบโตของ *A. terreus* I 10 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

เพาะเลี้ยงหัวเชื้อสปอร์งอกตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3.2 และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดที่ทำให้ *A. terreus* I 10 สร้างสปอร์จำนวนมากที่ได้จากการทดลองข้อ 13.1 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโปเตโตเด็กซ์โตรส และใส่เม็ดแก้วขนาดเหมาะสมที่ได้จากการทดลองชุดที่ 2 ข้อ 13.2 คือใช้เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร

หนัก 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอก 50 มิลลิลิตร ใช้ความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกที่เหมาะสมจากข้อ 13.3 คือ $1-2 \times 10^{8}$ สปอร์งอก เพาะเลี้ยงสปอร์ให้ได้สายใย วัดการเติบโตของสายใยทุก 3 ชั่วโมง จนการเติบโตคงที่หรือลดลง

13.5 การหาอายุที่เหมาะสมของหัวเชื้อสปอร์งอก

ผลิตกรดอิตาโคนิกในขวดเขย่า โดยถ่ายหัวเชื้อความหนาแน่นเท่ากับ $1-2 \times 10^{8}$ สปอร์งอกต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร อายุต่างกัน คือ 24 36 48 และ 60 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก 4) ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 ใช้ภาวะต่าง ๆ ตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 ทำการผลิตเป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกเมื่อใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุแตกต่างกัน

14. ผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับขยายส่วน

14.1 การผลิตกรดอิตาโคนิกโดยใช้แหล่งน้ำตาลชูโครสต่างกัน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ผลิตกรดอิตาโคนิกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก (ภาคผนวก ก 4) ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งต้นเท่ากับ 4.5 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 36 ชั่วโมง ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ $1-2 \times 10^{8}$ สปอร์งอกต่อมิลลิลิตร โดยใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 30 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง กำหนดอัตราการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ใช้อะดีคานอลเป็นสารกำจัดฟอง โดยแปรผันชนิดของแหล่งน้ำตาลชูโครสเป็นน้ำตาลชูโครสบริสุทธิ์ น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายแดง วัดปริมาณกรดอิตาโคนิก การเติบโต และปริมาณน้ำตาล ทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกเมื่อใช้แหล่งน้ำตาลชูโครสต่าง ๆ กัน

14.2 การผลิตกรดอิตาโคนิกโดยใช้ขนาดหัวเชื้อแตกต่างกัน

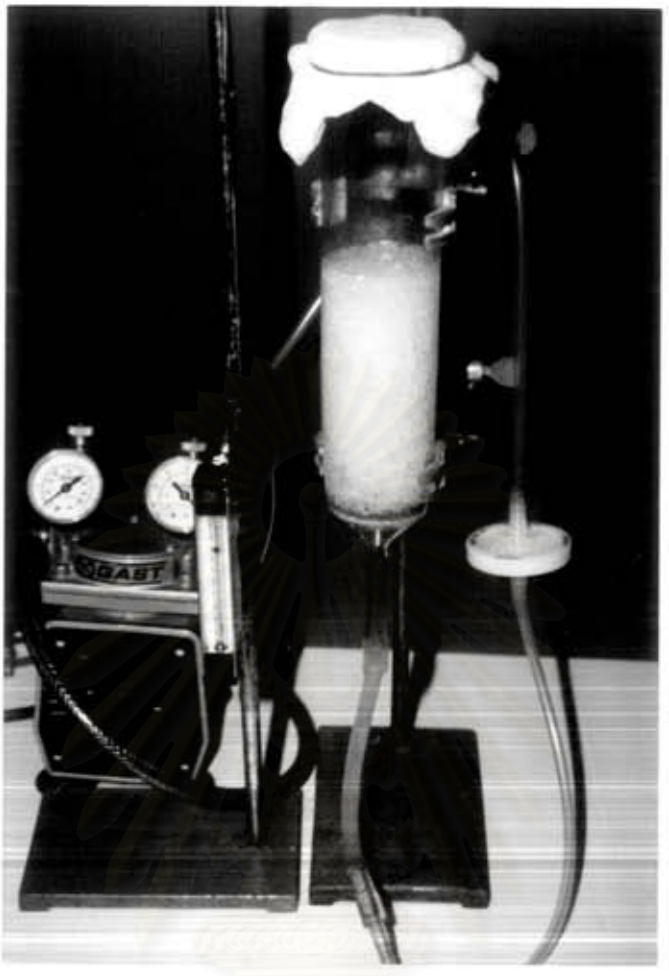
ทำการทดลองโดยผลิตในถังหมัก 2 แบบ

14.2.1 การผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

14.2.1.1 การเตรียมคอลัมน์แก้ว

ยึดคอลัมน์แก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 6.5 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร กับขาตั้งเหล็ก โดยให้คอลัมน์ทำมุม 90 องศากับแนวระนาบด้านล่างของคอลัมน์แก้ว มีแผ่นกรองกระจายอากาศซินเตอร์กลาส (sintered glass) ซึ่งทำหน้าที่รองรับสายใยที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์แก้ว และเป็นตัวกระจายอากาศเข้าสู่คอลัมน์แก้ว ปลายล่างสุดของคอลัมน์แก้วต่อเข้ากับแผ่นกรองอากาศ (air filter) และเครื่องอัดอากาศ (air compressor) ตามลำดับ โดยสายยางซิลิโคน (silicone tube) เมื่ออากาศผ่านเข้าคอลัมน์แล้วจะออกสู่ภายนอกทางด้านบนของคอลัมน์แก้วซึ่งมีจุกสำลีปิดอยู่ (รูปที่ 4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 การผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

14.2.1.2 การผลิตกรดอิตาโคนิก

ผลิตกรดอิตาโคนิก ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรสำหรับการผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับขยายส่วน (ภาคผนวก ก 5) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส) จัดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ใช้อะดีคานอลเป็นสารกำจัดฟอง แปรผันขนาดของหัวเชื้อเป็น 1 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) วัดปริมาณกรดอิตาโคนิก การเติบโต และปริมาณน้ำตาล ทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิก เมื่อใช้หัวเชื้อขนาดต่าง ๆ กัน

14.2.2 การผลิตกรดอิตาโคนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ปฏิบัติเช่นเดียวกับวิธีดำเนินการทดลองข้อ 14.1 แต่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว (ภาคผนวก ก 5) แปรผันขนาดหัวเชื้อเป็น 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) วัดปริมาณกรดอิตาโคนิก การเติบโต และปริมาณน้ำตาลทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกเมื่อใช้หัวเชื้อขนาดต่าง ๆ กัน

14.3 การผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยใช้อัตราการให้อากาศแตกต่างกัน

ผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 14.2.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรสำหรับการผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับขยายส่วน (ภาคผนวก ก 5) ใช้ขนาดหัวเชื้อที่เลือกจากการทดลองข้อ 14.2.1 คือ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) แปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 2.5 5 และ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที วัดปริมาณกรดอิตาโคนิก การเติบโต ปริมาณน้ำตาล ทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกเมื่อใช้อัตราการให้อากาศต่าง ๆ กัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย