บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1. เคมีภัณฑ์

1.1 เคมีภัณฑ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

น้ำตาลทรายมิตรผล ของบริษัทมิตรผล, ประเทศไทย

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ของบริษัท Calro, Italy

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

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท May and Baker Ltd., England

เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd., England

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

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)ของบริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd., England

1.2 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์กรดกลูโคนิกและน้ำตาล

กรดไดไนโตรซาลิไซลิก ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ของบริษัท Mallinckrodt Inc. Kentucky U.S.A.

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

คริสทีอีนไฮโดรคลอริก ของบริษัท Sigma, England

คาร์บาโซล ของบริษัท Sigma, England

โปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต ($KMnO_4$) ของบริษัท BDH Laboratory Chemicals

Ltd., England

ฟีนอล (C_6H_5OH) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

ฟีนอลธาลีน ของบริษัท Fluka AG Buch, Switzerland

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

1.3 เคมีภัณฑ์อื่นๆ

ทวีน 80 ของบริษัท BDH Laboratory Chemical Ltd., England

โปแตสเซียมคลอไรด์ ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

เอทธิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (EDTA) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

โซเดียมไนโตรฟรัสไซด์ ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

ไฮโปคลอไรด์ ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

2. เครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A.

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

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberbean 2000 ของบริษัท Beckman, USA.

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

หม้ออบค่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hireyama Manufacturing Corporation, Japan

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

ถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ของบริษัท L.E. Marubishi Co.Ltd., Japan

ถังหมักขนาด 5 ลิตร ของบริษัท L.E. Marubishi Co.Ltd., Japan

ชุดควบคุมสภาวะถังหมัก รุ่น EC 2000 ของบริษัท Eyela, Japan

เครื่องวัดปริมาณอากาศ (rotameter) ของบริษัท Brooks instument division emerson electric Co, USA

เครื่องให้อากาศ (air pump) รุ่น APN-110KVX-4 และรุ่น APN-240NAN-4 ของบริษัท Iwaki, Co., Ltd., Japan

เครื่องโครมาโตรกราฟฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่นLC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan และ UV detector รุ่น 4100 ของบริษัท LDC

เครื่องโครมาโตรกราฟฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่นLC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan และ RI detector รุ่น refracto monitor ของบริษัท LDC Analytical

Ltd., England

ฟีนอล (C_6H_5OH) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

ฟีนอลธาลีน ของบริษัท Fluka AG Buch, Switzerland

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

1.3 เคมีภัณฑ์อื่นๆ

ทวีน 80 ของบริษัท BDH Laboratory Chemical Ltd., England

โปแตสเซียมคลอไรด์ ของบริษัท J.T. Baker, U.S.A.

เอทธิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (EDTA) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

โซเดียมไนโตรฟรัสไซด์ ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ของบริษัท J.T. Baker, U.S.A.

2. เครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A.

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

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberbean 2000 ของบริษัท Beckman, USA.

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

หม้ออบค่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hireyama Manufacturing Corporation, Japan

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

ถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ของบริษัท L.E. Marubishi Co.Ltd., Japan

ถังหมักขนาด 5 ลิตร ของบริษัท L.E. Marubishi Co.Ltd., Japan

ชุดควบคุมสภาวะถังหมัก รุ่น EC 2000 ของบริษัท Eyela, Japan

เครื่องวัดปริมาณอากาศ (rotameter) ของบริษัท Brooks instument division emerson electric Co, USA

เครื่องให้อากาศ (air pump) รุ่น APN-110KVX-4 และรุ่น APN-240NAN-4 ของบริษัท Iwaki, Co., Ltd., Japan

เครื่องโครมาโตรกราฟฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่นLC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan และ UV detector รุ่น 4100 ของบริษัท LDC

เครื่องโครมาโตรกราฟฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่นLC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan และ RI detector รุ่น refracto monitor ของบริษัท LDC Analytical

วิธีการดำเนินการทดลอง

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *Aspergillus niger* G153 ที่แยกและคัดเลือกจากดินในประเทศไทย (กรรณิกา จันทรสอาด , 2530) จุลินทรีย์ชนิดนี้ผลิตกรดอินทรีย์ชนิดกรดกลูโคนิกเพียงชนิดเดียว (รติกร กัณฑะพงศ์, 2534; จินตนา ไกรวัฒนพงศ์, 2536 ; บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536; นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539; เยาวภา ทองอร่าม, 2540)

2. การเก็บรักษา *Aspergillus niger* G153

เพาะเลี้ยงสปอร์ของ *Aspergillus niger* G153 ลงบนอาหารแข็งเอียงโปเทโทเดกซ์โทรส (ภาคผนวก ก.1) ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมหัวเชื้อของ *Aspergillus niger* G153 (อุษา ปียบงการ, 2538)

เพาะเลี้ยงสปอร์ของราดังกล่าวลงบนอาหารแข็งเอียงโปเทโทเดกซ์โทรสที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนตอยู่ด้วย บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้ได้สปอร์จำนวนมาก เติมน้ำปลอดประจุผสมทวีน 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ เขี่ยสปอร์ให้หลุดกระจายในน้ำ นำมานับจำนวนด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ให้ได้เท่ากับ 1-2X10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.2) บนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30$\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ได้หัวเชื้อขนาด 2-5X10^7 สปอร์งอกต่อมิลลิลิตร

4. การหาปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตจากน้ำตาลทรายโดยมีน้ำตาลฟรักโตสเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองในระดับขวดเขย่า

ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกที่ได้ทดลองมาแล้วว่าให้ผลผลิตสูง (รติกร กัณฑะพงศ์, 2534; บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536) แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทราย

(ภาคผนวก ก.3) ใช้หัวเชื้ออายุ 16-18 ชั่วโมง ขนาด 2-5X10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ (อุษา ปิยะบงการ, 2538) เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส แปรผันภาวะบางประการดังนี้

4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลทรายในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดกลูโคนิก

ถ่ายหัวเชื้ออายุ 16-18 ชั่วโมง ขนาด 2-5X10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก (ภาคผนวก ก.3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเป็น 200 250 300 350 400 450 500 และ 550 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0-6.5 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตตลอดการทดลอง ตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิกตามวิธีการข้อ 8.1 น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์และน้ำตาลฟรักโทสที่ได้จากการผลิตตามวิธีการข้อ 9.1 9.2 และ 9.3 ตามลำดับ

4.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน

ผลิตกรดกลูโคนิกเช่นเดียวกับข้อ 4.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบอื่นๆ เช่นเดียวกับในภาคผนวก ก.3 แต่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะซึ่งได้จากผลการทดลองข้อ 4.1 คือ 450 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ แปรผันอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเป็น 250:0.25 250:0.5 250:1 และ 250:1.5 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0-6.5 โดยแคลเซียมคาร์บอเนตตลอดการทดลอง ตรวจสอบและเปรียบเทียบการผลิตกรดกลูโคนิกตามวิธีการข้อ 8.1 น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์และน้ำตาลฟรักโทสที่ได้จากการผลิตตามวิธีการข้อ 9.1 9.2 และ 9.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 9 การแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	น้ำตาลทราย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณคาร์บอนในน้ำตาลทราย	แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต
250:0.25	450	189.47	0.891	0.189
250:0.5	450	189.47	1.786	0.379
250:1	450	189.47	3.573	0.758
250:1.5	450	189.47	5.360	1.137

5. การหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตจากน้ำตาลทรายโดยมีน้ำตาลฟรักโทสเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองในระดับถังหมัก

ขยายขนาดการผลิตลงในถังหมักที่มีการกวนและการให้อากาศขนาดความจุ 5 ลิตร ปริมาตรใช้งาน 2.5 ลิตร ใช้สูตรอาหารเหลวสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่า (ภาคผนวก ก.4) โดยถ่ายหัวเชื้อซึ่งเตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 3 ขนาดหัวเชื้อ 7% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) หรือตามที่ระบุไว้ในแต่ละการทดลองลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จัดอัตราการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาทีหรือตามที่ระบุไว้ในแต่ละการทดลอง อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0-6.5 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตที่ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือตามที่ระบุไว้ในแต่ละการทดลอง เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส (บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536) แปรผันภาวะบางประการดังนี้

5.1 การหาความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสมในการผลิตระดับถังหมัก

เนื่องจากความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลทรายที่ได้จากการผลิตในระดับขวดเขย่าคือ 450 กรัมต่อลิตร ไม่สามารถนำมาใช้ในการทดลองระดับถังหมักได้เนื่องจากเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตจำนวนมากรบกวนการผลิตจนไม่สามารถผลิตต่อไปได้ดังที่แสดงไว้ในส่วนผลการทดลอง จึงต้องหาความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสมในการผลิตระดับ

ถังหมักอีกครั้ง โดยถ่ายหัวเชื้อขนาด 7% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่า (ภาคผนวก ก.4) ปริมาตร 2.5 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จัดอัตราการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที จัดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0-6.5 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต แล้วแปรผันปริมาณน้ำตาลทรายเป็น 300 350 และ450 กรัมต่อลิตร โดยยังคงอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 250 : 0.5 คือใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.193 1.390 และ 1.786 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ทำการผลิตที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0-6.5 โดยแคลเซียมคาร์บอเนตตลอดการทดลอง ตรวจสอบปริมาณกรดกลูโคนิกตามวิธีการข้อ 8.1 น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ และน้ำตาลฟรักโทสที่ได้จากการผลิตตามวิธีการข้อ 9.1 9.2 และ 9.3 ตามลำดับ เลือกความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสมใช้ในการทดลองระดับถังหมักต่อไป

5.2 การหาขนาดหัวเชื้อที่เหมาะสม

จากผลการทดลองของบาจรีย์ (บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536) ซึ่งทำการผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมัก 5 ลิตรโดยมีแป้งไฮโดรไลเสสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมคือ 7% แต่การทดลองนี้ได้เปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทราย จึงหาขนาดหัวเชื้อที่เหมาะสมอีกครั้ง โดยถ่ายหัวเชื้อซึ่งเตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 3 โดยแปรผันขนาดหัวเชื้อเป็น 7% 10% 12% และ 15% ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงในอาหารสูตรเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมัก (ภาคผนวก ก.5) ปริมาตร 2.5 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จัดอัตราการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0-6.5 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตตลอดการทดลอง ผลิตที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิกตามวิธีการข้อ 8.1 น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์และน้ำตาลฟรักโทสที่ได้จากการผลิตตามวิธีการข้อ 9.1 9.2 และ 9.3 ตามลำดับ ขนาดของหัวเชื้อเหมาะสมจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

5.3 การหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตกรดกลูโคนิก

เนื่องจากในการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลทรายต้องมีขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทสแล้วจุลินทรีย์จึงนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการผลิตกรดกลูโคนิกต่อไป ซึ่งได้มีการรายงานว่า *Aspergillus niger* CCM8004 สร้างเอนไซม์อินเวอร์เทสซึ่งสามารถเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทสได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 (Rosenberg และคณะ, 1992) สำหรับค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกของ *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ 6.0-6.5 (รติกร กัณฑะพงศ์, 2534; จินตนา ไกรวัฒนพงศ์, 2536) ดังนั้นในการหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลซูโครส จึงน่าจะลองทำการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรกเป็นช่วงของค่าความเป็นกรดด่างตามที่มีรายงานว่าควบคุมการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทสได้ดี และช่วงที่สองจะเป็นค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกคือ 6.0-6.5

โดยถ่ายหัวเชื้อขนาดเหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 5.2 คือ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมัก (ภาคผนวก ก.5) ปริมาตร 1.5 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร กำหนดอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30±2 องศาเซลเซียส แปรผันค่าความเป็นกรดด่างออกเป็น 2 ช่วงคือช่วงแรกปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 5.5 และ 6.0-6.5 นาน 12 ชั่วโมง ช่วงหลังปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0-6.5หลังจาก 12 ชั่วโมงจนสิ้นสุดการทดลอง

5.3.1ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 นาน 12 ชั่วโมงหลังจากนั้นเท่ากับ 6.0-6.5

ถ่ายหัวเชื้อลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 0-12 เท่ากับ 4.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล จากนั้นจึงปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตเป็น 6.0-6.5 จนสิ้นสุดการทดลอง

5.3.2 ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นเท่ากับ 6.0-6.5

ผลิตกรดกลูโคนิกเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 5.3.1 แต่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับเป็น 6.0-6.5 จนสิ้นสุดการทดลอง

5.3.3 ปรับค่าความเป็นกรดด่างตลอดการทดลองเท่ากับ 6.0-6.5

ผลิตกรดกลูโคนิกเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 5.3.1 แต่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0-6.5 ตลอดการทดลอง

ดังแสดงในผังการทดลองดังนี้

การทดลอง 5.3.1	ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5	ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5
การทดลอง 5.3.2	ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5	ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5
การทดลอง 5.3.3	ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5	ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5
	12 ชั่วโมง	60 ชั่วโมง

เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิกที่ได้ในแต่ละการทดลองตามวิธีการข้อ 8.1 แล้วเลือกค่าความเป็นกรดด่างที่ให้ผลผลิตสูงใช้ในการทดลองต่อไป

5.4 การหาอัตราการกวนที่เหมาะสม

ผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมัก 5 ลิตร โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมัก (ภาคผนวก ก.5) 2.5 ลิตร ใช้หัวเชื้อขนาด 10% ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30±2 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมตามผลการทดลองข้อ 5.3 คือ 6.0-6.5 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตตลอดการทดลอง แปรผันอัตราการกวนเป็น 500 550 และ 600 รอบต่อนาที ตรวจสอบและเปรียบเทียบกรดกลูโคนิกตามวิธีการข้อ 8.1 น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์และน้ำตาลฟรักโทสที่ได้จากการผลิตตามวิธีการข้อ 9.1 9.2 และ 9.3 ตามลำดับ เลือกอัตราการกวนที่เหมาะสมใช้ในการทดลองต่อไป

5.5 การหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.4 แต่กำหนดอัตราการกวนที่ให้ผลผลิตกรดสูงซึ่งได้จากการทดลองข้อ 5.4 คือ 500 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30±2 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.0-6.5 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตตลอดการทดลอง แปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 1 1.5 2 และ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ตรวจสอบและเปรียบเทียบกรดกลูโคนิก การเติบโต และการใช้แหล่งคาร์บอน

6. การเก็บเกี่ยวกรดกลูโคนิก

นำน้ำหมักมาอุ่นจนแคลเซียมกลูโคเนตละลายหมดและกรองแยกสายใยด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 เก็บส่วนน้ำใสที่ได้ไว้วิเคราะห์ปริมาณกรดและน้ำตาลต่างๆต่อไป ส่วนสายใยนำมาตรวจการเติบโตโดยการหาน้ำหนักแห้ง

7. การแยกแคลเซียมกลูโคเนตออกจากน้ำตาลฟรักโทส

นำน้ำหมักที่ได้มาแยกสายใย *Aspergillus niger* G153 ออกแล้วตามวิธีการข้อ 6 มาบรรจุลงในภาชนะ นำไปเก็บไว้ในที่เย็น อุณหภูมิประมาณ 4-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วันเพื่อให้แคลเซียมกลูโคเนตตกตะกอน เมื่อเกิดตะกอนสีขาวขึ้นที่ก้นภาชนะ เทส่วนน้ำลงในภาชนะอีกใบอย่างเบามือไม่ให้ตะกอนร่วงลงไปด้วย ล้างตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตที่ได้ด้วยน้ำเย็นหลายๆครั้ง แล้วจึงนำตะกอนที่ได้ไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60±2 องศาเซลเซียส เมื่อตะกอนแห้งแล้วจึงนำมาบดเป็นผง บรรจุในขวดเพื่อการวิเคราะห์ต่อไป ส่วนน้ำตาลฟรักโทสที่ได้อยู่ในส่วนน้ำใสให้เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

8. การวิเคราะห์กรดกลูโคนิก

เนื่องจากในระหว่างที่ทำการวิจัย ได้นำน้ำหมักไปวิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์ที่ผลิตโดย *A. niger* G153 เป็นระยะๆตลอดช่วงการผลิตและตลอดการวิจัย พบกรดอินทรีย์ชนิดกรดกลูโคนิกเพียงชนิดเดียว อีกทั้งได้มีผู้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตกรดกลูโคนิกโดยจุลินทรีย์สายพันธ์นี้ โดยผลิตในรูปเกลือแคลเซียมกลูโคเนตและเกลือโซเดียมกลูโคเนต ก็พบว่าจุลินทรีย์

สายพันธ์นี้ผลิตกรดอินทรีย์เพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงวิเคราะห์กรดกลูโคนิกด้วยวิธีทางเคมีตามวิธีการข้อ 8.1

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

นำน้ำหมักที่กรองแยกสายใยออกแล้วมา 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตเข้มข้น 2.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดเบาๆเป็นเวลา 5 นาที กรองเก็บตะกอนที่ได้ด้วยกระดาษกรองโตโยเบอร์ 5 ซี (Toyo filter paper No. 5C) ล้างตะกอนด้วยน้ำปลอดประจุที่ร้อน จากนั้นละลายตะกอนจนหมดด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้น 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร) แยกตะกอนแคลเซียมซัลเฟตทิ้งไป นำสารละลายกรดออกซาลิกที่ได้ไปไตเตรตด้วยสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล แล้วคำนวณหาปริมาณกรดกลูโคนิกตามวิธีการในภาคผนวก ง.1

8.2 การวิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์ที่สร้างโดย *Aspergillus niger* G153 ด้วยวิธี HPLC (High performance liquid chromatography) (บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536; เยาวภา ทองอร่าม, 2540)

ได้ทำการวิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ 2 ชนิดคือ Zorbax -C8 (L-3555) และ Spherisorb C-18 (S 50D S2)

8.2.1 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ที่ *Aspergillus niger* G153 สร้างขึ้นด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (Shimadsu -LC-3A) โดยใช้คอลัมน์ Zorbax -C8 (L-3555)

นำน้ำหมักที่ได้จากการทดลองมาตรวจชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ที่ *A. niger* G153 สร้างขึ้นด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (Shimadsu –LC 3A) โดยใช้ Zorbax -C8 (L-3555) คอลัมน์ขนาดความยาว 25 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร ปริมาตรน้ำหมักที่ฉีด 2 ไมโครลิตร โดยมีกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (ค่าความเป็นกรดด่าง 2.5) เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detector ที่ 210 นาโนเมตร โดยเปรียบ

เทียบกับกรดกลูโคนิกมาตรฐานและมีกรดอิทาโคนิกเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) แล้วคำนวณปริมาณตามภาคผนวก ง.2 โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานตามภาคผนวก ค.1

(ใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

8.2.2 การวิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์ที่ *Aspergillus niger* G153 สร้างขึ้นด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (Shimadsu -LC-3A) โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb C-18 (S 50D S2)

นำน้ำหมักที่ได้จากการทดลองมาตรวจชนิดของกรดอินทรีย์ที่ *Aspergillus niger* G153 สร้างขึ้นด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (Shimadsu -LC-3A) โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb C-18 (S 50D S2) โดยใช้กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (ค่าความเป็นกรดด่าง 2.5) เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detector ที่ 210 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน และมีกรดอิทาโคนิกเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard)
(ใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

9. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

9.1 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด โดยการทำปฏิกิริยาของฟีนอลและกรดกำมะถัน (Hanson และ Phillips, 1981)

นำน้ำหมักที่กรองแยกสายใยราออกแล้วมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสม แล้วดูดมา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เขย่าแรงๆตั้งทิ้งไว้อีก 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค.2)

9.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยใช้วิธีของ Bernfeld (1955)

นำน้ำหมักที่กรองแยกสายใยราออกแล้วมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสม แล้วดูดมา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA) ปริมาตร 1

มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงในอ่างน้ำเย็นเติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค.3)

9.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลฟรักโทสโดยวิธีของ Marshall และ Kooi (1957)

นำน้ำหมักที่กรองแยกสายใยราออกแล้วมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสม แล้วดูดมา 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่แช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 70% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ตามด้วยคริสทีอีนไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.5%(ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรและแอลกอฮอลิกคาร์บาโซลเข้มข้น 0.12% ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรตามลำดับ นำขึ้นจากอ่างน้ำแข็ง เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 60±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรหาปริมาณน้ำตาลฟรักโทสโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค.4)

ในการตรวจปริมาณน้ำตาลฟรักโทสด้วยวิธีนี้จะทำในช่วงที่น้ำตาลซูโครสได้หมดไปแล้ว นั่นคือในช่วงท้ายของการทดลองเนื่องจากวิธีวิเคราะห์น้ำตาลฟรักโทสด้วยวิธีนี้มีการเติมกรดซัลฟูริก 70% ซึ่งสามารถสลายน้ำตาลซูโครสออกเป็นกลูโคสและฟรักโทส ดังนั้นถ้ายังคงมีน้ำตาลซูโครสอยู่ในน้ำหมักจะทำให้น้ำตาลฟรักโทสที่วิเคราะห์ได้จะผิดพลาด

9.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรักโทสและซูโครสด้วยวิธี HPLC (High performance liquid chromatography) (อุษา ปิยะบงการ, 2538)

นำน้ำหมักที่ได้จากการทดลองมาตรวจสอบปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (Shimadsu - LC - 3A) โดยใช้ spherisorb-NH_2 คอลัมน์ขนาดความยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร ปริมาตรน้ำหมักที่ฉีด 10 ไมโครลิตร โดยมี 90% อะซิโตรไนตรายในน้ำ (v/v) เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อ.0ง ตรวจผลโดย Refractive Index Detector (RID) ในการทดลองจะตรวจสอบด้วยวิธีนี้เฉพาะบางช่วงของการทดลองและในบางการทดลองเท่านั้น โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค.5)

(ใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

10. การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักโดยวิธีของ Kempers (1974)

นำน้ำหมักที่กรองแยกสายใยมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม เติมน้ำหมักเจือจาง 5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2 โมล่าร์ ลงไป 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EDTA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที เติมสารละลายฟีนอลไนโตรพรัสไซด์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรด์ 4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ ผสมให้เข้ากันแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 40±2 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาตรไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวก ค.6) การคำนวณปริมาณแอมโมเนียมใช้สูตรตามที่แสดงในภาคผนวก ง.3

11. การวัดการเจริญเติบโตของสายใย *Aspergillus niger* G153

นำสายใยราที่ได้จากการกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์1 แช่ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 30% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 คืนแล้วกรองสายใยด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ล้างสายใยด้วยน้ำปลอดประจุ อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่จะได้น้ำหนักแห้งของสายใย