บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

สารเคมี

น้ำตาลดี (+) กลูโคสโมโนไฮเดรต ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

น้ำตาลกลูโคส (เกรดอุตสาหกรรม) ของบริษัท ป. ประสิทธิ์, ประเทศไทย

น้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

น้ำตาลทรายขาว (เกรดอุตสาหกรรม) ของบริษัทน้ำตาลมิตรผล จำกัด, ประเทศไทย

ทวีน 80 (Tween 80) ของบริษัท BDH laboratory Chemicals, England.

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco laboratories, U.S.A.

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$) ของบริษัท AJAX Chemicals, Australia.

กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ของบริษัท J. T. Baker, U.S.A.

โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท J. T. Baker, U.S.A.

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

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท J. T. Baker, U.S.A.

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท J. T. Baker, U.S.A.

เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)ของบริษัท BDH laboratory Chemicals, England.

ฟีนอล (phenol) ของบริษัท J. T. Baker, U.S.A.

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

กรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (3,5 - dinitrosalicylic acid)ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท BDH laboratory Chemicals, England.

โซเดียม-โปแตสเซียมตาร์เตต($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) ของบริษัท J. T. Baker, U.S.A.

โปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ของบริษัท J. T. Baker, U.S.A.

กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท J. T. Baker, U.S.A.

เมธิลเรด (methy red) ของบริษัท Difco laboratories, U.S.A.

เมธีลีนบลู (methylene blue) ของบริษัท Fluka Chemie, Switzerland.

บรูซีนซัลเฟตไฮเดรต ($C_{23}H_{26}N_2O_4)_2 \cdot H_2SO_4$ aq.) ของบริษัท Fluka Chemie, Switzerland.

กรดซัลฟานิลิก ($C_6H_7NO_3S$) ของบริษัท Riedel-DeHanen Ag Se-Hannover, Germany.

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Carlo ERBA, Germany

โปแตสเซียมไนเตรต (KNO_3) ของบริษัท May and Baker Dagenham, England.

อุปกรณ์และเครื่องมือที่สำคัญ

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer): รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environment incubator shaker): รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ของบริษัท Sac. Science-Eng, ประเทศไทย

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer): รุ่น G-560 E ของบริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.

ตู้อบแห้ง (Hot air oven): รุ่น UL- 80 ของบริษัท Memmert Gmbh, Germany.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave): รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama manufacturing Corporation, Japan.

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

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (Water bath): รุ่น O-207 ของบริษัท Memmert Gmbh, Germany.

อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ขนาด blight line deep 1/10 mm. ของบริษัท Baeco, Germany.

กระดาษกรองเบอร์ 4 (Filter papers): ขนาด 70 มิลลิเมตร ของบริษัท Whatman International, England.

เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน (Kjeldatherm) ของบริษัท Gerhardt, Germany.

เครื่องอัดอากาศ (air pump): รุ่น APN-240NAN-4 ของบริษัท IWAKI, Japan.

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

เครื่องวัดปริมาณอากาศ (rotameter) รุ่น RK – 1050 ของบริษัท KOFLOC, Japan.

เครื่องวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ชนิดเคลื่อนย้ายได้ (Portable CO_2 Detector): รุ่น RI-411A ของบริษัท Riken Keiki, Japan.

เครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC): รุ่น LC-3A โดยใช้คอลัมน์ Zorbax C - 8 (L - 3555) และคอลัมน์ Spherisorb C-18 (S5ODS2) ของบริษัท Shimazu, Japan.

วิธีดำเนินการทดลอง

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้เพื่อการผลิตกรดโคจิกตลอดงานวิจัยคือ *Aspergillus oryzae* K13 ที่คัดเลือกจากดินในประเทศไทย (เพชรรุ่ง พันธุ์พิริยะ, 2537)

2. การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 บนอาหารแข็งเอียง (agar slant) โพเทโท เดกซ์โทรส เอการ์ (Potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก1) บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 - 7 วัน เมื่อราสร้างสปอร์เต็มที่จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมหัวเชื้อ

3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอย

เลี้ยง *A. oryzae* K13 บนอาหารแข็งเอียงโพเทโท เดกซ์โทรส เอการ์ (ภาคผนวก ก1) บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 - 7 วัน ล้างสปอร์ของราด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ของทวีน 80 ในน้ำปลอดประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อ ทำเป็นสปอร์แขวนลอย (spore suspension) นับจำนวนสปอร์โดยใช้อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้อยู่ในช่วง 1.0 - 2.0 x 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการเตรียมหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิกต่อไป

3.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก

ถ่าย 1 มิลลิลิตร ของสปอร์แขวนลอย (1.0 - 2.0 x 10^9 สปอร์) ที่เตรียมจากวิธีการทดลองข้อ 3.1 ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก2) ปริมาตร 50

มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ได้ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ 2 - 4 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรของอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ โดยขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อในข้อ 3.2 นี้เป็นวิธีการเตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K13 ในระดับขวดเขย่าที่ศึกษาโดย รพี โรจนอุไร (2539)

4. การผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองข้อ 3.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร หรือแปรผันตามการทดลองลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกสูตรต่างๆที่ได้ระบุไว้ในแต่ละการทดลอง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ความหนาแน่นของสปอร์งอกเท่ากับ 4 - 8 x 10^8 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกปริมาตร 1 ลิตร หรือแปรผันตามการทดลอง) ซึ่งบรรจุในภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความสูงเท่ากับ 8.5 และ 10.0 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งทำให้ได้ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1.9 เซนติเมตร (รูปที่ 9) เพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 22 - 25 วัน

รูปที่ 9 ภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกที่ใช้เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 เพื่อผลิตกรดโคจิกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความสูงเท่ากับ 8.5 และ 10.0 เซนติเมตร ตามลำดับ

5. การเก็บเกี่ยวกรดโคจิก

กรองแยกสายใยของ *A. oryzae* K13 จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วยกระดาษวอทแมนเบอร์ 4 นำส่วนใสที่ได้จากการกรองไปตรวจหาปริมาณกรดโคจิกตามวิธีการทดลองข้อ 7 น้ำตาลรีดิวส์ตามวิธีการทดลองข้อ 8.1 และน้ำตาลทั้งหมดตามวิธีการทดลองข้อ 8.2 ส่วนสายใยที่กรองได้นำไปวัดการเติบโตตามวิธีการทดลองข้อ 6

6. การวัดการเติบโตของ *A. oryzae* K13

นำสายใยที่กรองได้บนกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 4 ที่ผ่านการล้างสายใยด้วยน้ำปลอดประจุอย่างน้อย 3 ครั้ง อบที่ตู้อบแห้งอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำน้ำหนักแห้งที่ชั่งได้ทั้งหมดลบด้วยน้ำหนักแห้งของกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 4 ที่ปราศจากสายใยของรา ซึ่งผลต่างที่ได้คือน้ำหนักแห้งของ *A. oryzae* K13 เพื่อใช้วัดการเติบโตของรา

7. การวิเคราะห์กรดโคจิก

7.1 การวิเคราะห์กรดโคจิกโดยวิธีของ Bentley (1957)

นำน้ำหมักที่ได้จากการเก็บเกี่ยวตามวิธีการทดลองข้อ 5 ที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข1) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำปลอดประจุ 5 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาปริมาณกรดโคจิกโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดโคจิกเข้มข้น 0 - 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค1)

7.2 การวิเคราะห์กรดโคจิกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (ใช้บริการจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

นำน้ำหมักที่ได้จากการเก็บเกี่ยวตามวิธีการทดลองข้อ 5 มาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมมาตรวจสอบด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (Shimadzu LC – 3A) โดยใช้คอลัมน์ Zorbax C – 8 (L – 3555) ที่มีขนาดความยาว 25 เซนติเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร และใช้กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5 เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของ

คอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลที่ได้ด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และคอลัมน์ Spherisorb C - 18 ขนาดความยาว 25 เซนติเมตร ใช้กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5 เป็นตัวพา โดยปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจสอบโดย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกรดโคจิกมาตรฐาน และมีกรดกลูโคนิกเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) คำนวณหาปริมาณกรดโคจิกตามวิธีการในภาคผนวก ง1 โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ค2

8. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

8.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Bernfeld, 1955)

นำน้ำหมักที่ได้จากวิธีการทดลองข้อ 5 ที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำเย็นทันที เติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0 - 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค3)

8.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Hansen และ Phillips, 1981)

เติมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ภาคผนวก ข3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำหมักที่ได้จากการทดลองข้อ 5 ที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร เขย่าตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำมาเขย่าแรงๆอีกครั้ง ตั้งทิ้งนาน 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค4)

9. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

9.1 การวิเคราะห์ปริมาณอินทรียไนโตรเจนโดยวิธีของ Steyermark (1951)

นำน้ำหมักที่ได้จากการทดลองข้อ 5 ที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมสารช่วยเร่งปฏิกิริยา (ประกอบด้วย โปแตสเซียมซัลเฟต 6.65 กรัม และ คอปเปอร์ซัลเฟต 0.35 กรัม) 7 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุม (Digester) จนได้สารละลายสีเขียวใส รอทิ้งไว้ให้เย็นค่อยๆเติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 50 มิลลิลิตร และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (ภาคผนวก ข4.1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการกลั่นจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้นด้วย 100 มิลลิลิตรของกรดบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (ภาคผนวก ข4.2) ที่มีตัวบ่งชี้ผสม (ภาคผนวก ข4.3) ผสมอยู่จำนวน 3 หยด กลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น 250 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาไตเตรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว โดยมีจุดยุติที่สารละลายสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานที่ไตเตรตได้เพื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน (ภาคผนวก ง2)

9.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตโดยวิธี Brucine sulphate (Jenkins และ Medskr, 1964)

นำน้ำหมักที่ได้จากการทดลองข้อ 5 ที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (ภาคผนวก ข5.1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเติมสารละลายกรดซัลฟูริกที่เจือจางด้วยน้ำปลอดประจุในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 (กรดซัลฟูริกต่อน้ำปลอดประจุ) (ภาคผนวก ข5.2) 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปแช่น้ำจนเย็นเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบรูซีน-กรดซัลฟานิลิก (ภาคผนวก ข5.3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่น้ำเย็นทันที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรและหาปริมาณไนเตรตโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปแตสเซียมไนเตรตเข้มข้น 0 – 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค5)

10. การหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว

ผลิตกรดโคจิกตามวิธีการทดลองข้อ 4 โดยใช้สูตรอาหารต่างๆกัน (ตารางที่ 5) ซึ่งจะแบ่งสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกออกเป็น 3 ชุดการทดลอง โดยทำการทดลองแต่ละชุดเรียงตามลำดับ ได้แก่

สูตรอาหารชุด ก เป็นสูตรอาหารชุดที่มีองค์ประกอบซึ่งมีผู้ศึกษามาแล้วว่าเหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว (รพี โรจนอุไร, 2539; May และคณะ, 1931) นอกจากนี้ รพี โรจนอุไร (2539) ได้ทำการศึกษาชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K13 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ พบว่าน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรักโทส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกได้และให้ผลผลิตกรดใกล้เคียงกัน และยังพบว่าปริมาณของคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 100 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลดังกล่าวประกอบการจัดสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดโคจิกได้เป็น 4 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 สูตรอาหารที่ได้มีการทดลองแล้วว่าเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K13 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ในระดับขวดเขย่า มีน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร มีสารสกัดจากยีสต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณ 0.5 และ 0.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รพี โรจนอุไร, 2539) (ภาคผนวก ก3)

สูตรที่ 2 สูตรอาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสในปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก4)

สูตรที่ 3 สูตรอาหารที่มีองค์ประกอบเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงราให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว (May และคณะ, 1931) โดยปรับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจาก 200 กรัมต่อลิตร เป็น 100 กรัมต่อลิตร มีแอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 1.125 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน (ภาคผนวก ก5)

สูตรที่ 4 สูตรอาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 โดยใช้น้ำตาลทรายขาว 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ก6)

สูตรอาหารชุด ข เป็นสูตรอาหารชุดที่ปรับปรุงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 และ 4 ในสูตรอาหารชุด ก และเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสูตรอื่นในชุดเดียวกัน แต่พบว่าให้การเติบโตของราน้อยซึ่งอาจมีผลทำให้การผลิตกรดไม่สูงเท่าที่ควร ดังนั้นจึงทดลองเสริมสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่ง รพี โรจนอุไร (2539) ได้ศึกษาแล้วพบว่าปริมาณนี้เหมาะสมต่อการผลิต ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 4 ในชุด ก แม้ให้ผลผลิตกรดต่ำที่สุด แต่เนื่องจากมีองค์ประกอบอื่นๆเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 แต่ใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นการที่ผลผลิตต่ำอาจเป็นเพราะการเติบโตน้อย อันเนื่องมาจากความสามารถในการสลายน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทสต่ำทำให้ผลผลิตต่ำ จึงทดลองเติมสารสกัดจากยีสต์ได้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 และ 6 นอกจากนี้ยังได้ทดลองเพิ่มปริมาณคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 และ 6 ได้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 และ 8 ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตในชุด ข จึงประกอบด้วยสูตรอาหาร 4 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 5 สูตรอาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 โดยมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ (แหล่งวิตามิน ปัจจัยเสริมการเติบโต (growth factor) และแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน) 0.5 กรัมต่อลิตร (ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.051 กรัมต่อลิตร) และลดปริมาณของแอมโมเนียมไนเตรตเหลือเท่ากับ 0.979 กรัมต่อลิตร (ปริมาณของไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรตเท่ากับ 0.343 กรัมต่อลิตร) เพื่อให้ได้ปริมาณไนโตรเจนรวมในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.394 กรัมต่อลิตร ซึ่งเท่ากับปริมาณไนโตรเจนรวมที่คิดได้จากการเติมแอมโมเนียมไนเตรตเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 สูตรอาหารนี้มีน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก7)

สูตรที่ 6 สูตรอาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาวแต่คงปริมาณเท่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 คือ 100 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก8)

สูตรที่ 7 สูตรอาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 โดยเปลี่ยนปริมาณของแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสในปริมาณ 200 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก9)

สูตรที่ 8 สูตรอาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาวในปริมาณ 200 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก10)

สูตรอาหารชุด ค เป็นสูตรอาหารชุดที่ปรับปรุงมาจากสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในสูตรอาหารชุด ข คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีสารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเสริม และแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ตามลำดับ แต่จากรายงานของ รพี โรจนอุไร (2539) พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K13 ในอาหารเหลว ดังนั้นจึงทดลองใช้แอมโมเนียมซัลเฟตแทน โดยจัดให้มีปริมาณไนโตรเจนรวมเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ได้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 9 ดังนี้

สูตรที่ 9 สูตรอาหารที่ดัดแปลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 โดยเปลี่ยนแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนจากแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.619 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.343 กรัม และเมื่อคิดรวมไนโตรเจนในสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร (0.051 กรัมไนโตรเจน) จะได้ปริมาณไนโตรเจนรวมในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.394 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับปริมาณไนโตรเจนรวมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5

เก็บเกี่ยวกรดโคจิก (วิธีการทดลองข้อ 5) ติดตามการเติบโตของรา (วิธีการทดลองข้อ 6) วัดปริมาณกรดโคจิก (วิธีการทดลองข้อ 7.1) และยืนยันผลเป็นระยะๆตลอดการทดลองโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (วิธีการทดลองข้อ 7.2) วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (วิธีการทดลองข้อ 8.1) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (วิธีการทดลองข้อ 8.2) และวิเคราะห์การใช้ไนโตรเจนเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด (วิธีการทดลองข้อ 9.1 และ 9.2)

ตารางที่ 5 สรุปองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกแต่ละสูตร

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่	แหล่งคาร์บอน		แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน		แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน		ปริมาณไนโตรเจนรวม (กรัมต่อลิตร)	แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	โปแตสเซียมคลอไรด์ (กรัมต่อลิตร)	กรดฟอสฟอริก (กรัมต่อลิตร)
	ชนิด	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ชนิด	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ชนิด	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)				
1	น้ำตาลทรายขาว	100	สารสกัดจากยีสต์	0.5	แอมโมเนียมซัลเฟต	0.240	0.101	-	-	-
2	น้ำตาลกลูโคส	100	สารสกัดจากยีสต์	0.5	แอมโมเนียมซัลเฟต	0.240	0.101	-	-	-
3	น้ำตาลกลูโคส	100	-	-	แอมโมเนียมไนเตรต	1.125	0.394	0.5	0.1	0.054
4	น้ำตาลทรายขาว	100	-	-	แอมโมเนียมไนเตรต	1.125	0.394	0.5	0.1	0.054
5	น้ำตาลกลูโคส	100	สารสกัดจากยีสต์	0.5	แอมโมเนียมไนเตรต	0.979	0.394	0.5	0.1	0.054
6	น้ำตาลทรายขาว	100	สารสกัดจากยีสต์	0.5	แอมโมเนียมไนเตรต	0.979	0.394	0.5	0.1	0.054
7	น้ำตาลกลูโคส	200	สารสกัดจากยีสต์	0.5	แอมโมเนียมไนเตรต	0.979	0.394	0.5	0.1	0.054
8	น้ำตาลทรายขาว	200	สารสกัดจากยีสต์	0.5	แอมโมเนียมไนเตรต	0.979	0.394	0.5	0.1	0.054
9	น้ำตาลกลูโคส	100	สารสกัดจากยีสต์	0.5	แอมโมเนียมซัลเฟต	1.619	0.394	0.5	0.1	0.054

11. การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่เลือกแล้วว่าให้ผลผลิตกรดสูงที่สุดจากการทดลองข้อ 10 ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (มีคาร์บอนเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร) และมีแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเสริม จัดปริมาณสารสกัดจากยีสต์ให้มีปริมาณคงที่ตลอดการทดลองเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร (มีไนโตรเจนเท่ากับ 0.051 กรัมต่อลิตร) แล้วทำการแปรปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรต เท่ากับ 0.979 1.254 1.533 1.814 และ 2.093 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.343 0.439 0.537 0.635 และ 0.733 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อรวมปริมาณไนโตรเจนจากทั้ง 2 แหล่งจะได้ค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.394 0.490 0.588 0.686 และ 0.784 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำให้ได้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102:1.0 102:1.25 102:1.5 102:1.75 และ 102:2.0 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 เพาะเลี้ยงโดยใช้ภาวะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 4 เป็นเวลา 22 วัน ทำการตรวจวัดการเติบโตของรา ปริมาณของกรดโคจิก การใช้น้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนระหว่างการผลิต ตามวิธีการทดลองข้อ 5 - 9 เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกจากการแปรอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

ตารางที่ 6 การแปรอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆกัน

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	ปริมาณคาร์บอนในน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)
102:1.0	40	0.979	0.343	0.051	0.394
102:1.25	40	1.254	0.439	0.051	0.490
102:1.5	40	1.533	0.537	0.051	0.588
102:1.75	40	1.814	0.635	0.051	0.686
102:2.0	40	2.093	0.733	0.051	0.784

12. การหาปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยคงค่าอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ทำการผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดจากการทดลองข้อ 11 คือมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.75 (ภาคผนวก ก12) แปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 75 100 125 150 175 และ 200 กรัมต่อลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ คิดเป็นปริมาณคาร์บอนเท่ากับ 30 40 50 60 70 และ 80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยคงอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.75 ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 11 คือ ใช้ปริมาณของแอมโมเนียมไนเตรตเท่ากับ 1.324 1.814 2.304 2.794 3.284 และ 3.774 กรัมต่อลิตร (มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.464 0.635 0.807 0.978 1.150 และ 1.322 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) และสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร (มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.051 กรัมต่อลิตร) เพื่อให้มีปริมาณของไนโตรเจนรวมในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.515 0.686 0.858 1.029 1.201 และ 1.373 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะทำให้ได้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนรวมของแต่ละการทดลองเท่ากับ 102:1.75 ดังตารางที่ 7 เพาะเลี้ยงโดยใช้ภาวะเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 4 เป็นเวลา 17 วัน ทำการตรวจวัดการเติบโตของรา ปริมาณของกรดโคจิก และการใช้น้ำตาลระหว่างการผลิตตามวิธีการทดลองข้อ 5 - 8

ตารางที่ 7 การแปรปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก โดยคงค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.75

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)
75	30	1.324	0.464	0.051	0.515
100	40	1.814	0.635	0.051	0.686
125	50	2.304	0.807	0.051	0.858
150	60	2.794	0.978	0.051	1.029
175	70	3.284	1.150	0.051	1.201
200	80	3.774	1.322	0.051	1.373

13.การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเพื่อการผลิตกรดโคจิก

ผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก12) ในภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกที่มีพื้นที่ผิวเท่ากับ 57 ตารางเซนติเมตร และความสูงเท่ากับ 10 เซนติเมตร โดยจัดให้มีขนาดของหัวเชื้อและสารอาหารเท่ากันในทุกระดับความสูงที่แปรคือใช้ขนาดหัวเชื้อ 2 – 4 x 10^7 สปอร์ และใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเท่ากับ 53 มิลลิลิตร แล้วแปรความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติมน้ำปลอดประจุในปริมาตร 0 52 105 และ 157 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1 2 3 และ 4 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งทำให้ได้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากปรับความสูงด้วยน้ำปลอดประจุแล้ว มีค่าเท่ากับ 53 105 158 และ 210 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 8) เพาะเลี้ยงโดยใช้ภาวะเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 4 เป็นเวลานาน 16 วัน ติดตามการเติบโตของรา ปริมาณกรดโคจิก การใช้น้ำตาลตามวิธีการทดลองข้อ 5 – 8 เปรียบเทียบผลผลิตกรดโคจิกจากการแปรอัตราส่วนต่างๆระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูง

ตารางที่ 8 การแปรอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงต่างๆกัน

อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูง	พื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางเซนติเมตร)	ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ (เซนติเมตร)	ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในแต่ละอัตราส่วน (กรัม)	ความหนาแน่นหัวเชื้อ (สปอร์)
57 : 1	57	1	5.3	2 – 4 x 10^7
57 : 2	57	2	5.3	2 – 4 x 10^7
57 : 3	57	3	5.3	2 – 4 x 10^7
57: 4	57	4	5.3	2 – 4 x 10^7

14. การหาขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

ทดลองผลิตกรดโคจิกในอาหารสูตรเหมาะสม (ภาคผนวก ก12) ปริมาตร 53 มิลลิลิตร (อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงที่เหมาะสมเท่ากับ 57 : 1.0 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดจากการทดลองข้อ 13) ใช้หัวเชื้อที่เตรียมตามวิธีการ

ทดลองข้อ 3 คือ $2-4 \times 10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยแปรขนาดของหัวเชื้อเป็น 1 2 3 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงโดยใช้ภาวะเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 4 เป็นเวลานาน 16 วัน ทำการตรวจวัดการเติบโตของรา ปริมาณกรดโคจิก การใช้น้ำตาล ตามวิธีการทดลองข้อ 5 – 8 เปรียบเทียบผลผลิตกรดโคจิกจากการแปรความหนาแน่นของหัวเชื้อ

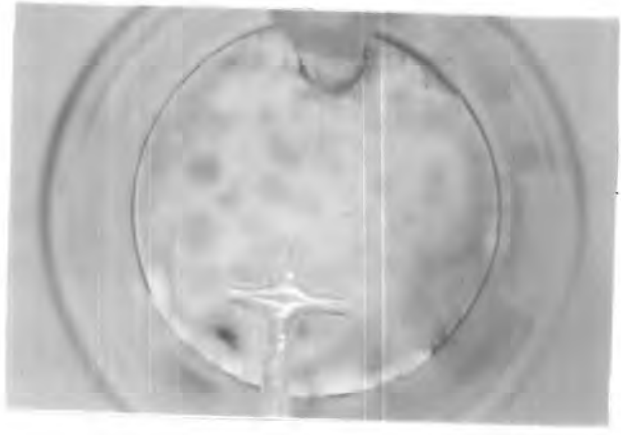
15. การหาผลของการให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวต่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิก

ผลิตกรดโคจิกเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 14 แต่ใช้หัวเชื้อขนาด 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งได้ทดลองแล้วว่าเหมาะสมที่สุด ทำการเพาะเลี้ยงโดยเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าของอาหารเหลว 2 เซนติเมตร ด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 176 ลิตรต่อนาทีต่อตารางเมตร (0.02 ลิตรต่อนาทีต่อตารางเซนติเมตร หรือ 20 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อตารางเซนติเมตร) โดยแปรระยะเวลาในการเป่าให้อากาศดังนี้

แบบที่ 1 ไม่มีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวตลอดการทดลอง
แบบที่ 2 เป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวตั้งแต่เริ่มการทดลองนาน 5 วัน
แบบที่ 3 ทำการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวตลอดการทดลอง

การทดลองแบบที่ 1 คือการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเป่าให้อากาศจะเพาะเลี้ยงในภาชนะแก้ว (รูปที่ 9) ส่วนการทดลองแบบที่ 2 และ 3 เป็นการเพาะเลี้ยงที่มีการเป่าให้อากาศ ซึ่งจะเพาะเลี้ยงโดยใช้ชุดอุปกรณ์ต่างๆ ดังรูปที่10 (ก) ซึ่งในการเป่าให้อากาศภายในภาชนะแก้วจะใช้หลอดแก้วกลวงที่มีท่อนำอากาศ 3 ทาง วางเหนือผิวหน้าอาหารเหลวโดยมีตำแหน่งของการให้อากาศดังแสดงในรูปที่ 10 (ข) ทำการตรวจวัดการเติบโตของรา ปริมาณกรดโคจิก การใช้น้ำตาล ตามวิธีการทดลองข้อ 5 – 8 และวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่องวัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ชนิดเคลื่อนย้ายได้ (portable CO_2 detector) โดยทำการวัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เช่นเดียวกับวิธีการทดลองข้อ 16 เปรียบเทียบผลผลิตกรดจากการแปรระยะเวลาในการเป่าให้อากาศ กับการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศ

(ก)



(ข)

รูปที่ 10 (ก) ชุดอุปกรณ์สำหรับการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข) ภาพถ่ายจากด้านบนของภาชนะ เพื่อแสดงตำแหน่งของการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 2 เซนติเมตร

16. การตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหนือผิวหน้าอาหารเหลวในระหว่างการเติบโต และในบรรยากาศ

ทำการตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างการผลิตกรดโคจิก ดังนี้ คือ เหนือผิวหน้าอาหารเหลว 1 เซนติเมตร บริเวณผิวด้านนอกของผ้าที่ใช้ปิดปากภาชนะเพาะเลี้ยง และบรรยากาศภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่องวัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ชนิดเคลื่อนย้ายได้ (ยี่ห้อ Riken Keiki: รุ่น RI-411A) ดังรูปที่ 11 ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการวัดด้วยเครื่องภายใน 1 นาที มีหน่วยเป็นจำนวนส่วนของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศหนึ่งล้านส่วน (part per million; ppm)

รูปที่ 11 เครื่องวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ชนิดเคลื่อนย้ายได้ (ยี่ห้อ Riken Keiki: รุ่น RI-411A) โดยมีส่วนประกอบที่สำคัญที่ใช้ในการตรวจวัด ดังนี้

1 คือ หน้าจอแสดงผลการทำงานของเครื่อง แสดงค่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้ (มีหน่วยเป็นจำนวนส่วนของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศหนึ่งล้านส่วน)

2 คือ สวิตซ์เพื่อปรับไปยังตำแหน่งต่างๆที่ต้องการให้เครื่องทำงาน ดังนี้

OFF ปิดการทำงานของเครื่อง

BAT .CK สำหรับตรวจสอบพลังงานแบตเตอรี

CONT สำหรับตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศในขณะนั้นทันที

AVG สำหรับตรวจวัดค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศภายในช่วงเวลาที่ตั้งไว้ (สำหรับงานวิจัยนี้จะวัดค่าเฉลี่ยภายใน 1 นาที)

CAL สำหรับใช้ในการปรับเทียบ (calibration) ก่อนทำการตรวจวัด

3 คือ หัววัดและสายวัดสำหรับตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ

4 คือ ปุ่มปรับระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ก่อนปล่อยออกจากเครื่อง