บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1. เคมีภัณฑ์

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

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

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

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.H_2O$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

โปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต ($KMnO_4$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

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

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

พีจีไอ เอมไซม์ (PGO enzyme) ของบริษัท Sigma Diagnostics, USA

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

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

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

ไดอะนีซิดีนไดไฮโดรเจนคลอไรด์ (o-dianisidine dihydrochloride) ของบริษัท Sigma Diagnostics, USA

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

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.H_2O$) ของบริษัท Ajex Chemicals, Autralia

พอลิยูรีเทนโฟม (polyurethane foam) ของบริษัท บางกอกโฟม จำกัด ประเทศไทย

2. อุปกรณ์

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

เครื่องเขย่า (shaker) ของบริษัท Takasaki Kagaku Kikai Co.,Ltd, Japan

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

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

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) รุ่น 0-270 ของบริษัท Memmert Gmbh, Germany

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

คอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Shinishi Kinoshita , Hokkaido University, Japan

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

เครื่องให้อากาศ (air compressor) รุ่น PUMA PP-1 ของบริษัทธีรวัฒน์เครื่องอัดลม ประเทศไทย

แผ่นกรองอากาศ (air filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ของบริษัท Gelman Sciences Inc., USA

กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) รุ่น JSM-35CF ของบริษัท JEOL, Japan

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

วิธีดำเนินการทดลอง

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *Aspergillus niger* G153 ที่คัดเลือกจากดินหลายแหล่งในประเทศไทย โดย รศ. กรรณิกา จันทรสอาด เมื่อปี 2530 พบว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้ผลิตกรดอินทรีย์ชนิดกรดกลูโคนิกเพียงชนิดเดียว

2. การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เชื้อสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* G153 โดยใช้เข็มเขี่ยลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียงไปเตโตเดกซ์โตรส (potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก 1) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมสปอร์แขวนลอย

ถ่ายสปอร์ของ *Aspergillus niger* G153 ลงบนอาหารแข็งเอียงไปเตโตเดกซ์โตรส (ภาคผนวก ก 1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 5-7 วัน เติมน้ำกลั่นผสมทวีน 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ เขี่ยสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอยและผสมให้เข้ากันเพื่อใช้เป็นสปอร์แขวนลอยในการทดลองต่อไป

4. การเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึง

เตรียมสปอร์แขวนลอยตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3 ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ $1.0\text{-}2.5\times10^{8}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร หรือแปรผันตามที่ระบุในแต่ละการทดลองโดยนับจำนวนด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ่ายสปอร์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) ซึ่งดัดแปลงจากสูตรอาหารเพื่อทำให้สปอร์อิสระงอก (รติกร กัณฑะพงศ์, 2534) คือลดปริมาณกลูโคสลงเหลือ 150 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 500

มิลลิลิตร และมี PUF ขนาดชิ้น 0.8 เซนติเมตร หนัก 1 กรัม หรือแปรผันตามที่ระบุในแต่ละการทดลองบรรจุอยู่ด้วย เพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงให้เป็นสายใยตรึงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 40 ชั่วโมง หรือตามที่ระบุ ในแต่ละการทดลอง นำชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึงเติบโตอยู่มาใช้ในการทดลองต่อไป

5. การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G158 ในระดับขวดเขย่า

ถ่ายชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึงซึ่งมีน้ำหนักเปียกหนัก 1 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก 3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานเป็นเวลา 8 วัน หรือจนได้ปริมาณ กรดกลูโคนิกสูงสุด

6. การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G158 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column)

6.1 การเตรียมคอลัมน์แก้ว

ยึดคอลัมน์แก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร สูง 40 เซนติเมตร ปริมาตรใช้งาน 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วกับขาตั้งเหล็กโดยให้คอลัมน์ทำมุม 90 องศากับแนวราบ ด้านล่างของคอลัมน์แก้วมีแผ่นกระจายอากาศซินเตอร์กลาส (sintered glass) ซึ่งทำหน้าที่รองรับสายใยตรึงที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์แก้ว และเป็นตัวกระจายอากาศเข้าสู่คอลัมน์แก้วปลายล่างสุดของคอลัมน์แก้วต่อกับอุปกรณ์กรองอากาศ (air filter) เครื่องวัดอัตราการให้อากาศ (rotameter) และเครื่องให้อากาศ (air pump) ตามลำดับ ด้วยสายยางซิลิโคน (silicone tube) (รูปที่ 2)

รูปที่ 2 การผลิตกรดกลูโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.2 การผลิตกรดกลูโคนิก

นำสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 มาผลิตกรดกลูโคนิกในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกสูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก 4) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในคอลัมน์แก้วที่เตรียมตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 6.1 ที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) โดยแปรผันความหนาแน่นของสายใยตรึง และอัตราการให้อากาศตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง

7. การเก็บเกี่ยวกรดกลูโคนิก

แยกสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 จากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกรองด้วยกระดาษวอทแมน เบอร์ 4 นำน้ำใสที่ได้ไปตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิกและปริมาณน้ำตาลที่เหลือตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 9 ส่วนชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึงที่ติดอยู่บนกระดาษกรองนำไปหาการเติบโตของสายใยตามวิธีการข้อ 10

8. การวิเคราะห์กรดกลูโคนิก

8.1 การวิเคราะห์กรดกลูโคนิกโดยใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่ละลาย (Takao, 1965)

นำน้ำหมักซึ่งได้กรองแยกสายใยตรึงออกแล้ว ตามวิธีการทดลองข้อ 7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลต เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปต้มเดือดเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที กรองเก็บตะกอนที่ได้ด้วยกระดาษกรองโตโย เบอร์ 5C (Toyo filter paper No. 5C) ล้างตะกอนด้วยน้ำปลอดประจุละลายตะกอนจนหมดด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) กรองแยกตะกอนแคลเซียมซัลเฟตทิ้ง นำสารละลายกรดออกซาลิกที่ได้ไปไตเตรดด้วยสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต เข้มข้น 0.1 นอลมัล แล้วคำนวนหาปริมาณกรดกลูโคนิก (ภาคผนวก ค 2)

8.2 การวิเคราะห์กรดกลูโคนิกที่สร้างขึ้นโดยสายใยตรึง *Aspergillus niger* G153 ด้วยเครื่อง HPLC

นำน้ำหมักที่ได้จากการผลิตกรดกลูโคนิกด้วยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 มาตรวจสอบกรดกลูโคนิกด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (Shimadsu-LC-3A) โดยใช้ Zorbox-C8 (L-3555) คอลัมน์ขนาดความยาว 25 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร ของบริษัท Dupont โดยใช้กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.5 เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detector ที่ 210 นาโนเมตร และคอลัมน์ Spherisorb C-18 (S5ODS2) ของบริษัท Phase separation โดยใช้กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.5 เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detector

ที่ 210 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกรดกลูโคนิกมาตรฐานและ มีกรดอิทาโคนิกเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard)

9. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

9.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

โดยวิธี Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

เติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (ภาคผนวก ข 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว เติมสารละลายเนลสัน (Nelson reagent) (ภาคผนวก ข 2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร หาค่าปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตราฐาน (ภาคผนวก ค 3.1)

9.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ใช้ระบบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส ร่วมกับกลูโคสออกซิเดส (Peroxidase and Glucose oxidase : PGO enzyme) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต (Sigma Chemical Company, 1980) ดังนี้

เติมสารละลายพีจีโอเอนไซม์ (ภาคผนวก ข 3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาหาปริมาณกลูโคสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐาน (ภาคผนวก ค 3.2)

10. การหาการเติบโตของสายใยตรึง

นำ PUF ที่มีสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ที่ได้จากการทดลองข้อ 7 มาทำให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักแห้งของ PUF ที่มีสายใยตรึง แล้วหาน้ำหนักแห้งของสายใยตรึงโดยหักน้ำหนักแห้งของ PUF ออกจากน้ำหนักของ PUF ที่มีสายใยตรึง

11. การตรวจการเติบโตของสายใยตรึง *Aspergillus niger* G153 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM)

นำชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 มาตรวจการเติบโตของสายใยตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, JEOL Model JSM-35CF, Japan) โดยตรวจการเติบโตของสายใยตรึงบริเวณผิวของ PUF ทั้งชิ้นและชิ้น PUF ผ่าเป็นแว่น โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ดังนี้

1. แช่ตัวอย่างในน้ำยาตรึงขั้นแรก (primary fixative) ซึ่งประกอบด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ของพาราฟอร์มัลดีไฮด์ (p-formaldehyde) ใน 0.1 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-18 ชั่วโมง นำมาล้างใน 0.1 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วนำตัวอย่างไปแช่ดองในน้ำยาขั้นที่สอง (sencondary fixative) ซึ่งประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ของออสเมียมเตตระออกไซด์ (omium tetraoxide, OsO_4) ใน 0.1 โมลาร์ ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ภายในตู้ดูดควัน

2. การขจัดน้ำออก (dehydration) โดยเทน้ำยาดองขั้นที่สองออก แล้วจุ่มตัวอย่างใน 35 50 70 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล ขั้นตอนละ 10-20 นาที ตามลำดับ

3. นำตัวอย่างมาทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) โดยใช้เครื่องทำให้แห้ง (critical point drying, Model SAMDRI-780)

4.นำตัวอย่างไปติดบนแผ่นทองเหลืองด้วยกาวติดตัวอย่างที่นำไฟฟ้าได้ (Eletroconductive adhesive)

5. นำตัวอย่างไปเคลือบผิวด้วยทอง ความหนาประมาณ 20 นาโนเมตร ในเครื่อง Ion Sputter Coater, Model JSC-110, Japan

6. นำตัวอย่างไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

(หมายเหตุ:การเตรียมตัวอย่างและการตรวจการเติบโตของสายใยตรึงใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

12. การหาชนิด และขนาดชิ้นของ PUF ที่เหมาะสมในการตรึง *Aspergillus niger* G153 เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก

12.1 การหาชนิดของ PUF ที่เหมาะสม

การทดลองนี้ใช้ PUF 2 ชนิดคือ PUF ที่มีโครงสร้างแบบเปิด (opened shape) และโครงสร้างแบบปิด (closed shape) ทำการทดลองโดยตรึงสปอร์ของ *Aspergillus niger* G153 ความหนาแน่น 1.0-2.5 X 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ต่อ PUF ทั้งสองชนิดหนัก 1 กรัม ทำให้สปอร์ตรึงงอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอก(ภาคผนวก ก 2) ตามวิธีการข้อ 4 เปรียบเทียบลักษณะสายใยตรึงของ PUF ที่มีโครงสร้างเปิด และโครงสร้างปิด เลือกชนิดของ PUF ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงสปอร์

12.2 การเปรียบเทียบความเหมาะสมของ PUF ความหนาแน่นสูงกับ PUF ความหนาแน่นต่ำในการตรึงสปอร์

การทดลองนี้ใช้ PUF ชนิดโครงสร้างเปิดที่ได้จากการทดลองข้อ 12.1 ทั้งชนิดความหนาแน่นสูง และความหนาแน่นต่ำ ทำการทดลองโดยตรึงสปอร์ของ *Aspergillus niger* G153 ความหนาแน่น 1.0-2.5 x 10^8 ต่อ PUF 1 กรัม ทำให้สปอร์ตรึงงอก เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 12.1 เปรียบเทียบลักษณะ PUF ที่มีสายใยตรึง เลือก PUF ที่มีขนาดรูพรุนเหมาะสมสำหรับการตรึงสปอร์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

12.3 การเปรียบเทียบความเหมาะสมของขนาดชิ้น PUF 0.6 เซนติเมตร และ 0.8 เซนติเมตร

ตรึงสปอร์ของ *Aspergillus niger* G153 ใน PUF ชนิดที่เหมาะสมได้จากการทดลองในข้อ 12 คือ PUF ชนิดโครงสร้างเปิด ความหนาแน่นสูง โดยแปรผันขนาดชิ้นของ PUF เป็น 0.6 เซนติเมตร (กว้าง 0.6 ยาว 0.6 สูง 0.6 เซนติเมตร) และ 0.8 เซนติเมตร (กว้าง 0.8 ยาว 0.8 สูง 0.8 เซนติเมตร) ทำให้สปอร์ตรึงงอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) ตามวิธีการทดลองข้อ 4 นำมาผลิตกรดกลูโคนิก ในขวดเขย่าตามวิธีการทดลองข้อ 5 เปรียบเทียบปริมาณกรด ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และการเติบโตของสายใยตรึง เลือกขนาดชิ้นของ PUF ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงสปอร์

13. การหาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์ และการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงให้ได้สายใยตรึงประสิทธิภาพสูง

13.1 การหาความหนาแน่นที่เหมาะสมของสปอร์ในการตรึง

ตรึงสปอร์ของ *Aspergillus niger* G153 ใน PUF โดยแปรผันจำนวนสปอร์ที่ใช้เป็น 10^7 10^8 และ 10^9 สปอร์ต่อ PUF 1 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำให้สปอร์ตรึงงอกตามวิธีการทดลองข้อ 4 โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึง 40 ชั่วโมงนำสายใยตรึงที่ได้มาทำการผลิตกรดกลูโคนิกตามวิธีการทดลองข้อ 5 ตรวจปริมาณกรดกลูโคนิก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และการเติบโตของสายใยตรึง เปรียบเทียบปริมาณกรดเมื่อใช้ความหนาแน่นของสปอร์ต่าง ๆ กัน

13.2 การหาช่วงเวลาเหมาะสมในการเตรียมสายใยตรึงให้มีประสิทธิภาพสูง

ตรึงสปอร์ของ *Aspergillus niger* G153 จำนวน 1.0-1.25 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 13.1 ใน PUF ชนิดที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 12 คือ PUF ชนิดโครงสร้างเปิด ความหนาแน่นสูง ขนาดชิ้น 0.6 เซนติเมตร น้ำหนัก 1 กรัม ทำให้สปอร์ตรึงงอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) ตามวิธีการทดลองข้อ 4 โดยแปรผันช่วงเวลาในการทำให้สปอร์ตรึงงอกตั้งแต่ 24-48 ชั่วโมง นำสายใยดังกล่าวมาผลิตกรดกลูโคนิกตามวิธีการทดลองข้อ 5 เปรียบเทียบปริมาณกรด ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และการเติบโตของสายใยตรึง เลือกเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสายใยตรึงประสิทธิภาพสูง กล่าวคือ ให้ปริมาณกรดสูง และใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้น

14. การหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้สายใยตรึงในขวดเขย่า

14.1 การหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต) ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดกลูโคนิก

ผลิตกรดกลูโคนิกด้วยสายใยตรึงประสิทธิภาพสูงที่ได้จากผลการทดลองข้อ 13 (ตรึงสปอร์ความหนาแน่น 1.0-1.25 X 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ต่อ PUF 1 กรัม เพาะเลี้ยง

สปอร์ตรึงนาน 40 ชั่วโมง) ตามวิธีการทดลองข้อ 5 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึง สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก 3) ซึ่งไม่มีแหล่งไนโตรเจน และอาหารสูตรที่ 1 ที่ใส่แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 และ 0.4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน หาปริมาณกรดกลูโคนิก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ การเติบโตของสายใยตรึง และการเกิดเซลล์อิสระในระยะการผลิต เลือกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมซึ่งให้ปริมาณสูงสุดในระยะเวลาสั้น และไม่มีเซลล์อิสระในระบบการผลิตสำหรับการทดลองต่อไป

14.2 การหาความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิก

ผลิตกรดกลูโคนิกด้วยสายใยตรึงเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 14.1 โดยใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้สายใยตรึงสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก 3) ซึ่งไม่มีแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 14.1 มาแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเป็น 250 200 150 และ 100 กรัมต่อลิตร ทำการผลิตกรดตามวิธีการทดลองข้อ 5 ตรวจปริมาณกรดกลูโคนิก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ การเติบโตของสายใยตรึง เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

15. การหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้สายใยตรึงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

นำสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 มาผลิตกรดกลูโคนิกในคอลัมน์แก้วซึ่งจัดเตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงสูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก 4) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว เป็นแหล่งคาร์บอน ไม่มีแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันภาวะต่าง ๆ ดังนี้

15.1 แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วเป็น 250 150 100 และ 50 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

15.2 แปรผันขนาดชิ้นของ PUF เป็น 0.6 และ 0.25 เซนติเมตร

15.3 แปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 5 7 9 และ 11 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

15.4 แปรผันน้ำหนักเปียก PUF ที่มีสายใยตรึงเป็น 100 และ 200 กรัมต่อลิตร (ซึ่งเตรียมจาก PUF เริ่มต้น 2.5 และ 5 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) ต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก

ตรวจปริมาณกรดกลูโคนิกตามวิธีการทดลองข้อ 8.1 การใช้น้ำตาลตามวิธีการทดลองข้อ 9.2 และระยะเวลาที่ให้ปริมาณกรดสูงสุด

16. การเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิกภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยสายใยตรึงใน PUF และสายใยตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต

ผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยที่ตรึงใน PUF และที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต (กุลธิรา สู่สุข , 2538) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกสูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก 4) ซึ่งบรรจุในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างตามวิธีการทดลองข้อ 6 โดยใช้ภาวะต่าง ๆ ดังนี้

ภาวะต่าง ๆ	ตรึงสายใยใน PUF	ตรึงสายใยใน แคลเซียมอัลจิเนต
- เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อสายใยตรึง (ชั่วโมง)	40	66
- ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (กรัมต่อลิตร)	4	0.2
- ความเข้มข้นกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว (กรัมต่อลิตร)	50	50
- ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต (กรัมต่อลิตร)	0	0
- ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต (กรัมต่อลิตร)	12	12
- ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)	500	400
- น้ำหนักเปียกของวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึง (กรัมต่อลิตรอาหารเพื่อการผลิต)	200	300
- อัตราการให้อากาศ (ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที)	9	10
- อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิห้อง (30-33)	อุณหภูมิห้อง (30-33)

เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิก และการใช้น้ำตาล เมื่อใช้สายใยตรึงที่ตรึงใน PUF และสายใยตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต ในการผลิตกรด

17. การทดลองผลิตกรดกลูโตนิกซ้ำ (repeated batch) โดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศทางด้านล่าง

ผลิตกรดกลูโคนิกซ้ำโดยใช้ภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 15 คือใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนใช้ PUF ขนาด 0.25 เซนติเมตร อัตราการให้อากาศ 9 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที น้ำหนักเปียก PUF ที่มีสายใยตรึงเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร กล้าเชื้อสายใยตรึงเตรียมโดยตรึงสปอร์ความหนาแน่น 1.0-2.5 X 10^8 สปอร์ต่อ PUF 1 กรัม เพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงนาน 40 ชั่วโมง ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 13 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศ ด้านล่างตามวิธีการข้อ 6 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงสูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก 4) ซึ่ง ไม่มีแหล่งไนโตรเจน ผลิตกรดกลูโคนิกซ้ำรวม 12 ครั้ง เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิก และการใช้น้ำตาลของแต่ละซ้ำ

18. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตกรดกลูโคนิกของสายใยตรึงที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กันก่อนนำมาใช้ผลิตกรด

เตรียมสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 17 เก็บ PUF ที่มีสายใยตรึงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 3 5 7 และ 9 วัน นำสายใยตรึงที่เก็บไว้มาผลิตกรดกลูโคนิกในขวดเขย่า ตามวิธีการทดลองข้อ 5 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก 3) แต่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 250 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดนานเป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรด เมื่อใช้สายใยตรึงที่เก็บไว้ที่เวลาต่าง ๆ กันก่อนการผลิต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย