บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

สารเคมี

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

น้ำตาลกลูโคส (เกรดอุตสาหกรรม) ของบริษัท ประเสริฐชัย, ประเทศไทย

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

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

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 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 ($MgSO_4.H_2O$) ของบริษัท E. Merck Dermstadt, Germany.

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

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

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

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

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

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท BDH laboratory Chemicals, England.

โซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตต ($C_4H_4KNaO_6.4\ H_2O$) ของบริษัท J. T. Baker, U.S.A.

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

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

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

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

เมธีลีนบลู (methylene blue) ของบริษัท Fluka Chemie, Switzerland.

บรูซีนซัลเฟตไฮเดรต ($(C_{23}H_{26}N_2O_4)_2.H_2SO_4$ 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 (Milton Roy spectronic 401) ของบริษัท BEC Thai, ประเทศไทย

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

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) 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.

เครื่องอัดอากาศ (air pump): รุ่น SM - 1/R4 ของบริษัท Puma industrial จำกัด, ประเทศไทย

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

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

เครื่องวัดปริมาณอากาศ (rotameter): รุ่น 1355EEH 2 AEN 1 A ของบริษัท SHO - RATE, Japan.

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

เครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography: HPLC): รุ่น LC - 3A โดยใช้คอลัมน์ Zorbax C - 8 (L - 3555) 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 $\pm$ 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 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 - 7 วัน ล้างสปอร์ของราด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ของทวีน 80 ในน้ำปลอดประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อทำเป็นสปอร์แขวนลอย (spore suspension) นับจำนวนสปอร์โดยใช้อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้อยู่ในช่วง 1.0 - 2.0 x 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการเตรียมหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิกต่อไป

3.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิก

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 ซึ่งทำให้ได้ความหนาแน่นของสปอร์ประมาณ 3 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรของอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในข้อ 3.2 นี้เป็นวิธีการเตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K13 ในระดับขวดเขย่าที่ศึกษาโดย รพี โรจนอุไร (2539)

4. การผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองข้อ 3.2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก.3) ซึ่งบรรจุในถาดตื้นขนาดที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นภาชนะสำหรับผลิตกรดโคจิก ดังรูปที่ 10 โดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อและอัตราการเป่าให้อากาศตามที่ระบุไว้ในแต่ละการทดลอง เพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 - 25 วัน

5. การเก็บเกี่ยวกรดโคจิก

กรองแยกสายใยของ *A. oryzae K13* จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 4 นำส่วนใสที่ได้จากการกรองไปตรวจหาปริมาณกรดโคจิกตามวิธีการทดลองข้อ 7 น้ำตาลรีดิวส์ตามวิธีการทดลองข้อ 8 ส่วนสายใยที่กรองได้นำไปวัดการเจริญเติบโตตามวิธีการทดลองข้อ 6

6. การวัดการเติบโตของ *A. oryzae K13*

นำสายใยที่กรองได้บนกระดาษกรองที่ผ่านการล้างสายใยด้วยน้ำปลอดประจุอย่างน้อย 3 ครั้ง อบที่ตู้อบแห้งอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำน้ำหนักแห้งที่ชั่งได้ทั้งหมดลบด้วยน้ำหนักแห้งของกระดาษกรองที่ปราศจากสายใยของรา 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 หาปริมาณกรดโคจิกโดยเทียบกับกราฟมาตราฐานของกรดโคจิกเข้มข้น 0 - 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค1)

7.2 การวิเคราะห์กรดโคจิกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (ใช้บริการจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

นำน้ำหมักที่ได้จากการเก็บเกี่ยวตามวิธีการทดลองข้อ 5 ที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมมาตรวจด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (Shimadzu LC - 3A) โดยใช้คอลัมน์ Zorbax C - 8 (L - 3555) ที่มีขนาดความยาว 25 เซนติเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 4.6 มิลลิลิตร และใช้กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5 เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลที่ได้ด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกรดโคจิกมาตราฐาน และมีกรด

กลูโคนิกเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) คำนวณหาปริมาณกรดโคจิกตามวิธีการในภาคผนวก ง1 โดยเทียบกับกราฟมาตราฐานในภาคผนวก ค2

8. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Bernfeld, 1955)

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

9. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

9.1 การวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจนโดยวิธีของ Steyermark (1951)

นำน้ำหมักที่ได้จากการทดลองข้อ 5 ที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมสารช่วยเร่งปฏิกิริยา (ประกอบด้วย โปแตสเซียมซัล เฟต 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 ข3.1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการกลั่นจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้นด้วย 100 มิลลิลิตรของกรดบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (ภาคผนวก ข3.2) ที่มีตัวบ่งชี้ผสม (ภาคผนวก ข3.3) ผสมอยู่จำนวน 3 หยด กลั่นมีปริมาตรรวมเป็น 250 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาไตเตรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตราฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้วโดยมีจุดยุติที่สารละลายสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตราฐานที่ไตเตรตได้เพื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน (ภาคผนวก ง2)

9.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตโดยวิธี Brucine sulphate (Jenkins และ Medskr, 1964)

นำน้ำหมักที่ได้จากการทดลองข้อ 5 ที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (ภาคผนวก ข4.1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเติมสารละลายกรดซัลฟูริกที่เจือจางด้วยน้ำปลอดประจุในอัตราส่วน 4 ต่อ 1(กรดซัลฟูริกต่อน้ำปลอดประจุ) (ภาคผนวก ข4.2) 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปแช่น้ำจนเย็นเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบรูซีน - กรดซัลฟานิลิก (ภาคผนวก ข4.3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำเย็นทันที แล้วนำไป

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรและหาปริมาณไนเตรตโดยเทียบกับกราฟมาตราฐานของสารละลายโปแตสเซียมไนเตรตเข้มข้น 0 - 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค4) แล้วคำนวณเป็นปริมาณไนเตรตไนโตรเจนตามวิธีการคำนวณในภาคผนวก ง3

10. การหาขนาดถาดตื้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว

เนื่องจากกนิษฐา ภูวนารถนรานุบาลได้ศึกษาแล้วพบว่า อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงต้องมีค่าอย่างน้อย 57 : 1 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงกว่านั้นคือ 200 : 1 มาใช้เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) เหตุผลที่เลือกอัตราส่วนดังกล่าวเนื่องจากอัตราส่วนนี้สามารถนำไปใช้ผลิตในถาดตื้นขนาดที่ใหญ่ที่สุดเท่าที่สามารถใส่ลงหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่มีอยู่ในภาควิชา จากอัตราส่วนดังกล่าวกำหนดขนาดของถาดได้ 3 ขนาด ดังแสดงในรูปที่ 10

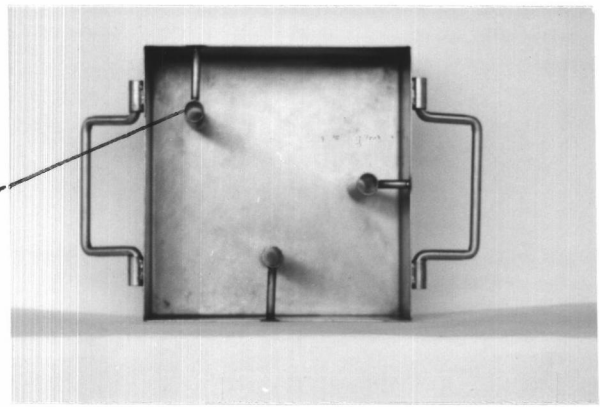
10.1 ถาดตื้นขนาดความจุ 1.5 ลิตรมีพื้นที่ผิวหน้าของถาด 400 ตารางเซนติเมตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูง 2 เซนติเมตร คิดเป็นปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.8 ลิตร

10.2 ถาดตื้นขนาดความจุ 2.5 ลิตรมีพื้นที่ผิวหน้าของถาด 600 ตารางเซนติเมตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูง 2 เซนติเมตร คิดเป็นปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.8 ลิตร

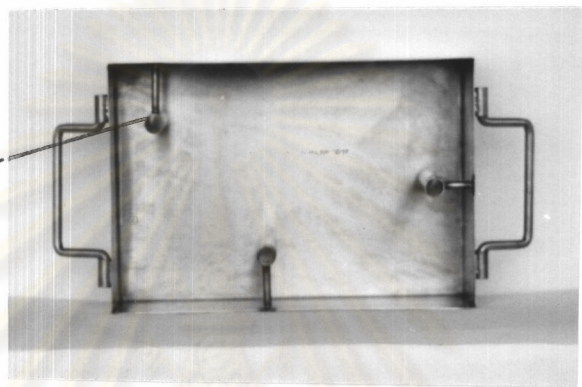
10.3 ถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตรมีพื้นที่ผิวหน้าของถาด 800 ตารางเซนติเมตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูง 4 เซนติเมตร คิดเป็นปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 3.2 ลิตร

โดยถาดทั้ง 3 ขนาดจะมีท่อสำหรับเก็บตัวอย่าง 3 ท่อกระจายอยู่ในถาด ซึ่งเป็นท่อสำหรับเก็บตัวอย่างและเติมน้ำกลั่นที่เกิดจากการสูญเสียน้ำในอาหารเหลวระหว่างการผลิต และถือเป็นตัวแทนของประมาณกรดโคจิกในถาด

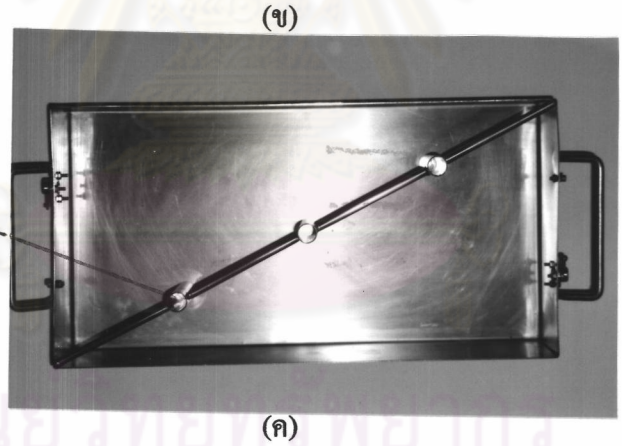
ผลิตกรดโคจิกตามวิธีการทดลองข้อ 4 โดยใช้ถาดตื้นทั้ง 3 ขนาด ใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) เนื่องจากเป็นปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยใช้ราเจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวในภาชนะแก้วรูปทรงกระบอก เส้นผ่าศูนย์กลางและความสูงเท่ากับ 8.5 และ 10.0 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งศึกษามาแล้วโดยกนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล เพาะเลี้ยงราที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 25 วัน เก็บเกี่ยวกรดโคจิก (วิธีการทดลองข้อ 5) หาน้ำหนักแห้งของรา (วิธีการทดลองข้อ 6) วัดปริมาณกรดโคจิก (วิธีการทดลองข้อ 7.1) และยืนยันผลการทดลองโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟี แบบของเหลวสมรรถนะสูง (วิธีการทดลองข้อ 7.2) และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (วิธีการทดลองข้อ 8)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 10 ถาดตื้นที่ใช้เป็นภาชนะในการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิก

(ก) ถาดตื้นขนาดความจุ 1.5 ลิตรมีพื้นที่ผิวหน้าของถาด 400 ตารางเซนติเมตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูง 2 เซนติเมตร คิดเป็นปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.8 ลิตร

(ข) ถาดตื้นขนาดความจุ 2.5 ลิตรมีพื้นที่ผิวหน้าของถาด 600 ตารางเซนติเมตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูง 2 เซนติเมตร คิดเป็นปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.8 ลิตร

(ค) ถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตรมีพื้นที่ผิวหน้าของถาด 800 ตารางเซนติเมตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูง 4 เซนติเมตร คิดเป็นปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 3.2 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. การหาปริมาณของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

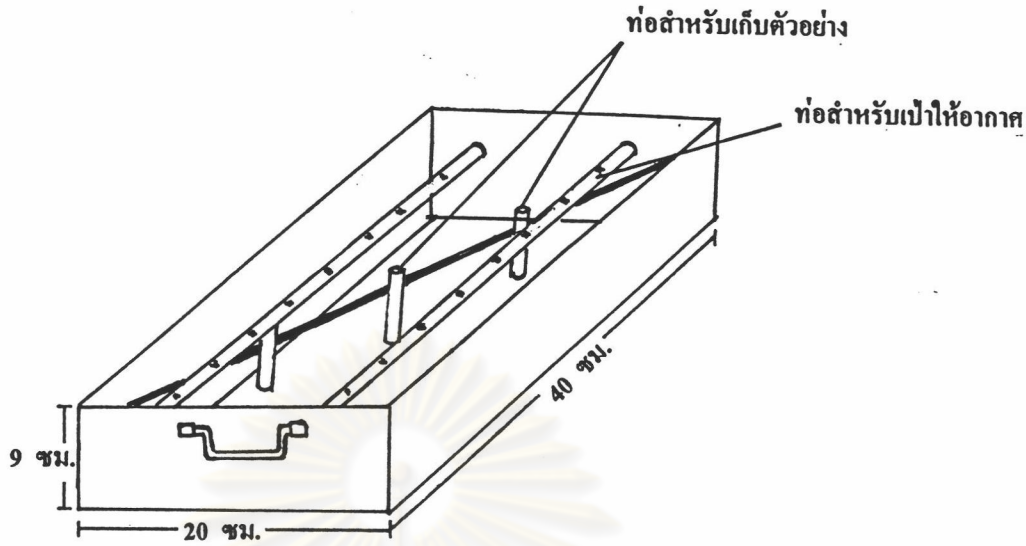
ทำการผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดเหมาะสมสำหรับกรดโคจิกจากการทดลองข้อ 10 คือ ถาดตื้นขนาด 4 ลิตรที่มีพื้นที่ผิวหน้า 800 ตารางเซนติเมตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูง 4 เซนติเมตร คิดเป็นปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 3.2 ลิตร ใช้หัวเชื้อที่เตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 3 คือ ประมาณ 3×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยแปรปริมาณของหัวเชื้อเป็น 2 5 8 11 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงโดยใช้ภาวะเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 4 เป็นเวลานาน 25 วัน ทำการตรวจวัดน้ำหนักแห้งของสายใย ปริมาณกรดโคจิก การใช้น้ำตาล ตามวิธีการทดลองข้อ 5 - 8 เปรียบเทียบผลผลิตกรดโคจิกจากการแปรปริมาณของหัวเชื้อ

12. การหาอัตราการเป่าอากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

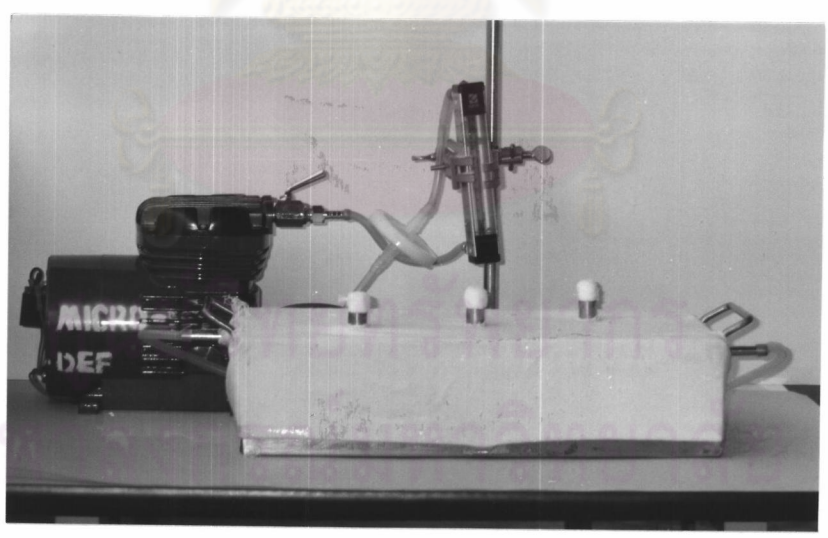
จากการทดลองของกนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล พบว่า การเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลอง ทำให้สามารถผลิตกรดโคจิกได้เร็วและปริมาณสูงขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงออกแบบท่อสแตนเลสที่มีรูเป็นแนวยาวตลอดสำหรับเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว (รูปที่ 11ก) ทำการผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกคือ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) แปรผันการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 2 เซนติเมตรเป็น 0 25 50 100 200 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาทีโดยจัดชุดอุปกรณ์ต่างๆ ดังรูปที่ 11ข ตรวจหาการเติบโต ปริมาณกรดโคจิก การใช้น้ำตาล ตามวิธีการทดลองข้อ 5 - 8 และวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหนือผิวหน้าอาหารเหลวด้วยเครื่องวัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ชนิดเคลื่อนย้ายได้ (portable CO_2 detector) โดยทำการวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เช่นเดียวกับวิธีการทดลองข้อ 13 เปรียบเทียบผลผลิตกรดจากการแปรอัตราการเป่าอากาศ

13. การวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหนือผิวหน้าอาหารเหลวในระหว่างการเติบโตและในบรรยากาศ

ทำการตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างการผลิตกรดโคจิก ดังนี้ คือ เหนือผิวหน้าอาหารเหลว 1 เซนติเมตร บริเวณผิวด้านนอกของผ้าที่ใช้ปิดปากภาชนะเพาะเลี้ยง และบรรยากาศภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องวัดก๊าซก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ชนิดเคลื่อนย้ายได้ (ยี่ห้อ Riken Keiki: รุ่น RI - 411A) ดังรูปที่ 12 ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการวัดด้วยเครื่องภายใน 1 นาที มีหน่วยเป็นจำนวนส่วนของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศหนึ่งล้านส่วน (part per million; ppm)



รูปที่ 11ก ไดอะแกรมของท่อสำหรับเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว



รูปที่ 11ข อุปกรณ์การเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวที่ประกอบเข้ากับถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิก

รูปที่ 12 เครื่องวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ชนิดเคลื่อนย้ายได้ (ยี่ห้อ Riken Keiki: รุ่น RI - 411A) โดยมีส่วนประกอบที่สำคัญในการตรวจวัด ดังนี้

1 คือ หน้าจอแสดงผลการทำงานของเครื่อง แสดงค่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่วัดได้ (มีหน่วยเป็นจำนวนส่วนของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศหนึ่งล้านส่วน)

2 คือ สวิตซ์เพื่อปรับไปยังตำแหน่งต่างๆที่ต้องการให้เครื่องทำงาน ดังนี้

OFF ปิดการทำงานของเครื่อง

BAT.CK สำหรับตรวจสอบพลังงานแบตเตอรี่

CONT สำหรับตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศในขณะนั้นทันที

AVG สำหรับตรวจวัดค่าเฉลี่ยปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศภายในช่วงเวลาที่ตั้งไว้ (สำหรับงานวิจัยนี้จะวัดค่าเฉลี่ยภายใน 1 นาที)

CAL สำหรับใช้ในการปรับเทียบ (calibration) ก่อนทำการตรวจวัด

3 คือ หัววัดและสายวัดสำหรับตรวจวัดสำหรับตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ

4 คือ ปุ่มปรับระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ก่อนปล่อยออกจากเครื่อง

14. การผลิตกรดโคจิกโดยมีการเติมสารอาหารในระหว่างกระบวนการผลิต

จากผลการทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่ากรดโคจิกเป็นผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ กล่าวคือ ราจะใช้สารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโตในช่วงแรกซึ่งเป็นช่วงที่ราต้องการแหล่งไนโตรเจนอย่างเพียงพอเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต โดยในช่วงนี้ราจะมีการผลิตกรดโคจิกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่เมื่อราเข้าสู่ช่วงภาวะการเติบโตคงที่ (stationary phase) ราจะใช้แหล่งคาร์บอนไปในการผลิตกรดโคจิกอย่างเต็มที่และจะได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดในช่วงนี้ด้วย ดังนั้น ในงานทดลองนี้จึงสนใจที่จะผลิตกรดโคจิกโดยมีการเติมสารอาหารในระหว่างกระบวนการผลิต ซึ่งจะเป็นการเพิ่มวัตถุดิบสำหรับผลิตกรดโคจิกซึ่งอาจทำให้ได้ผลผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นต่อการผลิต 1 ครั้ง

ผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร ใช้ปริมาณของหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จัดอัตราการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 2 เซนติเมตรเท่ากับ 50 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกตั้งต้นปริมาตร 2 ลิตรซึ่งส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นจะแตกต่างกัน จากนั้นจะเติมสารอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อครบ 3.2 ลิตรทุกการทดลอง ซึ่งจะแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 5 ดังนี้

ชุดการทดลอง ก. (control) อาหารตั้งต้นเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) ปริมาตร 3.2 ลิตร

ชุดการทดลอง ข. อาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นปริมาตร 2.0 ลิตร ที่มีองค์ประกอบอื่นๆครบถ้วนยกเว้นแหล่งคาร์บอนที่มีเพียง 200 กรัม โดยจะเติมแหล่งคาร์บอนในรูปสารละลายให้ครบตามปริมาตรในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิก

ชุดการทดลอง ค. อาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นปริมาตร 2.0 ลิตร ที่มีองค์ประกอบอื่นๆครบถ้วนยกเว้นแหล่งคาร์บอนที่มีเพียง 200 กรัมและแหล่งไนโตรเจนที่มีเพียง 2.9 กรัม แล้วเติมสารอาหารให้ครบตามสูตรในภาคผนวก ก3 โดยเติมแหล่งไนโตรเจนให้ครบในครั้งที่ 1 ของการเติมสารอาหาร

ชุดการทดลอง ง. อาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นปริมาตร 2.0 ลิตร ที่มีองค์ประกอบอื่นๆครบถ้วนยกเว้นแหล่งคาร์บอนที่มีเพียง 200 กรัมและแหล่งไนโตรเจนที่มีเพียง 1.939 กรัม แล้วสารอาหารให้ครบตามสูตรในภาคผนวก ก3 โดยเติมแหล่งไนโตรเจนให้ครบในครั้งที่ 2 ของการเติมสารอาหาร

ชุดการทดลอง จ. อาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นปริมาตร 2.0 ลิตร ที่มีองค์ประกอบอื่นๆครบถ้วนยกเว้นแหล่งคาร์บอนที่มีเพียง 200 กรัม โดยจะเติมแหล่งคาร์บอนคือผงกลูโคสลงไปให้ครบตามปริมาตรในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารอาหารที่เติมระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกโดยมีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิต

ชุดการทดลอง	ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น (ลิตร)	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น	องค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้เติมในแต่ละครั้ง (300 มล.)				ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดในทุกการทดลอง (ปริมาตรรวม 3.2 ลิตร)
			ครั้งที่ 1 (วันที่ 6)	ครั้งที่ 2 (วันที่ 9)	ครั้งที่ 3 (วันที่ 12)	ครั้งที่ 4 (วันที่ 15)	
ก (control)	3.2	กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 5.8 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.	-	-	-	-	กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 5.8 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.
ข	2.0	กลูโคส 200 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 5.8 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.	สลล.กลูโคส 30 กรัมในน้ำปลอดประจุ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0	สลล.กลูโคส 30 กรัมในน้ำปลอดประจุ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0	สลล.กลูโคส 30 กรัมในน้ำปลอดประจุ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0	สลล.กลูโคส 30 กรัมในน้ำปลอดประจุ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0	

ตารางที่ 5 (ต่อ) ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารอาหารที่เติมระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิก โดยมีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิต

ชุดการทดลอง	ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น (ลิตร)	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น	องค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้เติมในแต่ละครั้ง (300 มล.)				ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดในทุกการทดลอง (ปริมาตรรวม 3.2 ลิตร)
			ครั้งที่ 1 (วันที่ 6)	ครั้งที่ 2 (วันที่ 9)	ครั้งที่ 3 (วันที่ 12)	ครั้งที่ 4 (วันที่ 15)	
ค	2.0	กลูโคส 200 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 2.9 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 0.8 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.	กลูโคส 30 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 2.9 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 0.8 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0	กลูโคส 30 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0	กลูโคส 30 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0	กลูโคส 30 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0	กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 5.8 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.
ง	2.0	กลูโคส 200 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 1.93 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 0.53 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.	กลูโคส 30 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 1.93 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 0.53 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0	กลูโคส 30 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 1.93 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 0.53 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0	กลูโคส 30 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0	กลูโคส 30 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0	

ตารางที่ 5 (ต่อ) ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารอาหารที่เติมระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิก โดยมีการเติมสารอาหารเป็นระยะ

ชุดการทดลอง	ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น (ลิตร)	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น	องค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้เติมในแต่ละครั้ง (300 มล.)				ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดในทุกการทดลอง ปริมาตรรวม 3.2 ลิตร)
			ครั้งที่ 1 (วันที่ 6)	ครั้งที่ 2 (วันที่ 9)	ครั้งที่ 3 (วันที่ 12)	ครั้งที่ 4 (วันที่ 15)	
จ	2.0	กลูโคส 200 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 5.8 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.	ผงกลูโคส 30 กรัม กวนให้ละลายเบาๆ	ผงกลูโคส 30 กรัม กวนให้ละลายเบาๆ	ผงกลูโคส 30 กรัม กวนให้ละลายเบาๆ	ผงกลูโคส 30 กรัม กวนให้ละลายเบาๆ	กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 5.8 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.

เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ชั่งหาน้ำหนักแห้งของสายใย ปริมาณกรดโคจิก การใช้น้ำตาลตามวิธีการทดลองข้อ 5 - 8 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกที่ได้จากกระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารต่างๆเป็นระยะในระหว่างการผลิตกับกระบวนการผลิตกรดโคจิกแบบกะ

15. การผลิตกรดโคจิกโดยการใช้สายใยซ้ำ

ผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K13 ในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) ปริมาตร 3.2 ลิตรที่มีค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 4.5 ใช้ปริมาณของหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จัดให้มีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 2 เซนติเมตรในอัตราเร็วเท่ากับ 50 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน และเมื่อสิ้นสุดการผลิตกรดโคจิกในครั้งแรกจะถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าออก จากนั้นจะมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปโดยที่สายใยยังคงลอยอยู่ที่ผิวหน้าอาหารเหลวที่เติมลงไป ทำการผลิตกรดโคจิกซ้ำอีก 2 รอบ รวมเป็นการผลิตทั้งหมด 3 รอบการผลิต ซึ่งจะแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมในซ้ำที่ 1 และ 2 เป็นสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 3.2 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0

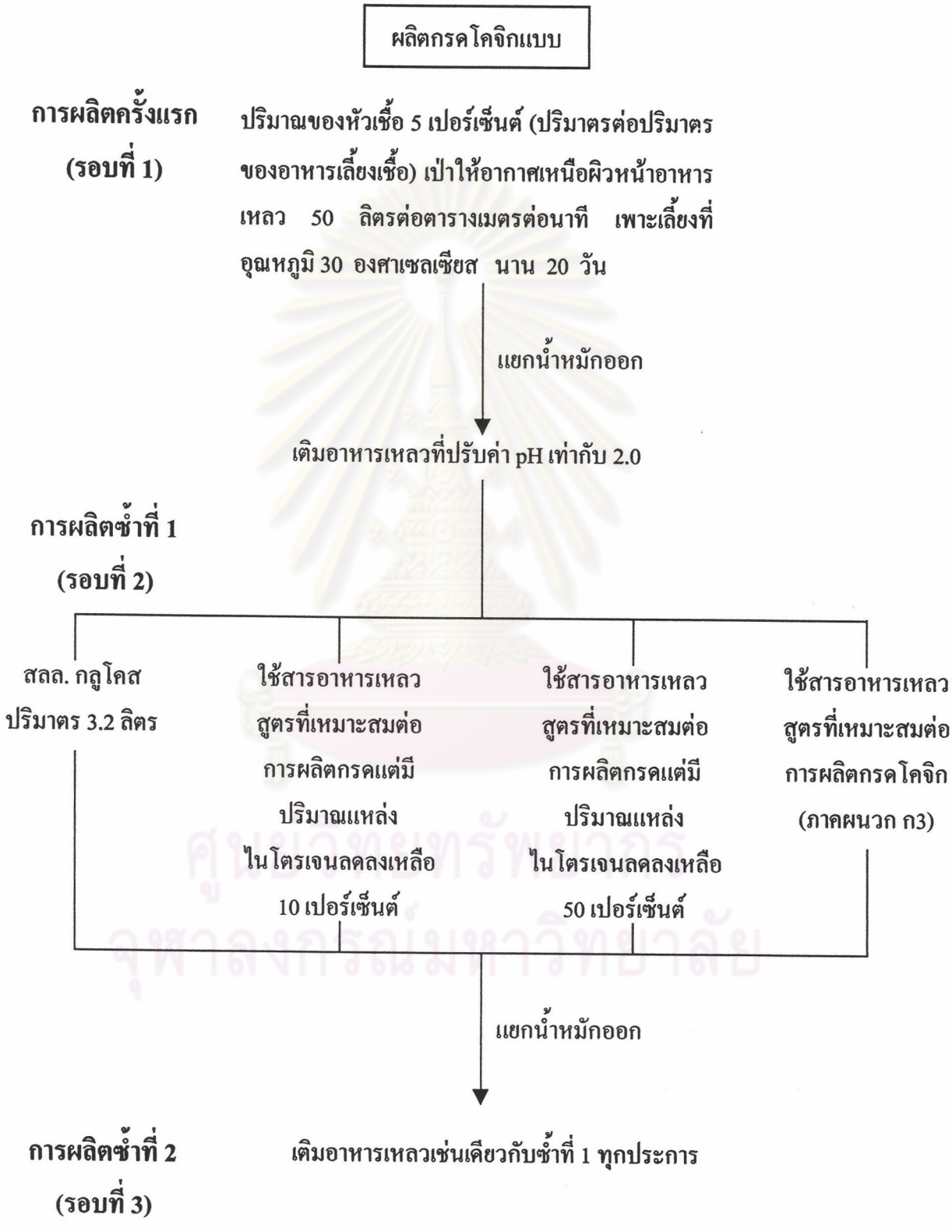
ชุดการทดลองที่ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมในซ้ำที่ 1 และ 2 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในสูตรที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) ที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนลดลงเหลือ 10 เปอร์เซ็นต์จากแหล่งไนโตรเจนเดิม ปริมาตร 3.2 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมในซ้ำที่ 1 และ 2 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในสูตรที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก ที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนลดลง 50 เปอร์เซ็นต์จากแหล่งไนโตรเจนเดิม ปริมาตร 3.2 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารเลี้ยงเชื้อใช้เติมในซ้ำที่ 1 และ 2 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกที่มีสารอาหารครบถ้วนตามภาคผนวก ก3 ปริมาตร 3.2 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0

ดังแสดงผังการทดลองดังนี้

สำหรับส่วนประกอบต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมจะแตกต่างกันในแต่ละการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 6


ผลิตกรดโคจิกแบบ
การผลิตครั้งแรก
(รอบที่ 1)
ปริมาณของหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 50 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน
แยกน้ำหมักออก
เติมอาหารเหลวที่ปรับค่า pH เท่ากับ 2.0
การผลิตซ้ำที่ 1
(รอบที่ 2)
สลล. กลูโคส
ปริมาตร 3.2 ลิตร
ใช้สารอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแต่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนลดลงเหลือ 10 เปอร์เซ็นต์
ใช้สารอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแต่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนลดลงเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์
ใช้สารอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3)
แยกน้ำหมักออก
การผลิตซ้ำที่ 2
(รอบที่ 3)
เติมอาหารเหลวเช่นเดียวกับซ้ำที่ 1 ทุกประการ

ตารางที่ 6 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำของ *A. oryzae* K13 ในแต่ละรอบการผลิต

ชุดการทดลอง	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละรอบการผลิต		
	รอบที่ 1	รอบที่ 2 (ซ้ำที่ 1)	รอบที่ 3 (ซ้ำที่ 2)
1	ปริมาตร 3.2 ลิตร กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 5.8 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.	ปริมาตร 3.2 ลิตร สลล.กลูโคส 320 กรัม	ปริมาตร 3.2 ลิตร สลล.กลูโคส 320 กรัม
2	ปริมาตร 3.2 ลิตร กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 5.8 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.	ปริมาตร 3.2 ลิตร กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 0.156 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.	ปริมาตร 3.2 ลิตร กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 0.156 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.
3	ปริมาตร 3.2 ลิตร กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 5.8 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.	ปริมาตร 3.2 ลิตร กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 2.65 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.	ปริมาตร 3.2 ลิตร กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 2.65 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.
4	ปริมาตร 3.2 ลิตร กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 5.8 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.	ปริมาตร 3.2 ลิตร กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 5.8 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.	ปริมาตร 3.2 ลิตร กลูโคส 320 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 5.8 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.6 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.32 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.172 มล.