บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1. เคมีภัณฑ์	บริษัทผู้ผลิต
ดี (+)กลูโคสโมโนไฮเดรต D (+)glucose monohydrate	E.Merck Darmstadt, Germany
แอมโมเนียมซัลเฟต ammonium sulfate	Fluka AG Buch, Switzerland
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต potassium dihydrogenphosphate	May and Baker Ltd., England
แมกนีเซียมซัลเฟต magnesium sulfate	May and Baker Ltd., England
เฟอร์รัสซัลเฟต ferrous sulfate	May and Baker Ltd., Endland
บรอมไธมอลบลู bromthymol blue	Fluka AG Buch, Switzerland
โซเดียมไฮดรอกไซด์ sodium hydroxide	E.Merck Darmstadt, Germany
กรดไฮโดรคลอริก hydrochloric acid	E.Merck Darmstadt, Germany
แอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี amberlite IR 120 P	Sigma Chemical Co., St.Louis, U.S.A.

018943

ฟีนอฟธาลีน phenophthalene	Fluka, AG Buch, Switzerland
กรดไดไนโตรซาลิซิลิก dinitrosalicylic acid	E.Merck Darmstadt, Germany
โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เตรท sodium potassium tartrate	May and Baker Ltd., England
พีจีโอ เอนไซม์ PGO enzyme	Sigma Chemical Co.,St.Louis, U.S.A.
โอ-ไดอะนิซิดีน O-dianisidine	Sigma Chemical Co.,St.Louis, U.S.A.

2. <u>เครื่องมือที่สำคัญในการวิจัย</u>

เครื่องเขย่าแบบโรตารี rotary shaker	New Brunswick Scientific Co., U.S.A.
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง spectrophotometer	รุ่น Spectronic 21 ของ Bausch and Lomb, U.S.A.
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ autoclave	Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
ตู้อบแห้ง dryer	รุ่น UL-80 ของ Memmert GmbH,Germany
อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ water batch	Tokyo Rikakikai Co.Ltd., Japan
ถังหมักขนาด 5 ลิตรและ เครื่องควบคุมสภาวะ 5 liter fermenter and controller	รุ่น MD-300 ของ L.E.Marubishi, Japan

วิธีดำเนินการทดลอง

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 ที่คัดเลือกจากดินหลายแหล่งในประเทศไทย พบว่า จุลินทรีย์ชนิดนี้ผลิตกรดกลูโคนิคเพียงชนิดเดียว (Homofermentative gluconic acid fungus)(กรรณิกา จันทรสอาด,2530)

2. การเก็บรักษาเชื้อ

เชื่อสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 โดยใช้เข็มเขี่ยลาก (streak)ลงบนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเดกสโตรส (potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก.1) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่ 4-8 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้แอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พีดูดซับโซเดียมไอออนจากโซเดียมกลูโคเนตมาตรฐาน เพื่อตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิค

3.1 หาเวลาที่เหมาะสมในการใช้แอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี ดูดซับโซเดียมไอออน

ผสมสารละลายโซเดียมกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จำนวน 1 มิลลิลิตร กับ แอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี ปริมาณ 12 มิลลิลิตร กวนด้วยเครื่องกวนที่อาศัยแรงแม่เหล็ก (magnetic stirrer) โดยแปรผันเวลาที่ใช้ในการกวนเป็น 15 30 45 60 และ 90 นาที แยกแอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี ออก นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิค โดยไตเตรทกับ 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบปริมาณกรดที่ได้ เมื่อใช้เวลาต่าง ๆ กัน

3.2 หาปริมาณแอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี ที่เหมาะสมในการดูดซับโซเดียมอิออน

ผสมสารละลายโซเดียมกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จำนวน 1 มิลลิลิตร กับ แอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี ปริมาตร 3 6 9 และ 12 มิลลิลิตร กวนด้วยเครื่องกวนที่อาศัยแรงแม่เหล็ก โดยใช้เวลาในการกวนที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3.1 แยกแอมเบอร์ไลท์ไอ-อาร์ 120 พี ออก ตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิค โดยไตเตรทกับ 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบปริมาณกรดที่ตรวจได้ เมื่อใช้แอมเบอร์ไลท์ในปริมาณที่แตกต่างกัน

4. การหาวิธีการที่เหมาะสมในการใช้แอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี ดูดซับโซเดียมอิออน

วิธีที่ 1. ผสมสารละลายโซเดียมกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) จำนวน 1 มิลลิลิตร กับ แอมเบอร์ไลท์ในปริมาณที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 3.2 คือ 9 มิลลิลิตร กวนด้วยเครื่องกวนที่ใช้แรงแม่เหล็ก ในเวลาที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 3.1 คือ 30 นาที แยกแอมเบอร์ไลท์ออก แล้วหาปริมาณกรดกลูโคนิคโดยไตเตรท กับ 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์

วิธีที่ 2. บรรจุแอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี ในปริมาณที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 3.2 คือ 9 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์แก้วที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซ็นติเมตร ผ่านสารละลายโซเดียมกลูโคเนตมาตรฐานเข้มข้น 10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ใช้เวลาที่เหมาะสมคือ 30 นาที เพื่อดูดซับโซเดียมอิออนจากผลการทดลองในข้อ 3.1 ปรับให้มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที นำสารละลายที่ได้มาตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิค เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคที่ตรวจได้กับวิธีที่ 1 แล้วเลือกใช้วิธีการ ปริมาณแอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี และเวลาที่เหมาะสม เพื่อดูดซับโซเดียมไอออน สำหรับการทดลองต่อไป

5. การเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต ในระดับขวดเขย่า

5.1 การเตรียมหัวเชื้อที่เป็นสปอร์ที่งอกแล้ว (รติกร กัณฑพงศ์,2534)

เพาะเลี้ยง *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 บนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเดกสโตรส ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน เติมน้ำกลั่นผสม tween 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ เขี่ยสปอร์ให้หลุดกระจายในน้ำ ปรับจำนวนให้เท่ากับ 12.5-25.0 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับจำนวนด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer)ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ่ายสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก.2) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง แล้วใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับงานวิจัยนี้

5.2 การผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมโดยวิธีการในข้อ 5.1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก.2 หรือ สูตรอื่นๆ ตามที่ระบุในการทดลอง) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่ผสมตัวบ่งชี้บรอมไธมอลบลู ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ควบคุมสภาวะการเลี้ยงเชื้อตามที่ได้ศึกษามาแล้ว (รติกร กัณฑพงศ์, 2534) ปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ระหว่าง 5.5-6.5 หรือ ตามที่ระบุในการทดลอง ด้วย 1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ บ่มบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 10 วัน

6. การเก็บเกี่ยว(harvest)กรดกลูโคนิค

แยกสายใย *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 จากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 นำน้ำใสที่ได้ไปตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิค ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ตามวิธีในข้อ 7 และ 8 ตามลำดับ ส่วนสายใยนำไปตรวจการเจริญเติบโต ตามวิธีในข้อ 9

7. การตรวจหาปริมาณการดกลูโคนิค

นำส่วนใสที่ได้จากการกรองสายใยในข้อ 6 มาผ่านลงในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซ็นติเมตร ซึ่งบรรจุแอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี แล้วนำสารละลายที่ผ่านการดูดซับไบโตเตรทหาปริมาณการดกลูโคนิคด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ฟีนอฟธาลีนเป็นตัวบ่งชี้ (Su และคณะ,1977)

8. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

8.1 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค(Dinitrosalicylic acid reagent) (ภาคผนวก ข.1) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน (Miller,1959)

8.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ใช้เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส ร่วมกับ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Peroxidase and Glucose : PGO enzyme) วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ผ่านการเลี้ยงเชื้อมาแล้วปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกริยากับสารละลายพีจีโอเอนไซม์ (ภาคผนวก ข.2) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาหาปริมาณกลูโคส โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Sigma Chemical Company,1980)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. การตรวจการเติบโตของเชื้อ *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G153

นำสายใยที่ได้จากการกรองในข้อ 6 มาทำให้แห้ง ในตู้อบอุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักแห้งของสายใย

10. การผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต ระดับขวดเขย่า

เพาะเลี้ยง *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ(ภาคผนวก ก.2) ที่ผสมตัวบ่งชี้บรอมไธมอลบลู และ ควบคุมสภาวะการเลี้ยงเชื้อตามที่เคยมีการศึกษามาแล้ว คือ แหล่งคาร์บอนใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 25 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพาะเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (รติกร กัณฑะพงศ์, 2534) ควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลอง ให้อยู่ระหว่าง 5.5-6.5 ด้วย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยค่อย ๆ เติมลงไปแทนการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่เติมลงไปเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ ตรวจปริมาณการผลิตกรด การเติบโต และวัดปริมาณน้ำตาลทุกวันจนสิ้นสุดการทดลอง

11. การแปรผันปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิค ในระดับขวดเขย่า

11.1 ทดลองผลิตกรดกลูโคนิค โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ กัน

เพาะเลี้ยงเชื้อ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 10 แปรความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 25% 30% และ 35% ตามลำดับ วัดปริมาณการผลิตกรด การเติบโต การใช้น้ำตาลทุกวัน และเปรียบเทียบผลผลิตกรด

11.2 ทดลองผลิตกรดกลูโคนิค โดยควบคุมช่วงความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ กัน

เพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 10 โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 30 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งได้จากผลการทดลองข้อ 11.1 ควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลองให้อยู่ระหว่าง 4.5-5.5 5.5-6.5 และ 6.5-7.5 ด้วย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้เมธิลเรด บรอมไธมอลบลู และฟีนอลเรดเป็นตัวบ่งชี้ตามลำดับ วัดปริมาณกรด การเติบโต การใช้น้ำตาลทุกวัน และ เปรียบเทียบผลผลิตกรด

12. การใช้น้ำตาลที่ได้จากแป้งไฮโดรไลเสส เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสบริสุทธิ์ในระดับขวดเขย่า

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลเสส ชนิดที่กรองแล้ว (บาจรีย์ จันทราภาณุกร, 2536) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด เป็นแหล่งคาร์บอน โดยปรับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 30 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5-6.5 ใช้สภาวะในการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 10 คือ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เปรียบเทียบผลผลิตกรด การเติบโต และการใช้น้ำตาล ระหว่างการใช้แป้งไฮโดรไลเสส กับการใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน

13. การหาสภาวะที่เหมาะสมบางประการ เพื่อผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 โดยวิธีการเดียวกับข้อ 5.1 ถ่ายหัวเชื้อ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร (5 % ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(ภาคผนวก ก.2) ปริมาณ 2,000 มิลลิลิตร แต่ใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคสข้น 30 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5-6.5 ตลอดการทดลอง ควบคุมสภาวะของถังหมัก โดยแปรผันสภาวะต่างๆดังนี้

13.1 แปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 1.0 1.5 และ 1.75 ลิตร/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ/นาที กำหนดให้อัตราการกวน เท่ากับ 600 รอบต่อนาที ใช้อะดีคานอลเป็นสารกำจัดฟอง

13.2 แปรผันอัตราการกวนเป็น 500 600 และ 700 รอบต่อนาที กำหนดให้อัตราการให้อากาศ เท่ากับ 1.5 ลิตร/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ/นาที ใช้อะดีคานอลเป็นสารกำจัดฟอง

13.3 แปรผันชนิดของสารกำจัดฟองต่าง ๆ กัน 3 ชนิด คือ อะดีคานอล น้ำมันถั่วเหลือง 100 % และ น้ำมันหมู

13.4 ทดลองใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุ ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยไม่เติมธาตุใด ๆ

เปรียบเทียบผลผลิตกรดภายใต้สภาวะต่าง ๆ กัน

14. <u>การทดลองใช้สายใยซ้ำเพื่อการผลิตไซเดียมกลูโคเนตในระดับขวดเขย่า</u>

14.1 <u>การทดลองใช้สายใยซ้ำ 2 ชนิด</u>

14.1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสม จากผลการทดลองในข้อ 11 และ 12 คือ ใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคสข้น 30 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5-6.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าแบบโรตารีความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งให้ผลผลิตสูงสุด แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสายใยเจริญอยู่ปริมาตร 15 มิลลิลิตร มาใช้ผลิตกรดซ้ำ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ปริมาตร 50 มิลลิลิตรและสภาวะเช่นเดิม

14.1.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 14.4.1 แต่กรองเอาเฉพาะสายใยมาใช้ซ้ำ เปรียบเทียบผลผลิตกรดจากเชื้อซ้ำทั้ง 2 ชนิด

14.2 การหาปริมาณสายใยที่เหมาะสมมาใช้ซ้ำเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 โดยใช้สายใยซ้ำชนิดที่เหมาะสม คือกรองใช้เฉพาะสายใย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 14.1 โดยแปรผันปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสายใยเจริญอยู่เป็น 10 15 และ 20 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและสภาวะเหมือนครั้งแรกปริมาตร 50 มิลลิลิตร เปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิคจากเชื้อซ้ำทั้ง 3 ขนาด แล้วเลือกใช้เชื้อซ้ำขนาดที่ให้ผลผลิตสูง สำหรับการทดลองต่อไป

14.3 การผลิตกรดกลูโคนิค 4 ครั้งติดต่อกัน โดยใช้สายใยซ้ำ

ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้สายใยซ้ำ ชนิดที่กรองเอาเฉพาะสายใยจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงจนครบ 4 ครั้ง ตามวิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 14.1 วัดและเปรียบเทียบผลผลิตกรด การเติบโต การใช้น้ำตาลและระยะเวลาที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดของแต่ละครั้ง

15. การทดลองใช้สายใยซ้ำ เพื่อผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก.2) แต่ใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคสข้น 30 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5-6.5 อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตร/ลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ/นาที อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ใช้อะดีคานอลเป็นสารกำจัดฟอง อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส จนได้ผลผลิตกรดสูงสุด นำสายใยที่กรองได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณที่เหมาะสม จากผลการทดลองในข้อ 14.2 คือ 600 มิลลิลิตร มาใช้ผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ 2,000 มิลลิลิตร จนครบ 4 ครั้ง เปรียบเทียบระยะเวลาและปริมาณการผลิตกรดของ 4 ครั้ง และเปรียบเทียบกับผลการทดลองในขวดเขย่า

16. <u>เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสายใยที่เก็บไว้ที่เวลาต่าง ๆ กัน ก่อนนำมาใช้เป็นหัวเชื้อซ้ำในการผลิตกรดกลูโคนิคในระดับขวดเขย่า</u>

ทดลองใช้สายใยซ้ำ โดยเลือกใช้ขนาดสายใยซ้ำที่เหมาะสม คือ กรองเอาเฉพาะสายใยจากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร เก็บสายใยที่กรองได้ไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1 3 5 และ 7 วัน แล้วจึงนำสายใยมาใช้ผลิตกรดซ้ำ สำหรับการทดลองต่อไปโดยเพาะเลี้ยงจนได้ผลผลิตกรดสูงสุด (6 วัน) เปรียบเทียบผลผลิตกรด เมื่อใช้สายใยที่เก็บไว้เวลาต่าง ๆ กัน

17. <u>การตรวจสอบชนิดของกรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นจากเชื้อ *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 โดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)</u>

นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 มาผ่านคอลัมน์ที่บรรจุแอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาชนิดของกรดที่สร้างขึ้นด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu LC-3A) โดยใช้ Zorbox-C8 (L-3555) คอลัมน์ขนาด 25 ซม.x 4.6 มม.ID ของบริษัท Dupont มี 20 มิลลิโมล่าร์ กรดฟอสฟอริก pH 2.5 เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detecter ที่ 210 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกรดกลูโคนิคมาตรฐาน