บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) บริษัท International Scientific supply Co. Ltd.,Thailand

1.2 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D 0601 model 500 บริษัท Memmert , U.S.A.

1.3 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (rotary shaker) รุ่น Gyrotory G 10 บริษัท New Brunswick Scientific , U.S.A.

1.4 ฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิเมตร บริษัท Boeco , West Germany

1.5 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical Co.Ltd. Japan

1.6 ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300 บริษัท L.E. Marubishi, Japan

1.7 ตู้ดูดอากาศ

1.8 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Novaspec II บริษัท Pharmacia Biotech , England

1.9 เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius , Germany

1.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 บริษัท Eutech Cyberscan , Singapore

1.11 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

1.12 ชุดเครื่องกรองเซลล์

1.13 เครื่องอินฟราเรดโครมาโตรกราฟฟี (Infrared chromatography model FTIR-1760X Perkin Elmer,U.S.A.)

1.14 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (hot air oven)

1.15 Magnetic stirrer (model SP-18420 , Nuova 7 stir-plate,U.S.A.)

1.16 สากและโกร่งอะเกต (pestle and agate mortar

1.17 Hydraulic press

1.18 Disc holder with adaptor

1.19 Vacuum pump

2. สารเคมี

2.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (JT Baker ,U.S.A.)

2.2 กรดไฮโดรคลอริก (JT Baker ,U.S.A.)

2.3 กรดอะซิติก (JT Baker ,U.S.A.)

2.4 เมทานอล (commercial grade)

2.5 เอทานอล 95 % (commercial grade)

2.6 แอมโมเนียมซัลเฟต (Merck , U.S.A.)

2.7 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Merck , U.S.A.)

2.8 สารสกัดจากยีสต์ (Merck , U.S.A.)

2.9 แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต (Merck , U.S.A.)

2.10 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Merck , U.S.A.)

2.11 ไคติน (Unicord Co.Ltd.,Thailand)

2.12 ไคโตแซน (Sigma No.C-3646 , U.S.A.)

2.13 โพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr ,analytical grade)

3. วิธีดำเนินการวิจัย

1. จุลินทรีย์ และ การตรวจสอบเชื้อและการเก็บรักษา

Aspergillus niger เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ทดลองเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากโรงงานผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม

การตรวจสอบเชื้อและการเก็บรักษาสายพันธุ์ *Aspergillus niger*

ใช้วิธีการแยกด้วยการ Streak plate เป็นวิธีการแยกเชื้อ โดยขีดเชื้อลงบนอาหารแข็ง คือ Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการงอกของสปอร์ทุก 1 อาทิตย์ เมื่อพบว่าสายใยและสีของสปอร์ของรางอกเป็นกลุ่มแล้วใช้เข็มเขี่ย (Needle) เขี่ยก้านชูอับสปอร์ (conidiospore) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Stereomicroscope) แตะปลายแท่งของเข็มเขี่ยที่มีสปอร์ติดอยู่บน PDA ที่บรรจุอยู่ในหลอดอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) ต้องตรวจสอบเชื้อให้ถูกต้องก่อน ด้วยการดูลักษณะสีและโคโลนีของเชื้อเป็นหลัก ก่อนนำสายพันธุ์รามาใช้ในการทดลองต่อไป

เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว นำเชื้อที่ได้มาทำ Slide culture โดยตัดชิ้นของอาหาร PDA เป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ กว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 1 เซนติเมตร หนา 1 เซนติเมตร วางบนแผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมเขี่ยรามาแตะที่บริเวณด้านข้างของวุ้นอาหารทั้ง 4 ด้าน วางแผ่นปิดสไลด์ไว้ด้านบนของวุ้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-4 วัน แล้วใช้ปากคีบ คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ออก แยกชิ้นอาหารออกจากสไลด์ หยดสีย้อม Lactophenol cotton blue บนสไลด์แล้วปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ ศึกษาลักษณะช่อสปอร์ head เซลล์ที่ฐาน (base cell) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และลักษณะภายนอก ก็บสีของเชื้อในหลอดอาหารประกอบไปด้วย นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งลาดเอียง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 7-12 วัน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์เต็มที่แล้ว จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และจะทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ในทุกๆ 1 เดือน โดยใช้วิธีการเดียวกัน

2. การเตรียมกล้าเชื้อ

2.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น (starter) ของรา *Aspergillus niger*

2.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นในรูปสปอร์

เลี้ยงรา *Aspergillus niger* บนอาหารแข็งลาดเอียงของ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน จนราสร้างสปอร์ เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่ผสมกับTween 80 ที่ปลอดเชื้อแล้วลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดเลี้ยงเชื้อโดยใช้ลูปที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยสปอร์ให้หลุดกระจาย จากนั้นทำการนับสปอร์ด้วย Haemacytometer เมื่อหาจำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตรได้แล้ว เก็บไว้ใช้เป็นกล้าเชื้อในการเพาะเลี้ยงต่อไป ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ปริมาณของกล้าเชื้อ 10% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นในรูปกลุ่มสายใย (เพลเลต)

นำสปอร์แขวนลอยและนับจำนวนให้เท่ากันตามที่บรรยายในข้อ 2.1.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) เพื่อให้สปอร์งอกในอาหารเหลวเป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงนำไปเป็นกล้าเชื้อในอาหารที่เตรียมสำหรับการผลิต โดยใช้ปริมาณเพลเลตเริ่มต้น 10% ในอาหารเหลวที่เท่ากัน เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อและเป็นการเปรียบเทียบระหว่างกล้าเชื้อในรูปของสปอร์กับกล้าเชื้อในรูปของเพลเลต ว่ากลุ่มใดจะให้น้ำหนักแห้งของเซลล์สูงกว่า

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ชีวมวล (biomass) สูง

3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* โดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นในรูปสปอร์

นำเอาสปอร์มานับหาปริมาณเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น ที่ $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบเป็นแป้งมันสำปะหลัง 2.3% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 % โพแทสเซียมไดไฮโดรเจน-ฟอสเฟต 0.5% สารสกัดจากยีสต์ 0.4% และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% pH 5.6 เป็นสูตรอาหารควบคุม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมสปอร์ของราที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกวัน

นำมาหาค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ ค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้าย ทุกๆ วัน

3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* โดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นในรูปกลุ่มสายใย (เพลเลต)

เพื่อเป็นการเปรียบเทียบกับการใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นที่อยู่ในรูปของสปอร์ และในรูปของเพลเลต โดยจะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบเดียวกันและวิธีการเดียวกันกับกล้าเชื้อเริ่มต้นที่อยู่ในรูปสปอร์ เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรควบคุม โดยใช้ปริมาตรของเพลเลตปริมาณเท่ากันกับสปอร์ 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเท่ากัน 7 วัน หาค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ pH สุดท้าย ทุกวัน เพื่อตรวจสอบว่า กล้าเชื้อเริ่มต้นที่อยู่ในรูปแบบใด ให้น้ำหนักแห้งได้สูงกว่า จะใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นรูปแบบนั้น เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป

4. <u>วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง</u>

4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างที่ได้จากการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรมาตรฐานมากรองด้วยเครื่องกรอง โดยใช้ผ้าร่มที่น้ำผ่านได้เป็นแผ่นกรอง เพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ด้วยเครื่องชั่งละเอียด ซึ่งได้ทดสอบว่าน้ำหนักไม่ลดลงไปกว่าเดิมแล้ว ได้ค่าของน้ำหนักแห้งของเซลล์

4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรมาตรฐานมาหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอสเอ (Bernfeld , 1955) โดยการนำน้ำเลี้ยงที่ได้มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นใน

อ่างน้ำเย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

4.3 ปริมาณกรด

นำน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วหยดฟีนอฟทาลีน 1 เปอร์เซนต์ 3-5 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ ไตเตรตด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล เมื่อถึงจุดยุติ จะให้สีชมพูอ่อน จากนั้นคำนวณหาค่าปริมาณกรดด้วยวิธี ดังนี้

$$\% \text{ total acidity (g/100 ml)} = \frac{(V)\,(N)\,(MW)\,(100)}{(1000)\,(U)}$$

โดยกำหนดให้ V คือ ปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล ที่ใช้ในการไตเตรตจนถึงจุดยุติ (มิลลิลิตร)

N คือ นอร์มัลของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

MW คือ น้ำหนักโมเลกุลของกรดที่ต้องการหาในการทดลองนี้คือ กรดซิตริก

U คือ ปริมาตรของน้ำเลี้ยงที่นำมาไตเตรต

4.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง วัดด้วย pH-meter

5. การเตรียมแป้งมันสำปะหลังโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (EC 3.2.1.1)

การเตรียมแป้งมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ (starch hydrolysated) โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง (ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลเอี๊ยบตงจั่น) โดยแปรผันเปอร์เซนต์แป้งกับปริมาณของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Kleistase E5) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อายิโนะโมโตะ จำกัด ที่จะนำมาใช้ในการย่อย เพื่อหาเปอร์เซนต์แป้งสูงสุดที่สามารถย่อยด้วยเอนไซม์ 150 หน่วย ภายในเวลา 30 นาที โดยเตรียมแป้งมันสำปะหลังเป็นเปอร์เซนต์ต่างๆที่ 2 ,4 ,6 ,8 ,10 ,12 % กับปริมาณของเอนไซม์

150 หน่วย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อปริมาตร enzyme diluting buffer (ภาคผนวก ข) โดยการนำแป้งที่เปอร์เซนต์ดังกล่าวมาละลายในน้ำ 87.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแป้งมันสำปะหลังเกิดความข้นเหนียว จากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของเอนไซม์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 1:7) ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เมื่อแป้งมันสำปะหลังเกิดการย่อยสลายแล้ว ซึ่งสามารถจะสังเกตได้จากการที่แป้งไม่จับตัวเป็นก้อน มองเห็นเป็นน้ำใส ทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอสเอ (DNSA)

6. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ชีวมวล (biomass) สูง ในระดับขวดเขย่า

6.1 การแปรผันปริมาณของแป้งมันสำปะหลัง

ทำการเตรียมแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้เปอร์เซนต์ที่เหมาะสมจากข้อ 5 นำมาเลี้ยงรา *Aspergillus niger* ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ทำการย่อยด้วยวิธีข้างต้น ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 2 , 4 , 6 , 8 % แล้วเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5% โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5% สารสกัดจากยีสต์ 0.4% และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% pH 5.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสปอร์ของรา $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน (ยุพา,2521) ซึ่งถือเป็นอาหารสูตรควบคุม เก็บผลที่ได้จากการทดลองโดยการกรอง นำสายใยมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนน้ำใสนำมาหาค่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณกรด และ ความเป็นกรด-ด่างสุดท้าย ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้ว เพื่อหาปริมาณเปอร์เซนต์แป้งที่ได้ผ่านการย่อย แล้วนำมาเพาะเลี้ยงราเพื่อให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด ใช้เปอร์เซนต์แป้งนั้นเป็นเปอร์เซนต์ของแป้ง ที่จะใช้ในการทดลองต่อไป หลังจากนั้นเมื่อทราบว่าเปอร์เซนต์แป้งใดให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นเท่าใด แล้วจะนำเอาเซลล์ราอบแห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังน้อยที่สุด มาทำการสกัดไคติน โดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการกำจัดโปรตีน แล้วล้างด้วยน้ำ จากนั้นกำจัดสีและไขมันด้วยการใช้เอทานอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซนต์ ล้างด้วยน้ำ

จากนั้นนำไปอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเอาไคตินที่สกัดได้ไปทดสอบหาอินฟราเรดสเปกตรัมด้วยวิธีการใช้แสงอินฟราเรด (infrared spectroscopy) ของ Perkin Elmer model 1760X,U.S.A.(ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ทำการเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมกับไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้งว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร

6.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

6.2.1 ได้ใช้แหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ใช้ปริมาณเท่ากัน 0.5% ในการเลี้ยงรา *Aspergillus niger* ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ปริมาณ 8% เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 % สารสกัดจากยีสต์ 0.4% และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% pH 5.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสปอร์ของราจำนวน $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บผลการทดลองโดยการกรอง นำสายใยมาหาน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยการกรอง ทำการแยกส่วนน้ำเลี้ยงนำมาหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณกรด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง จากค่าน้ำหนักของเซลล์แห้งมากที่สุดจะทราบว่าแหล่งไนโตรเจนใดมีความเหมาะสมจะเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนนั้นในการทดลองต่อไป จากนั้นจะนำเอาเซลล์ราอบแห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิด มาทำการสกัดไคติน ด้วยวิธีดังข้อ 6.1 เมื่อได้อินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินที่ได้จากการสกัดจากเซลล์ราที่เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้ง 4 ชนิด แล้วทำการเปรียบเทียบกับไคตินที่ได้จากกุ้งว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่

6.2.2 การแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อได้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 6.2.1 นำมาหาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยเลี้ยงรา *Aspergillus niger* ในอาหารเหลวที่มีปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แตกต่างกันเริ่มจาก 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5 % แป้งมันสำปะหลังที่ได้เปอร์เซนต์ที่เหมาะสม 8 % แล้วเติมสารอาหารอื่นตามสูตร

อาหารควบคุม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.6 จากนั้นทำการฆ่าเชื้อแล้วเติมสปอร์ของราจำนวน $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บผลการทดลองโดยการกรอง นำสายใยมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำเลี้ยงจะนำมาหาค่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณกรด และ วัด pH สุดท้าย จะเลือกใช้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตน้อยที่สุดที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งเซลล์แห้งสูงสุดเป็นปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในการทดลองต่อไป

6.3 การแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์

เลี้ยงรา *Aspergillus niger* ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยใช้ความเข้มข้นของแป้งจากข้อ 6.1 และปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมจากข้อ 6.2.2 แล้วเติมสารอาหารอื่นตามสูตรอาหารควบคุม โดยแปรผันปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่แตกต่างกันไป เริ่มจาก 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5 % ปริมาตรของอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.6 ทำให้ปลอดเชื้อ แล้วเติมกล้าเชื้อจำนวน $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งโดยการกรอง นำสายใยมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนน้ำใสมาหาค่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง พิจารณาเลือกใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์น้อยที่สุดที่ให้ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของราสูงสุดไว้ใช้ในการทดลองต่อไป เมื่อได้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมแล้วนำเซลล์ราที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณสารสกัดจากยีสต์น้อยที่สุด มาทำการสกัดไคตินโดยใช้วิธีตามข้อ 9 เมื่อได้อินฟราเรดสเปกตรัมแล้วเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้ง เพื่อดูว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์มีผลอย่างไรต่อไคตินหรือไม่

6.4 การแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)

เลี้ยงรา *Aspergillus niger* ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 6.1 ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมจากข้อ 6.2.2 ปริมาณสารสกัดจากยีสต์จากข้อ 6.3 แล้วเติมสารอาหารอื่นๆตามสูตรอาหารควบคุม ใช้ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.005 , 0.01 ,0.015 ,0.02 ,0.025 , 0.03 และ 0.035% อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.6 จากนั้นเติมสปอร์ของราจำนวน $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 วัน ทำการกรอง อบสายใยราให้แห้ง แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก ส่วนน้ำใสนำมาหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณกรด และ ค่า pH และจะเลือกใช้ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรตที่น้อยที่สุดที่ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด ไว้ใช้ในการทดลองต่อๆไป

6.5 การแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้น

นำสปอร์แขวนลอยของ *Aspergillus niger* มานับจำนวนสปอร์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง ปริมาณของสปอร์ 10^5 10^6 10^7 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารที่ทำการปรับปรุงแล้วโดยมีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยจากข้อ 6.1 ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตจากข้อ 6.2.2 และ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจน-ฟอสเฟต 0.5% สารสกัดจากยีสต์จากข้อ 6.3 และ $MgSO_4.7H_2O$ จากข้อ 6.4 ในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH 5.6 ทำให้ปลอดเชื้อ แล้วเติมสปอร์ของราที่เตรียมไว้ที่ปริมาณเริ่มต้นต่าง ๆ กัน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 5 วัน วัดหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ทุกๆวัน พิจารณาว่าจำนวนของสปอร์เริ่มต้นที่เท่าใดที่ให้ค่า น้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด

6.6 การคัดเลือกความเร็วรอบของเครื่องเขย่า

นำ *Aspergillus niger* มาเลี้ยงในอาหารเหลวตามสูตรปรับปรุง เหมือนข้อ 6.5 เติมสปอร์ของราที่เหมาะสม จากข้อ 6.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบต่าง ๆ กัน คือ 150 , 200 และ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บผลการทดลองทุกวันเป็นเวลา 5 วัน หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด ค่าความเป็นกรด-ด่าง เปรียบเทียบความเร็วรอบของเครื่องเขย่าใด ให้น้ำหนักแห้งสูงสุดใช้เป็นความเร็วรอบของเครื่องเขย่าในการทดลองต่อๆ ไป

7. การเลี้ยง *Aspergillus niger* ในอาหารเหลวสูตรปรับปรุง

เพื่อศึกษาถึงระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เลี้ยงรา *Aspergillus niger* ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมจากข้อ 6.1 ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมจากข้อ 6.2.2 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5% สารสกัดจากยีสต์ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 6.3 และแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 6.4 ใช้ปริมาตรอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 5.6 เติมสปอร์ของราที่เตรียมไว้ นับจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 6.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ได้ค่าความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 6.6 ที่อุณหภูมิห้อง เก็บผลการทดลองทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เก็บผลการทดลองทุกวันนำมาหาค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณกรด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง แล้วเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลล์ว่าที่ ระยะเวลาเพาะเลี้ยงวันใดเป็นวันที่มีน้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด ใช้วันนั้นเป็นวันที่เก็บผลในการทดลองต่อไป

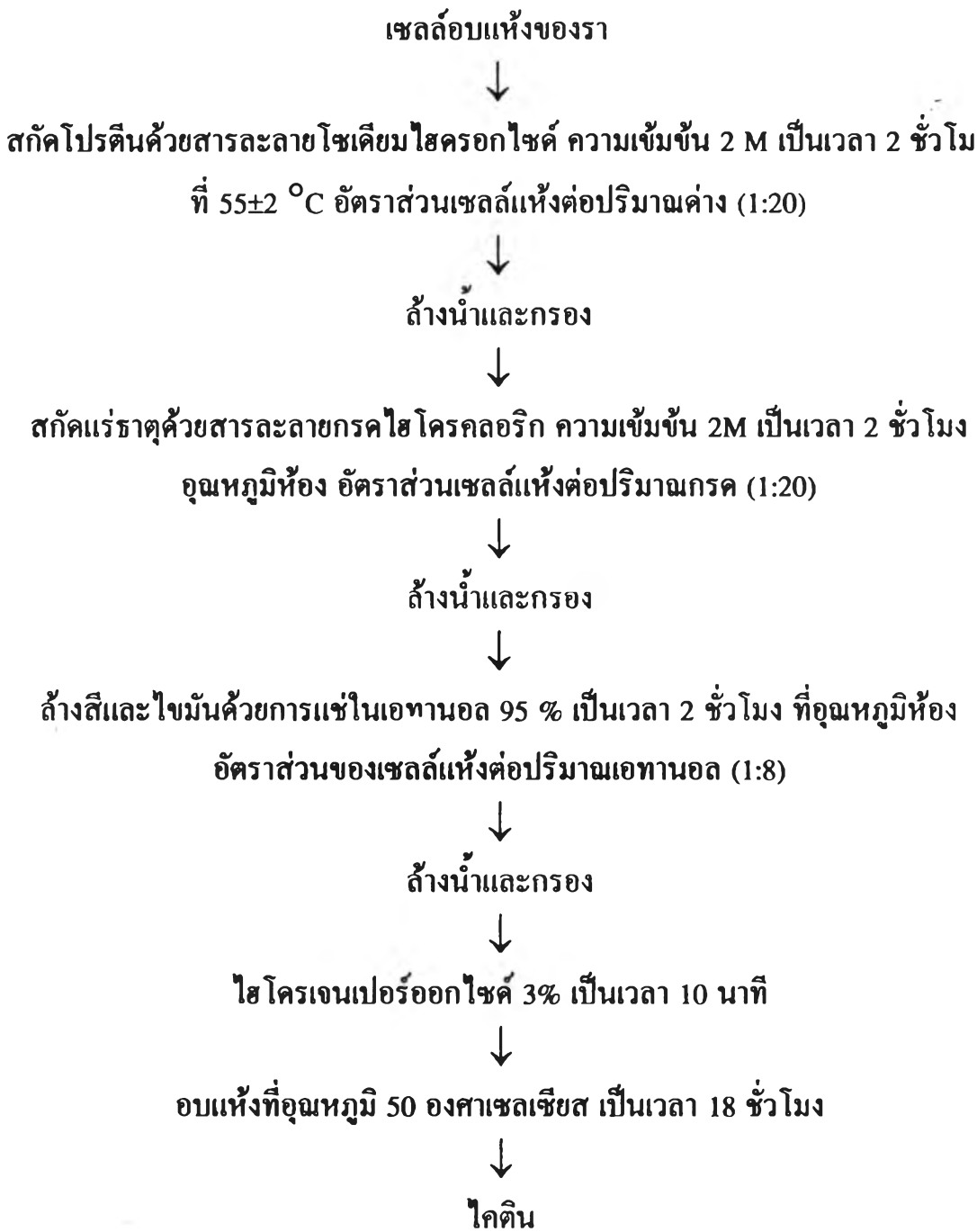
8. การศึกษาการเลี้ยง Aspergillus niger ในระดับถังหมัก

จากข้อมูลข้อที่ 6 และ 7 ทำการศึกษาเบื้องต้นในการเลี้ยง *Aspergillus niger* ในระดับถังหมัก โดยใช้ปริมาตรอาหาร 3,000 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (บริษัท L.E. Marabushi , Japan รุ่น MD-300) โดยใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อ 1 ลิตรของอาหารต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยใช้สภาวะในการควบคุมถังหมักที่เลี้ยงเชื้อตามสภาวะของ Yigitoglu (1992) เป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง เก็บผลการทดลองทุก ๆ 5 ชั่วโมง แยกเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง นำน้ำเลี้ยงที่ได้นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณกรด และค่าความเป็นกรด-ด่าง แล้วบันทึกผลการทดลอง

9. <u>การสกัดไคตินจากเซลล์รา *Aspergillus niger*</u>

นำเซลล์ราอบแห้ง มาสกัดโปรตีนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 55 ± 2 °C โดยใช้อัตราส่วนของเซลล์แห้งต่อปริมาณด่างเป็น 1:20 (Bough, 1978) ล้างน้ำและกรองด้วยผ้ากรองที่เป็นผ้าร่ม สกัดแร่ธาตุโดยการใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของเซลล์แห้งต่อปริมาณกรดเป็น 1:20 (Cosio ,1982) ล้างด้วยน้ำจนค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง ทำการกรองและจะนำมาล้างสีและไขมันด้วยเอทานอล 95 % โดยอัตราส่วนปริมาณเซลล์แห้งต่อปริมาณเอทานอลเป็น 1:8 (Naczk ,1981) เมื่อกำจัดโปรตีนและแร่ธาตุและทำการล้างสีและไขมันแล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง ตรวจสอบไคตินที่แยกได้ด้วยวิธีการใช้แสงอินฟราเรดโดยใช้เครื่อง (FT-IR 1760X Perkin-Elmer) โดยเตรียมตัวอย่างเป็น KBr Disc (ภาคผนวก ข) เปรียบเทียบกับไคตินมาตรฐานจากกุ้ง ซึ่งขั้นตอนในการแยกไคตินแสดงได้ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ขั้นตอนการสกัดไคตินออกจากเซลล์ราอบแห้ง

10. <u>การเปลี่ยนไคตินให้เป็นไคโตแซน</u>

นำไคตินที่ได้ทดสอบด้วยวิธีอินฟราเรดแล้ว มากำจัดหมู่อะซิติลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ตามวิธีของ Domard (1983) โดยทำการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 % (w/v) ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะบรรยากาศ อัตราส่วนของไคตินต่อปริมาณสารละลายด่าง เท่ากับ 1:20 ปิดฝาบีกเกอร์ด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เมื่อครบตามระยะเวลาแล้ว ทำการกรองแยกเอาส่วนที่ตกตะกอนออกมา ล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งส่วนน้ำใสมีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง ทดสอบด้วยกระดาษวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งวิธีการในการเปลี่ยนไคตินให้เป็นไคโตแซนสามารถแสดงได้ดังแผนภูมิในรูปที่ 6

ไคติน

↓

กำจัดหมู่อะซิติลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 110 °C ระยะเวลา 4 ชั่วโมง อัตราส่วนของไคตินต่อปริมาณด่าง (1:20)

↓

ล้างน้ำและกรอง

↓

อบแห้งที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

↓

ไคโตแซน

รูปที่ 6 ขั้นตอนการกำจัดหมู่อะซิติลออกจากไคตินของรา

จากนั้นนำเอาไคโตแซนที่ได้จากการทดลองมาตรวจสอบด้วยวิธีการใช้แสงอินฟราเรด (infrared spectrophotometry) เปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของไคโตแซนที่ได้จากรากับอินฟราเรดสเปกตรัมของไคโตแซนที่ได้กุ้งว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร

I18283986

11. การวิเคราะห์หาค่า Degree of Deacetylation (%D.D.) ของไคโตแซน

นำไคโตแซนที่ได้จากข้อ 10 มาหาค่า %D.D. ด้วยการไตเตรตตามวิธีของ Hayes (1978) มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมไคโตแซนไฮโดรคลอไรด์ นำเอาไคโตแซน 2.5 กรัม มาละลายใน 200 มิลลิลิตร ของกรดอะซิติกความเข้มข้น 10 % ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน (stirrer) 15 นาที จากนั้นกรองส่วนที่ไม่ละลายออก ด้วยผ้ากรองที่เป็นผ้าร่ม แยกส่วนที่ละลายได้แล้วมาเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ขั้นตอนนี้ต้องทำช้า ๆ และต้องระมัดระวัง จะกรองแยกส่วนที่เป็นน้ำกับตะกอนด้วยผ้ากรองอีกครั้ง เมื่อได้ส่วนที่ตกตะกอนแล้ว เติมเมทานอล 100 มิลลิลิตร เพื่อเป็นการล้างกรด จากนั้นกรองด้วยผ้ากรอง นำตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2. เมื่อได้ไคโตแซนไฮโดรคลอไรด์ ชั่งให้ได้ปริมาณที่แน่นอน 1 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด จากนั้นละลายในน้ำปริมาตร 250 มิลลิลิตร แบ่งมา 50 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ 125 มิลลิลิตร ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.0876 โมลาร์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

3. บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรต เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า %D.D.