บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1. เคมีภัณฑ์

น้ำตาลดี (+) กลูโคสโมโนไฮเดรต (D (+) Glucose monohydrate) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลซูโครส (Sucrose) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลมอลโตส (Maltose) ของบริษัท Difco laboratories, U.S.A.

น้ำตาลฟรุคโตส (Fructose) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลดี (+) ไซโลส (D (+) Xylose) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลทรายขาวของบริษัทน้ำตาลมิตรผล จำกัด

โซเดียมไนเตรต ($NaNo_3$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท May and Baker Ltd, England

โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSo_4.H_2O$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

เฟอรัสซัลเฟต ($Fe_2(SO_4)_3.7H_2O$) ของบริษัท BDH laboratory Chemicals Ltd, England

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

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

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

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท May and Baker Ltd, England

เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ของบริษัท BDH laboratory Chemicals Ltd, England

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Riedel - dehaen , Germany

กรดไดไนโตรซาลิซิลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

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

ฟีนอล (Phenol) ของบริษัท Riedel - dehaen , Germany

กรดซัลฟุริก (H_2SO_4) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท Fluka AG Buch, Switzerland

กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท May and Baker Ltd, England

ซีลีเนียมออกไซด์ (SeO_2) ของบริษัท BDH laboratory Chemicals Ltd, England

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ของบริษัท May and Baker Ltd, England

โปตัสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ของบริษัท May and Baker Ltd, England

บรอมครีซอลกรีน (Bromocresol green) ของบริษัท BDH laboratory Chemicals Ltd, England

2. อุปกรณ์ที่สำคัญ

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

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc, USA.

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560 E ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc, USA.

ตู้อบแห้ง (Hot air oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memert Gmbh, Germany

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

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama manufacturing corporation, Japan

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) รุ่น O-207 ของบริษัท Memert Gmbh, Germany

อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด (haemacytometer) ขนาด blight line deep 1/10 มม. ของบริษัท Boeco, Germany

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 70 ของบริษัท Beckman, USA.

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

เครื่องวิเคราะห์จุดหลอมเหลว (Differential Scanning Colorimetry, DSC) รุ่น DSC-200 ของบริษัท Netzsch

เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน CHNS/O Analyser (Perkin Elmer PE2400 Series II : Option CHN)

ชุดกลั่น Hoskins สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl ของบริษัท A. Gallenkamp & Co. Ltd., England

วิธีดำเนินการทดลอง

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Aspergillus oryzae* K-13 ที่คัดเลือกจากดินหลายแหล่งในประเทศไทย (เพชรรุ่ง พันธุ์พิริยะ , 2536)

2. การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เขี่ยสปอร์ของรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อลากลงบนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส (potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-6 วัน เมื่อราสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมหัวเชื้อ

3.1 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์แขวนลอย

เพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 บนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4-6 วัน หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นผสมทวีน 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร / ปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดกระจายในน้ำ ปรับจำนวนให้เท่ากับ 1-2 x 10^8 สปอร์ต่อสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนับจำนวนด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป

3.2 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอก

ถ่ายสปอร์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอก (ภาคผนวก ก2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าโรตารี่ ด้วย ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วใช้เป็นหัวเชื้อสปอร์งอกที่มีความหนาแน่นเป็น 2-4 x 10^8 สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. การผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์แขวนลอย หรือหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 หรือ 3.2 ตามที่ระบุไว้ในแต่ละการทดลองปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกสูตรต่างๆ ตามที่ระบุในการทดลอง (ภาคผนวก ก3-7) ปริมาตร 120 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) หรือตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง เป็นเวลา 20 วัน

5. การเก็บเกี่ยวกรดโคจิก

กรองแยกสายใย *Aspergillus oryzae* K-13 ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิก ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 หลังจากนั้นนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการกรองไปตรวจหาปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 7 และ 10 ตามลำดับ ส่วนสายใยราที่กรองได้นำไปวัดการเติบโตตามวิธีการทดลองข้อ 6

6. การวัดการเติบโตของรา *Aspergillus oryzae* K-13

ล้างสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ที่ได้จากการกรองข้อ 5 แล้วนำมาทำให้แห้ง โดยนำไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งของสายใย

7. การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกโดยวิธีของ Bentley (Bentley, 1957)

นำน้ำหมักที่ได้ทำการกรองแยกสายใย *Aspergillus oryzae* K-13 ออกแล้วมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร

1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (ภาคผนวก ข1) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณกรดโคจิกโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค1)

8. การวิเคราะห์กรดโคจิกที่สร้างโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ด้วยวิธี HPLC

นำน้ำหมักที่ได้จากการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในช่วงเวลาต่างๆกัน มาตรวจสอบกรดโคจิกด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (Shimadzu LC-3A) โดยใช้คอลัมน์ Zorbox C-8 (L-3555) ขนาดความยาว 25 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร โดยใช้กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 20 มิลลิโมลลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.5 เป็นตัวพา ปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และคอลัมน์ Spherisorb C-18 (S50DS2) ซึ่งใช้กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 20 มิลลิโมลลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.5 เป็นตัวพา โดยปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจสอบโดย UV Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกรดโคจิกมาตรฐาน และมีกรดกลูโคนิกเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard)

9. การวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature) ของกรดโคจิกที่สร้างโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13

นำน้ำหมักที่ได้จากการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ซึ่งทำการกรองแยกสายใยออกแล้วมาทำให้เข้มข้น โดยนำไประเหยน้ำออกในอ่างน้ำเดือด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น หลังจากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 - 1 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเกิดการตกผลึกของกรดโคจิกอย่างสมบูรณ์ นำผลึกกรดโคจิกที่ได้ไปล้างด้วยน้ำเย็น แล้วทำการตกผลึกอีกจนกระทั่งได้ผลึกกรดสีขาว หลังจากนั้นนำ

ผลึกกรดโคจิกที่ผลิตได้จาก *Aspergillus oryzae* K-13 และกรดโคจิกมาตรฐานไปหาอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) โดยเครื่อง Differential Scanning Colorimetry (DSC) model DSC-200 ในช่วงอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ถึงอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส โดยให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นนาทีละ 10 องศาเซลเซียส

10. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

10.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยการทำปฏิกิริยาของฟีนอลและกรดกำมะถัน (Hansen และ Phillips, 1981)

นำน้ำหมักที่กรองแยกสายใยราออกแล้วมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายที่ได้มา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เขย่าแรงๆ ตั้งทิ้งต่อไปอีกประมาณ 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค2)

10.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Bernfeld (Bernfeld, 1955)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA) (ภาคผนวก ข3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในน้ำหมักที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดแก้ว เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค3)

10.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆโดยใช้วิธี HPLC

นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรา *Aspergillus oryzae* K-13 มาตรวจสอบโดยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (Shimadzu

T 20515649

LC-3A) โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb 10NH-2 (Phenomenax) โดยใช้อะซีโตไนไตรล์ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข4) เป็นตัวพา และปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจสอบโดย refractive index detector (RID) โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโตสมาตรฐาน

11. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

11.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Kjeldahl (Bremner, 1970)

นำน้ำหมักที่กรองแยกสายใยราออกแล้วมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายที่เจือจางแล้วมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน kjeldhal flask เติมสารเร่งปฏิกิริยา (ภาคผนวก ข5) ปริมาณ 1.1 กรัม หลังจากนั้นเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปย่อยด้วยความร้อนเป็นเวลา 60 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น หลังจากนั้นค่อยๆเติมน้ำปลอดประจุลงไปในขวดกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตรผสมให้สารละลายเข้ากัน หลังจากนั้นเติมน้ำลงไปอีกจนได้ปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นค่อยๆเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล (ภาคผนวก ข6) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำไปกลั่นด้วยชุดกลั่น Kjeldahl (รูปที่ 8) โดยใช้ขวดทดลองปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสารละลายอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข7) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเป็นภาชนะรองรับของเหลวที่กลั่นได้ กลั่นจนได้ของเหลวปริมาตรประมาณ 30 มิลลิลิตร แล้วนำของเหลวที่กลั่นได้ไปไตเตรตด้วยกรดซัลฟุริกเข้มข้น 0.01 นอร์มอล (ภาคผนวก ข8) โดยที่จุดยุติสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของกรดที่ใช้ไปเพื่อนำคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (1มิลลิลิตรของกรดซัลฟุริกเข้มข้น 0.01 นอร์มอล = ไนโตรเจน 0.14 มิลลิกรัม)

รูปที่ 8 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl

11.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Rapid - Combustion Gas Chromatography

นำสารสกัดจากยีสต์ที่ใช้ในการทดลองปริมาณ 5 - 10 มิลลิกรัมไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยเครื่องมือ CHNS/O Analyser (Perkin Elmer PE 2400 Series II : option CHN) โดยใช้ออกซิเจนสันดาปสารสกัดยีสต์ภายใต้ความร้อนสูงแล้วผ่านเข้าคอลัมน์ CHNS/O ซึ่งมีก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพา แล้วตรวจวัดปริมาณไนโตรเจนด้วยเครื่อง Thermal Conductivity Detector

12. การหาสูตรอาหารเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ต่างๆเพื่อผลิต กรดโคจิก

เพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในขวดเขย่าโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมโดยวิธีการข้อ 3.2 โดยแปรผันสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร ได้แก่ Modified Czapex-dox I Modified Czapex-dox II Yeast extract sucrose (YES)

Modified YES I Modified YES II (ภาคผนวก ก3 - ก7) บ่มเชื้อที่ภาวะตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 ที่อุณหภูมิห้อง วัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และการใช้น้ำตาลเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ต่างๆเพื่อการผลิตกรดโคจิก

13.การหาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

13.1 การหาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิก

ผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่า โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมจากการทดลองข้อ 12 คือ Modified YES II ใช้หัวเชื้อที่เตรียมได้โดยวิธีการ ข้อ 3.2 แล้วแปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลไซโลส โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเป็น 50 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มเชื้อที่ภาวะตามวิธีการทดลองข้อ 4 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน ทำการตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และปริมาณน้ำตาลทุกวันระหว่างการผลิต เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน

13.2 การทดลองใช้น้ำตาลทรายขาวแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

ผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมคือ Modified YES II ที่มีชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 12 และ 13.1 คือน้ำตาลซูโครสปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับน้ำตาลทรายขาวปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่ภาวะตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมโดยวิธีการทดลองข้อ 3.2 ตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และ

ปริมาณน้ำตาลทุกวัน เป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทรายขาว

13.3 การหาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิก

13.3.1 การหาปริมาณที่เหมาะสมของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตกรดโคจิก

ผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมได้จากการทดลองข้อ 3.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified YES II ที่มีชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ที่ได้จากการทดลองข้อ 13.2 คือน้ำตาลทรายขาวปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 5.0 และ 10 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05 0.1 0.15 0.20 0.25 0.50 และ 1.0 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 11.1 และ 11.2 ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C : N) เท่ากับ 840:1 840:2 840:3 840:4 840:5 840:10 และ 840:20 ตามลำดับ บ่มเชื้อที่ภาวะตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน วัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และปริมาณน้ำตาลทุกวันตลอดการทดลอง เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ปริมาณต่างกัน

13.3.2 การหาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เสริมต่อการผลิตกรดโคจิก

ผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่า โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีการดำเนินการทดลองข้อ 3.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรายขาวปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนจาก

สารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปริมาณนี้คิดเป็นครึ่งหนึ่งของปริมาณไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดจากการทดลองข้อ 13.3.1 คือสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นทำการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์แทนสารสกัดจากยีสต์เพื่อลดต้นทุนการผลิตลง โดยทำการแปรผันชนิดของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน 2 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต นอกจากนี้ยังแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ด้วย โดยแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.24 0.47 และ 0.71 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อและแปรผันปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตเป็น 0.14 0.28 และ 0.43 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรตเท่ากับ 0.05 0.10 และ 0.15 กรัมตามลำดับ เมื่อรวมกับปริมาณสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตรจะคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.10 0.15 และ 0.20 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามลำดับโดยมีชุดควบคุมคืออาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวโดยไม่มีการเสริมแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และเมื่อคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน ต่อไนโตรเจน (C : N) ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะได้อัตราส่วนเป็น 840: 1 840 : 2 840 : 3 และ 840 : 4 ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 5 วัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และการใช้น้ำตาลทุกวันตลอดการทดลองเป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่างกันรวมทั้งเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนใน อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกแตกต่างกัน

ตารางที่ 5 แสดงการแปรผันปริมาณไนโตรเจนอนินทรีย์เสริมและอัตราส่วนระหว่างปริมาณ คาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เสริม	ปริมาณ (กรัม)	ปริมาณไนโตรเจนในแหล่งไนโตรเจนเสริม (กรัม)	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)*	อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน
$(NH_4)_2SO_4$	0	0	0.05	840 : 1
	0.24	0.05	0.10	840 : 2
	0.47	0.10	0.15	840 : 3
	0.71	0.15	0.20	840 : 4
NH_4NO_3	0	0	0.05	840 : 1
	0.14	0.05	0.10	840 : 2
	0.28	0.10	0.15	840 : 3
	0.43	0.15	0.20	840 : 4

หมายเหตุ $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัม มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.21 กรัม

NH_4NO_3 1 กรัม มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.35 กรัม

* คือปริมาณรวมของไนโตรเจนจากสารสกัดยีสต์และจากแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เสริม

13.3.3 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารสกัดจากยีสต์ต่อแหล่งไนโตรเจนบริสุทธิ์สำหรับการผลิตกรดโคจิก

ผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าโดยใช้หัวเชื้อ *Aspergillus oryzae* K-13 ที่เตรียมจากวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 13.3.2 คืออาหารที่มีน้ำตาลทรายขาวปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งอินทรีย์

ไนโตรเจนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนแล้วทำการแปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณสารสกัดจากยีสต์ต่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.25 : 0.36 0.5 : 0.24 และ 0.75 : 0.12 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยทุกอัตราส่วนนี้จะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากัน คือมีปริมาณเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังตารางที่ 6 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 13.3.2 โดยคิดเป็นปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 840 : 2 บ่มเชื้อที่ภาวะตามวิธีการทดลองข้อ 4 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน วัดปริมาณกรดการเติบโตและการใช้น้ำตาลทุกวันตลอดการทดลองเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนต่อแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนแตกต่างกัน

ตารางที่ 6 อัตราส่วนระหว่างปริมาณสารสกัดจากยีสต์ต่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิก

สารสกัดจากยีสต์		แอมโมเนียมซัลเฟต		ปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดจากยีสต์ต่อไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต	คิดเป็นปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)
ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)		
0.25	0.025	0.36	0.075	0.025 : 0.075	0.1
0.5	0.05	0.24	0.05	0.05 : 0.05	0.1
0.75	0.075	0.12	0.025	0.075 : 0.025	0.1

14. การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* K-13 เพื่อการผลิตกรดโคจิก

14.1 การหาค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

เพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในขวดเขย่าที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) ใช้หัวเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3.2 แล้วทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกเป็น 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.5 โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เพาะเลี้ยงเชื้อที่ภาวะตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และการใช้น้ำตาลทุกวัน เป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกัน

14.2 การทดลองใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

ผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสม (ภาคผนวก ก8) ที่ได้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5 ซึ่งเป็นค่าที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด (จากการทดลองข้อ 14.1) แล้วแปรผันชนิดของน้ำที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นน้ำประปา และน้ำปลอดประจุ บ่มเชื้อที่ภาวะตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และปริมาณน้ำตาลทุกวันเป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกที่ได้จากการใช้น้ำประปา และน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

14.3 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

เพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในขวดเขย่า โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลทรายขาวปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน และมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 ใช้หัวเชื้อที่เตรียมได้จากการดำเนินการทดลองข้อ 3.2 ทำการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 30 32 33 34 และอุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) ตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และการใช้น้ำตาลทุกวัน เป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

15. การเตรียมกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดโคจิก

15.1 การหาการเติบโตของ *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกในช่วงเวลาต่างๆกัน

เพาะเลี้ยงหัวเชื้อสปอร์งอกตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3.2 ทำการตรวจวัดการเติบโตของรา *Aspergillus oryzae* K-13 ทุก 3 ชั่วโมง จนการเติบโตคงที่หรือลดลง

15.2 การหาอายุที่เหมาะสมของหัวเชื้อสปอร์งอก

ผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่า โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) ซึ่งปรับค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.5 ใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์แขวนลอยและสปอร์งอกซึ่งเตรียมโดยวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3.1 และ 3.2 ทำการแปรผันอายุของหัวเชื้อเป็นสปอร์แขวนลอยและสปอร์งอกอายุต่างๆ ได้แก่ 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการเติบโตของ *Aspergillus oryzae* K-13 ในช่วงต่างๆ ได้แก่ late lag phase mid log phase late log phase และ stationary phase ตามลำดับ (จากการทดลองข้อ 15.1) เพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ภาวะตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 ตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และ

การใช้น้ำตาลทุกวันตลอดการทดลอง 20 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อแปรผันหัวเชื้อสปอร์งอกอายุต่างๆกัน

15.3 การหาความหนาแน่นที่เหมาะสมของหัวเชื้อสปอร์งอกในการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13

ผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าโดยถ่ายหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกดีที่สุด (จากการทดลองข้อ 15.2) ความหนาแน่นเท่ากับ 2-4 x 10^5 2-4 x 10^6 2-4 x 10^7 และ 2-4 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) ปริมาตร 120 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทดลองปริมาตร 500 มิลลิลิตร ซึ่งทำให้ได้ความหนาแน่นของสปอร์งอกเท่ากับ 4 - 8 x 10^5 4 - 8 x 10^6 4 - 8 x 10^7 4 - 8 x 10^8 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้ภาวะการเพาะเลี้ยงตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 ทำการตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และการใช้น้ำตาลทุกวันเป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อแปรผันความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน

15.4 การใช้น้ำประปาเตรียมหัวเชื้อแทนน้ำปลอดประจุ

ผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าโดยถ่ายหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกดีที่สุด (จากการทดลองข้อ 15.2) ที่เตรียมโดยแปรผันชนิดของแหล่งน้ำที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอก 2 ชนิดคือน้ำปลอดประจุ และน้ำประปา เพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ภาวะตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 ตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และการใช้น้ำตาลทุกวันตลอดการทดลอง 20 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อแปรผันชนิดของแหล่งน้ำที่ใช้เตรียมหัวเชื้อสปอร์งอก

16. การผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในขวดเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) ปริมาตร 120 มิลลิลิตร ในขวดขนาด 500 มิลลิลิตร ใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมงที่ความหนาแน่น 4 - 8 x 10^7 สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปริมาณ 2.4 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการใช้น้ำตาลทุกวันตลอดการทดลอง 20 วัน วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตกรดโคจิกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก