บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1.เคมีภัณฑ์

1.1เคมีภัณฑ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

น้ำตาลทรายขาว ของบริษัทมิตรผล , ประเทศไทย

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

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

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

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd., England

1.2 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และน้ำตาลชนิดอื่นๆ ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Pressure liquid chromatography ; HPLC)

อะซีโตไนไตร (CH_3CN) ของบริษัท Scharlau, Spain

น้ำตาลฟรักโตส (fructose) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลกลูโคส (glucose) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลราฟฟิโนส (raffinose) ของบริษัท Difco laboratories, U.S.A.

ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดเคสโตส (kestose) ของบริษัท TCI , Japan

ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดนีสโตส (nystose) ของบริษัท TCI , Japan

1.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์ไนโตรเจน

โพแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Riedel – deHaen , Germany

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

เอทธิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด ไดโซเดียมซอลต์ (EDTA disodium) ของบริษัท Sigma Chemical Co. , U.S.A.

โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ ($Na_2Fe(CN)_5No * 2H_2O$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

ฟีนอล ของบริษัท Riedel – deHaen . Germany

โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) ของบริษัท Clorox Ltd. , U.S.A.

1.4 **เคมีภัณฑ์อื่น ๆ**

โซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) * $7H_2O$ ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

กรดซิตริก ของบริษัท Riedel – deHaen , Germany

ทวีน 80 ของบริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd., England

2. เครื่องมือสำคัญที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.,Inc., U.S.A.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, U.S.A.

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberbean 2000 ของบริษัท Beckman, U.S.A.

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

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

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co.Ltd., Japan

อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิลิตร ของบริษัท Boeco , Germany

ถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น MD 500 ของบริษัท L. E. Marubishi Co. Ltd., Japan

ชุดควบคุมสภาวะในถังหมัก รุ่น EC 2000 ของบริษัท Eyela , Japan

เครื่องวัดปริมาณอากาศ (Rotameter) ของบริษัท Kofloc รุ่น RK 1400 , Japan

เครื่องให้อากาศ (air pump) puma รุ่น PP-1 ของบริษัทโชติวัฒน์เครื่องอัดลม จำกัด

เครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Pressure Liquid Chromatography ; HPLC) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan และเครื่องตรวจวัดแบบวัดค่าดรรชนีหักเหของแสง (Refractive Index Detecter ; RI detecter) รุ่น refracto monitor ของบริษัท LDC analytical

วิธีดำเนินการทดลอง

1.จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้เพื่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Fructooligosaccharides ; FOS) ในงานวิจัย คือ *Penicillium* sp. H12 ที่คัดแยกได้จากดินในประเทศไทย (เสาวนีย์ ศิริรูป, 2539)

2.การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยง *Penicillium* sp.H12 บนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โปเตโตเด็กซ์โตรสเอการ์ (potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก 1) บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5-7 วัน จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมหัวเชื้อ

3.1 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์แขวนลอย

เพาะเลี้ยง *Penicillium* sp.H12 บนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรสเอการ์ (ภาคผนวก ก 1) บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (อุณหภูมิ 30 ±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้ได้สปอร์จำนวนมาก เติมน้ำปลอดประจุผสมทวีน 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ เขี่ยสปอร์ให้หลุดกระจายในน้ำ นับจำนวนสปอร์โดยใช้อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้ได้ ~2×10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตรหรือตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง ใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป

3.2 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอก

ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่ปรับจำนวนสปอร์ให้ได้ ~10×10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นถ่ายสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอก (ภาคผนวก ก2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งทำให้มีความหนาแน่นของสปอร์งอกเท่ากับ ~2 × 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วใช้เป็นหัวเชื้อสปอร์งอกต่อไป

4. การผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์งอกหรือสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองข้อ 3.1 หรือ 3.2 ตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต FOS (ภาคผนวก ก 3) หรือสูตรอื่นๆตามที่ระบุในการทดลอง มาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยแปรผันปัจจัยต่างๆ ตามสภาวะที่ระบุในแต่ละการทดลอง

5. การผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยการเพาะเลี้ยงในถังหมัก

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองข้อ 3.1 ขนาด 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงในถังหมัก ขนาด 5 ลิตรซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อผลิต FOS (ภาคผนวก ก 4) จัดปริมาณออกซิเจนละลาย (dissolve oxygen) เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัวตลอดการเพาะเลี้ยงหรือแปรผันตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง อุณหภูมิที่ 30 ±2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

6. การเก็บเกี่ยวฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

กรองแยกสายใยของ *Penicillium* sp.H12 จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ด้วยกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้จากการกรองไปตรวจหาปริมาณ FOS และ น้ำตาลชนิดอื่นๆในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีการทดลองข้อ 8 ส่วนสายใยที่กรองได้นำไปวัดการเติบโตตามวิธีการทดลองข้อ 7

7. การหาการเติบโตของ *Penicillium* sp. H12

นำสายใยที่กรองและผ่านการล้างด้วยน้ำปลอดประจุอย่างน้อย 2 ครั้ง อบในตู้อบแห้งอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักแห้งที่ชั่งได้ทั้งหมดลบด้วยค่าน้ำหนักแห้งของกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 ที่ปราศจากสายใยของรา ซึ่งผลต่างที่ได้ คือ น้ำหนักแห้งของ *Penicillium* sp. H12 ซึ่งใช้แสดงการเติบโตของรา

8. การวิเคราะห์ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และน้ำตาลชนิดอื่นๆ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

นำน้ำหมักที่ได้จากการเก็บเกี่ยวตามวิธีการทดลอง ข้อ 6 ที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม มาตรวจสอบด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น

LC-3A โดยใช้คอลัมน์ Zorbax-NH4 ที่มีขนาดความยาว 25 เซนติเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร และใช้อะซิโตไนไตร 78 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร (ภาคผนวก ข 1) เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลที่ได้ด้วยเครื่องตรวจวัดแบบวัดค่าดรรชนีหักเหของแสง (refractive index detecter) โดยมี FOS ชนิดเคสโตส และ FOSชนิดนีสโตส เป็นสารมาตรฐานและน้ำตาลราฟฟิโนสเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) คำนวนหาปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดอื่น ตามวิธีในภาคผนวก ง 1 โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ค 1 – ค 5

<u>หมายเหตุ</u> การวิเคราะห์ FOS และน้ำตาลชนิดต่างๆ ใช้บริการจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

9.1 การวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจน โดยวิธีของ Steyermark (1951)

นำน้ำหมักที่แยกสายใยออกแล้ว ซึ่งเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมสารช่วยเร่งปฏิกริยา (ประกอบด้วยโพแตสเซียมซัลเฟต 6.65 กรัม และ คอปเปอร์ซัลเฟต 0.35 กรัม) 7 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุม (Digester) จนได้สารละลายสีเขียวใส รอทิ้งไว้ให้เย็นค่อยๆ เติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 50 มิลลิลิตร และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (ภาคผนวก ข 4) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการกลั่นจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้นด้วย 100 มิลลิลิตรของกรดบอริก เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (ภาคผนวก ข 5) ที่มีตัวบ่งชี้ผสม (ภาคผนวก ข 6) ผสมอยู่จำนวน 3 หยด กลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น 250 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาไตเตรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว โดยมีจุดยุติที่สารละลายสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานที่ไตเตรตได้เพื่อนำมาคำนวนหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน (ภาคผนวก ง 2)

9.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟตโดยวิธีของ Kempers (1974)

นำน้ำหมักที่ได้จากวิธีการทดลอง ข้อ 6 มาทำให้เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม เติมน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ (ภาคผนวก ข 7) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EDTA (ภาคผนวก ข 8) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพรัสไซดีรีเอเจนท์ (ภาคผนวก ข 9) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรทีรีเอเจนท์ (ภาคผนวก ข 10) ปริมาตร 4

มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 636 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 636 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค 6) จากนั้นนำมาคำนวนหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวก ง 3)

10. เปรียบเทียบผลผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เมื่อผลิตในขวดเขย่าและในขวดที่ไม่มีการเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์แขวนลอย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลอง ข้อ 3.1 ปริมาณ ~2 × 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับการผลิต FOS (ภาคผนวก ก 3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ปรับค่าพีเอชตั้งต้นเท่ากับ 7.0 ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ ใช้ภาวะต่างๆตามวิธีการทดลองข้อ 4 คือ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง วัดปริมาณน้ำตาล การเติบโต ทุก 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบปริมาณ FOS และการเติบโตกับเมื่อเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ในอาหารเหลวที่ไม่มีการเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะอื่นๆเหมือนกัน

11. ศึกษาผลของปัจจัยบางประการที่มีต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในขวดเขย่า

11.1 หาผลของระยะเวลาในการงอกของสปอร์และการเติบโตของ *Penicillium* sp.H12

11.1.1 หาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้สปอร์งอกมากที่สุด

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองข้อ 3.1 ปริมาณ ~10 × 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก 2) ที่ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 เพาะเลี้ยงสปอร์โดยใช้ภาวะต่างๆตามวิธีการทดลองข้อ 4 (ซึ่งทำให้ได้ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ ~2 × 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรสำหรับเตรียมหัวเชื้อ) เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจเปอร์เซ็นต์การงอกทุกๆ 3 ชั่วโมง จนสปอร์งอกได้สูงสุด โดยใช้อุปกรณ์ตรวจนับเม็ดเลือด (Haemacytometer)

11.1.2 การหาการเติบโตของ *Penicillium* sp.H12 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ที่ได้จากวิธีการเตรียมในข้อ 3.1 ปริมาณ ~2 × 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอก (ภาคผนวก ก 2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ปรับค่าพีเอชตั้งต้นเท่ากับ 7.0 เพาะเลี้ยงโดยใช้ภาวะต่างๆตามวิธีดำเนินการข้อ 4 ตรวจการเติบโตโดยชั่งน้ำหนักแห้งของสายใยทุกๆ 6 ชั่วโมงจนกระทั่งการเติบโตคงที่หรือลดลง

11.2 หาผลของชนิดและปริมาณของหัวเชื้อที่มีต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ผลิต FOS ในขวดเขย่า โดยถ่ายหัวเชื้อสปอร์แขวนลอยหรือหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 12 ชั่วโมง ที่ได้จากการเตรียมหัวเชื้อสปอร์ตามวิธีการ ข้อ 3.1 หรือ 3.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต FOS (ภาคผนวก ก 3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใช้ภาวะต่างๆตามวิธีการข้อ 4 โดยแปรผันปริมาณของหัวเชื้อเท่ากับ $\sim 2 \times 10^6$ $\sim 2 \times 10^7$ $\sim 2 \times 10^8$ และ $\sim 2 \times 10^9$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เปรียบเทียบปริมาณฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เมื่อใช้ชนิดและปริมาณหัวเชื้อต่างๆ กัน

11.3 หาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ผลิต FOS ในขวดเขย่า โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวก ก3) ซึ่งมีน้ำตาลทรายขาวและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งวิตามิน ปัจจัยเสริมการเติบโตและแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน โดยใช้ชนิดและปริมาณของหัวเชื้อซึ่งได้จากการทดลองข้อ 11.2 ซึ่งเตรียมโดยวิธีการทดลองข้อ 3.1 คือหัวเชื้อชนิดสปอร์แขวนลอย ปริมาณ $\sim 2 \times 10^9$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 145 : 0.5 145 :1.0 145 : 1.5 และ 145 : 2.0 ดังแสดงในตารางที่ 6 ใช้ภาวะการเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองข้อ 4 วัดปริมาณ FOS การเติบโต ปริมาณน้ำตาล ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบปริมาณ FOS เมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนต่างๆกัน

ตารางที่ 6 การแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	ปริมาณคาร์บอนในน้ำตาลทราย 100 ก/ล (ก/ล)	ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ก/ล)	ปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดจากยีสต์ (ก/ล)	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ก/ล)	ปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต (ก/ล)	ปริมาณไนโตรเจนรวมในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ก/ล)
145 : 0.5	42.1	1.0	0.105	0.2	0.04	0.145
145 : 1.0	42.1	2.0	0.21	0.4	0.08	0.290
145 : 1.5	42.1	3.05	0.32	0.6	0.12	0.440
145 : 2.0	42.1	4.0	0.42	0.8	0.16	0.580

11.4หาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลทรายขาวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อปริมาณการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ผลิต FOS ในขวดเขย่าโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมโดยวิธีการทดลองข้อ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก 3) ที่มีน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งวิตามิน ปัจจัยเสริมการเติบโตและแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลทรายขาวต่างๆกัน ในช่วง 100 – 300 กรัมต่อลิตร โดยคงค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ 145 : 1.0 ใช้ภาวะการเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองข้อ 4 วัดปริมาณ FOS การเติบโต ปริมาณน้ำตาล ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบผลผลิตเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทรายขาวต่างๆกัน

11.5 หาผลของค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

11.5.1 ผลของค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมโดยวิธีการทดลองข้อ 3.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิต FOS (ภาคผนวก ก 4) ที่บรรจุปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดเลี้ยงเชื้อแล้วทำการแปรผันค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารเป็น 4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.0 โดยปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (ภาคผนวก ข 2) และโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล (ภาคผนวก ข 3) เพาะเลี้ยงตามวิธีดำเนินการทดลอง ข้อ 4 เปรียบเทียบปริมาณ FOS เมื่อค่าพีเอชตั้งต้นต่างๆกัน

11.5.2 ผลของการควบคุมพีเอชค่าต่าง ๆ ตลอดการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในขวดเขย่าที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับการผลิต FOS (ภาคผนวก ก 4) โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมโดยวิธีการทดลอง ข้อ 3.1 ควบคุมค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลองให้เท่ากับ 3.0 , 4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.0 ด้วยซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข 11) เพาะเลี้ยงเชื้อที่ภาวะตามวิธีการทดลอง ข้อ 4 เปรียบเทียบปริมาณ FOS เมื่อผลิตโดยจัดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลองต่างๆกัน

11.6 หาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ถ่ายสปอร์ที่เตรียมโดยวิธีการทดลองข้อ 3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อผลิต FOS (ภาคผนวก ก 4) โดยปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5.0 ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 11.5.2 แปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 25 , 30 , 35 ,40 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบปริมาณ FOS เมื่อใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

12. ศึกษาผลของออกซิเจนละลายและการเพิ่มอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตต่อชนิดและปริมาณฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เมื่อผลิตในถังหมัก

การทดลองในถังหมักนี้เป็นการศึกษาผลของค่าออกซิเจนละลายต่อการผลิต FOS ซึ่งไม่สามารถกระทำได้ในขวดเขย่า มิใช่การขยายส่วนผลิต

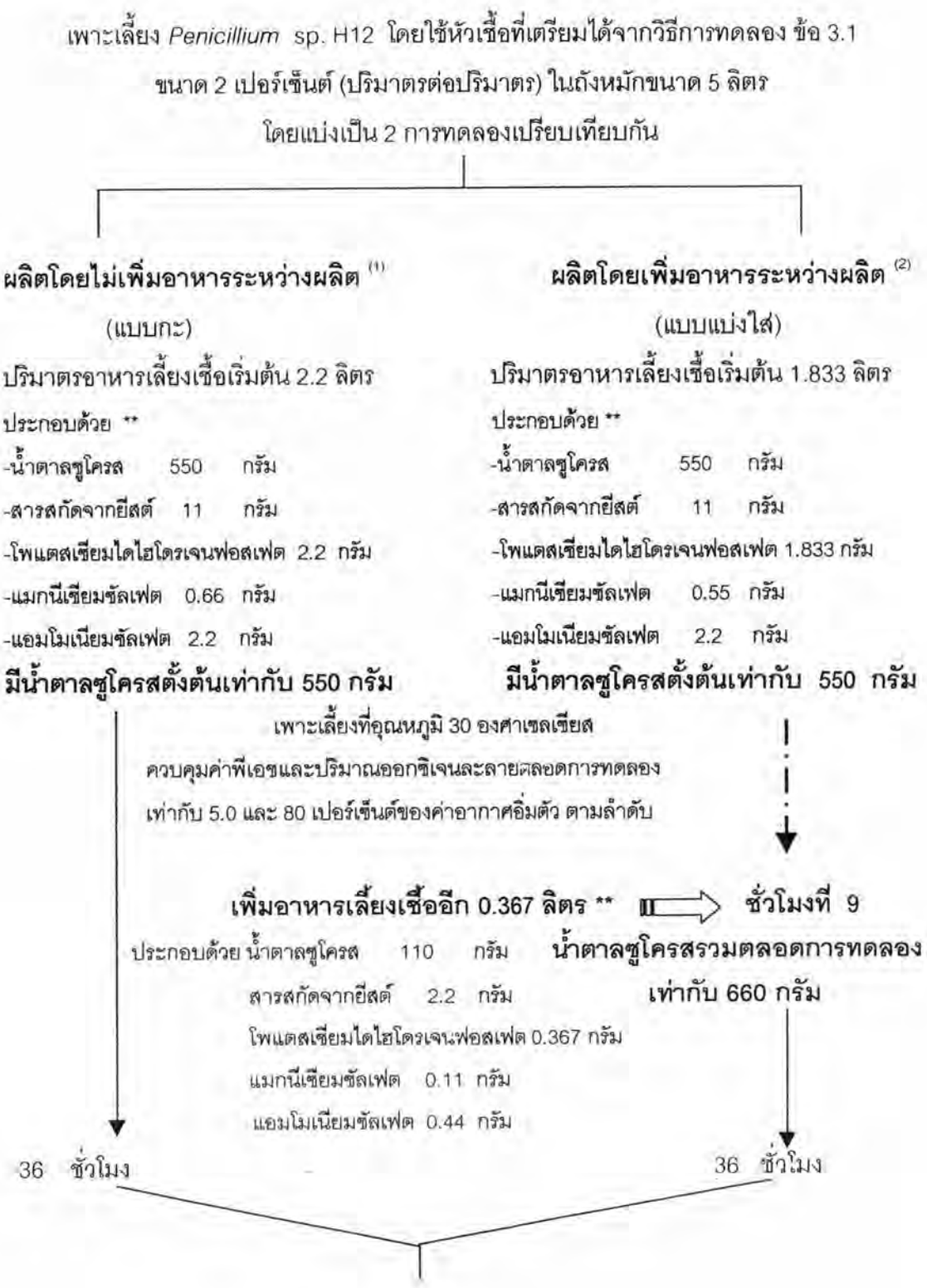
12.1 หาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยง *Penicillium* sp.H12 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับผลิต FOS (ภาคผนวก ก 4) ปริมาตร 2.2 ลิตร ใช้หัวเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีการทดลอง ข้อ 3.1 ขนาด 2 เปอร์เซ็นต์(ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับที่ใช้ในการผลิต FOS ในขวดเขย่า ปรับค่าพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 5.0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วแปรผันค่าออกซิเจนละลาย เป็น 40 , 60 , 80 , 100 เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัว วัดปริมาณ FOS การเติบโต และการใช้น้ำตาล เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เปรียบเทียบปริมาณ FOS เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน

12.2 หาผลของการเพิ่มอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตที่มีต่อปริมาณฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

เนื่องจากได้มีรายงานว่าในการผลิต FOS เมื่อปริมาณน้ำตาลซูโครส(แหล่งคาร์บอน)มากขึ้น จะกระตุ้นให้เอนไซม์ FT ทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสไปเชื่อมกับสารตั้งต้นเพื่อผลิตFOSได้เพิ่มขึ้นมากกว่าหน้าที่ในการสลาย FOS ส่งผลให้ผลิต FOS มากขึ้น (Hidaka และคณะ,1988) แต่จากผลการทดลองข้อ 2.4 พบว่าการเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ (โดยคงค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 145 : 1.0) ทำให้ผลิต FOS เพิ่มมากขึ้น แต่ปริมาณ FOS ที่ผลิตได้ไม่คุ้มค่ากับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไปซึ่งสันนิษฐานว่าการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลทรายตั้งต้นสูงเกินไป ทำให้มีแรงดันออสโมติกสูง จุลินทรีย์จึงเติบโตและดำเนินกิจกรรมตามปกติไม่ได้ ดังนั้นจึงให้ผลผลิตไม่คุ้มค่ากับน้ำตาลที่ใส่เพิ่มลงไป เพราะฉะนั้นจึงมีแนวคิดว่าการค่อยๆเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสในระหว่างผลิต อาจจะสามารถเพิ่มปริมาณ FOS อย่างคุ้มค่ากับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ไป ดังนั้นจึงทำการทดลองผลิต FOS แบบกะซึ่งใส่อาหารครั้งเดียวเมื่อเริ่มผลิต กับการทดลองแบบเพิ่มอาหารระหว่างการผลิต โดยการผลิตทั้งสองแบบใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อรวม 2.2 ลิตรเท่ากัน ซึ่งการผลิตแบบกะใช้อาหารสูตรเหมาะสมสำหรับการผลิตFOS(ภาคผนวก ก4) ซึ่งทำให้มีปริมาณน้ำตาลทรายขาวรวมต่อการผลิต 1 ครั้ง (2.2 ลิตร) เท่ากับ 550 กรัม ส่วนการผลิตแบบเติมอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิต ใช้อาหารสูตรภาคผนวก ก4 ที่เพิ่มปริมาณน้ำตาลทรายขาวให้มีปริมาณเท่ากับ 660 กรัมในอาหารรวม 2.2 ลิตร โดยคงค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 145 : 1.0 แต่เมื่อเริ่มต้นผลิตจะเริ่มต้นที่น้ำตาลทรายตั้งต้นเท่ากัน คือ 550 กรัม โดยแสดงวิธีการทดลองดังแผนผังและแสดงการเปรียบ

เทียบทั้งสองวิธี ดังตารางที่ 7 และเนื่องจากการทดลองนี้ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการผลิตได้ตรวจปริมาณน้ำตาลทุก 3 ชั่วโมง พบว่าในชั่วโมงที่ 9 เหลือน้ำตาลซูโครส 130.27 กรัมต่อลิตร จึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลืออีก 0.367 ลิตร(มีน้ำตาลทรายขาว 110 กรัมหรือ 50 กรัมต่อลิตร) ทำให้ได้น้ำตาลซูโครสรวมขณะเติมเท่ากับ 185.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากการตรวจทุก 3 ชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 9 น่าจะเหมาะสมสำหรับการเติมน้ำตาลซูโครส เนื่องจากมีปริมาณใกล้ 250 กรัมต่อลิตรมากที่สุด ซึ่งเป็นปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิต FOS ที่ได้จากผลการทดลองข้อ 2.7



※ ตรวจวัดปริมาณFOS การเติบโต การใช้น้ำตาล ※

หมายเหตุ (1) มีปริมาณน้ำตาลทรายขาวในอาหารเลี้ยงเชื้อ 250 กรัมต่อลิตร

(2) มีปริมาณน้ำตาลทรายขาวในอาหารเลี้ยงเชื้อ 300 กรัมต่อลิตร

** มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 145 : 1.0

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการผลิต FOS โดยการเพิ่มและไม่เพิ่มอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิต

รายการเปรียบเทียบ	ไม่เพิ่มอาหาร(แบบกะ)	เพิ่มอาะาร(แบบแบ่งใส่)	
ปริมาตรอาหารเมื่อเริ่มต้นผลิต (ลิตร)	2.2	1.833	
ปริมาณน้ำตาลซูโครสดั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัม)	550	550	
ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต (ลิตร)	0	0.367	
ปริมาณน้ำตาลซูโครส ณ.ชั่วโมงที่ 9		(ก่อน)	(หลัง)
(กรัมต่อลิตร)	135.4	130.27	185.1
ปริมาตรอาหารรวมต่อการผลิต 1 ครั้ง (ลิตร)	2.2	2.2	
น้ำตาลซูโครสรวมต่อการผลิต 1 ครั้ง (กรัม)	550	660	

หมายเหตุ (ก่อน) หมายถึง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ

(หลัง) หมายถึง หลังเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ