บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1. เคมีภัณฑ์

ดี (+) กลูโคสโมโนไฮเดรต (D(+) glucosemonohydrate) ของบริษัท E.Merck Darmstadt , Germany

กรดไฮโดรคลอลิก (HCl) ของบริษัท E.Merck Darmstadt , Germany

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E.Merck Darmstadt , Germany

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E.Merck Darmstadt , Germany

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

พีจีโอ เอนไซม์ (PGO enzyme) ของบริษัท Sigma Diagnostics , USA

เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd., England

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.H_2O$) ของบริษัท E.Merck Darmstadt , Germany

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) ของบริษัท E.Merck Darmstadt , Germany

ไดอะนีซิดีนไดไฮโดรเจนคลอไรด์ (o-dianisidine dihydrochloride) ของบริษัท Sigma Diagnostics , USA

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

แอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี (amberlite IR 120 P) ของบริษัท Sigma Diagnostics , USA

พอลิยูรีเทนโฟม (polyurethane foam) ของบริษัท บางกอกโฟม จำกัด ประเทศไทย

บรอมไธมอลบลู (bromthymol blue) ของบริษัท Fluka AG Buch, Switzerland

ฟีนอฟทาลีน (phenopthalene) ของบริษัท Fluka AG Buch, Switzerland

2. **อุปกรณ์**

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

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

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

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) รุ่น 0-270 ของบริษัท Memmert GmbH, Germany

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation. Japan

คอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Shinishi Kinoshita, Hokkaido University, Japan

เครื่องวัดปริมาณอากาศ (rotameter) KOFLOC รุ่น RK-1050, Japan

เครื่องให้อากาศ (air compressor) รุ่น PUMA PP-1 ของบริษัทธีรวัฒน์ เครื่องอัดลม ประเทศไทย

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

กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) รุ่น JSM-35CF ของบริษัท JEOL, Japan

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

เครื่องควบคุม (controller) รุ่น REC 2 ของบริษัท B. Braun Biotech Internation, Switzerland

อุปกรณ์วัดความเป็นกรด-ด่าง (pH probe) รุ่น 405-DPAS-SC-K8S/325 ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland

อุปกรณ์วัดการเกิดฟอง (antifoam probe) ของบริษัท B. Braun Biotech Internation, Switzerland

เครื่องวิเคราะห์จุดหลอมเหลว (Differential Termal Analysis, DTA) รุ่น DTA-409 ของบริษัท Netzsch

วิธีดำเนินการทดลอง

1. **จุลินทรีย์**

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *Aspergillus niger* G153 ที่คัดเลือกจากดินหลายแห่งในประเทศไทย (กรรณิกา จันทรสอาด , 2530) จุลินทรีย์ชนิดนี้ผลิตกรดอินทรีย์ชนิดกรดกลูโคนิกเพียงชนิดเดียว

2. **การเก็บรักษาจุลินทรีย์**

เขี่ยสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* G153 โดยใช้เข็มเขี่ยลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส (potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก1) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 - 33 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 - 7 วัน เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์เต็มที่จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. **การเตรียมสปอร์แขวนลอย**

ถ่ายสปอร์ของ *Aspergillus niger* G153 ลงบนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส (ภาคผนวก ก1) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 - 7 วัน เติมน้ำกลั่นผสมทวีน 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอยและผสมให้เข้ากัน เพื่อใช้เป็นสปอร์แขวนลอยในการทดลองต่อไป

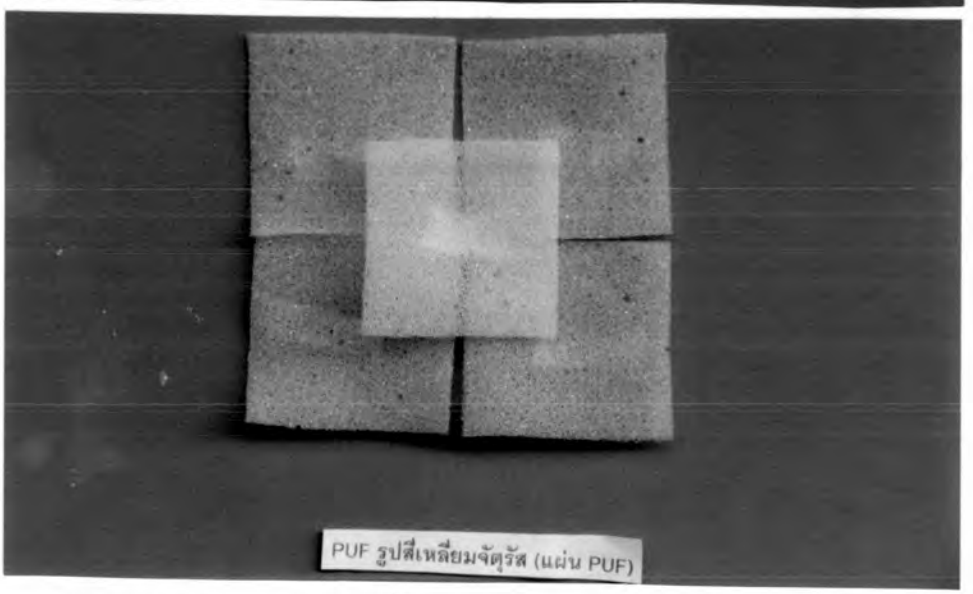
4. **การเตรียมวัสดุตรึง**

วัสดุตรึงที่ใช้ในการทดลองคือ พอลิยูรีเทนโฟม (PUF) ชนิดโครงสร้างเปิด (opened shape) ความหนาแน่นสูงซึ่งได้ทำการทดลองมาแล้วโดย นิติพงษ์ จิระวรานันท์ ในปี พ.ศ. 2539 พบว่าเป็นวัสดุตรึงที่เหมาะสม ต่อการตรึง *Aspergillus niger* G153 วัสดุที่ใช้ในการตรึงมี 2 ลักษณะ คือ

1. ชิ้น PUF รูปทรงลูกบาศก์ขนาด 0.20 เซนติเมตร^3 ซึ่งเตรียมโดยตัดจากแผ่น PUF ดังแสดงในรูปที่ 2 ก.

2. แผ่น PUF รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 4.4 เซนติเมตร^2 หนา 0.20 เซนติเมตร ซึ่งเตรียมโดยตัดจากแผ่น PUF ดังแสดงในรูปที่ 2 ข.

ทำการล้างเพื่อทำความสะอาดชิ้นและแผ่น PUF จากนั้นจึงอบจนแห้งสนิทเก็บไว้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 2 ก. PUF รูปทรงลูกบาศก์ขนาดชิ้นเท่ากับ 0.20 เซนติเมตร^3

ข. PUF รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดแผ่นเท่ากับ 4.4 เซนติเมตร

5. การเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึง

5.1 การเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงในชิ้น PUF (นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539)

เตรียมสปอร์แขวนลอยตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3 ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ 1.0-2.5 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรหรือแปรผันตามที่ระบุในแต่ละการทดลองโดยนับจำนวนด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ่ายสปอร์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก 2) ซึ่งศึกษาโดย นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539 โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร และมีชิ้น PUF รูปลูกบาศก์ขนาด 0.20 เซนติเมตร^3 น้ำหนัก 1 กรัมบรรจุอยู่ หรือแปรผันตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง เพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงให้เป็นสายใยตรึงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมงนำชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึงเติบโตอยู่มาใช้ในการทดลองต่อไป

5.2 การเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงในแผ่น PUF

เตรียมสปอร์แขวนลอยตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3 ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ 1-2.5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หรือแปรผันตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง แล้วถ่ายสปอร์แขวนลอยข้างต้นปริมาณ 0.50 มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนสปอร์ 5.0-12.5×10^6 สปอร์ต่อ 1 แผ่น PUF หรือแปรผันตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) ซึ่งศึกษาโดยนิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539 ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 17.5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร และมีแผ่น PUF ขนาด 4.4 x 4.4 เซนติเมตรน้ำหนักแห้ง 0.05 กรัม จำนวน 1 แผ่น บรรจุอยู่ เพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงให้เป็นสายใยตรึงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง หรือแปรผันตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง นำชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึงเติบโตอยู่มาใช้ในการทดลองต่อไป

6. การผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่าโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในแผ่นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส PUF ขนาด 4.4 เซนติเมตร^2

ถ่ายแผ่น PUF ที่มีสายใยตรึง ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 5.2 จำนวน 1 แผ่น ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่า (ภาคผนวก ก3) ซึ่งดัดแปลงจาก จินตนา ไกรวัฒนพงศ์ (2536) โดยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของบรอมไธมอลบลูเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานเป็นเวลา 10 วัน หรือจนได้ปริมาณกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตสูงสุดหรือจนปริมาณน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด ปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิต ให้อยู่ระหว่าง 5.5-6.5 ตลอดการทดลองด้วย 1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์

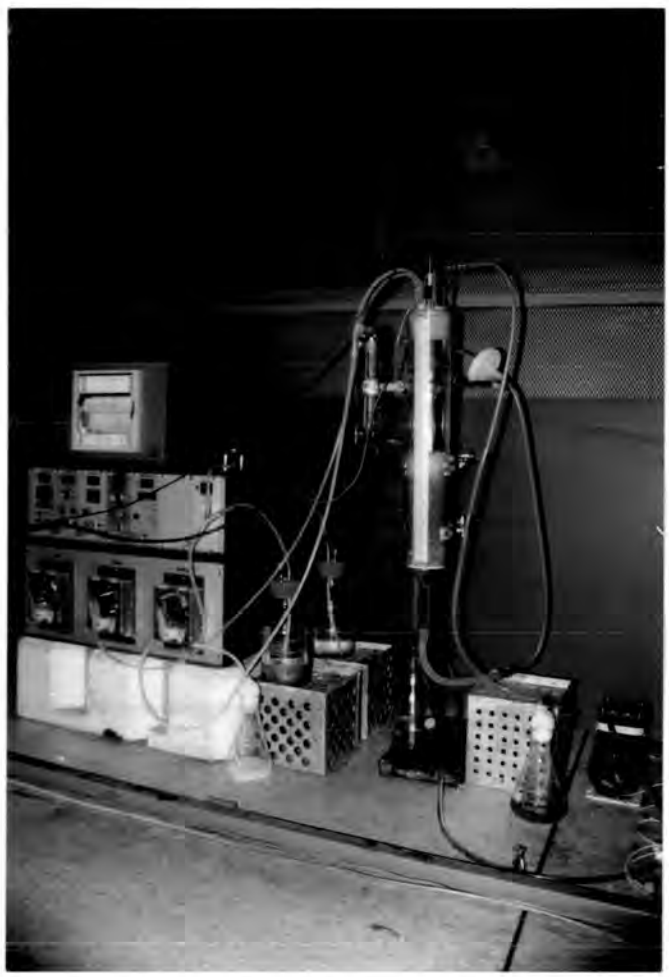
ในการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่าโดยสายใยตรึง *Aspergillus niger* G153 ในแผ่น PUF นั้น เป็นส่วนหนึ่งของการหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงในแผ่น PUF แต่การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในชิ้น PUF นั้นผลิตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างเลยโดยไม่มีการทดลองในระดับขวดเขย่าในงานวิจัยนี้ เนื่องจากการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในชิ้น PUF ได้เคยมีการศึกษาหาภาวะเหมาะสมบางประการในการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงมาแล้ว โดยนิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539

7. การผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) **โดยสายใยตรึงของ** *Aspergillus niger* **G153 ในชิ้นและแผ่น PUF**

7.1 การเตรียมคอลัมน์แก้ว

ยึดคอลัมน์แก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร สูง 40 เซนติเมตร ปริมาตรใช้งาน 400 มิลลิลิตร กับขาตั้งเหล็กโดยให้คอลัมน์ทำมุม 90 องศากับแนวราบด้านล่างของคอลัมน์แก้วมีแผ่นกระจายอากาศซินเตอร์กลาส (sintered glass) ซึ่งทำหน้าที่รองรับสายใยตรึงที่บรรจุในคอลัมน์แก้วพร้อมทั้งเป็นตัวกระจายอากาศเข้าสู่คอลัมน์แก้วปลายล่างสุดของคอลัมน์แก้วต่อเข้ากับเครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ (rotameter) , อุปกรณ์กรองอากาศ (air filter) และเครื่องอัดอากาศ (air compressor) ตามลำดับ โดยสายยางซิลิโคน (silicone tube) เมื่ออากาศผ่านเข้าคอลัมน์แล้วอากาศที่เหลือจะ

ออกสู่ภายนอกทางท่อนำก๊าซทางด้านบนของคอลัมน์แก้วซึ่งมีจุกยางปิดอยู่ นอกจากนี้ทางบนของคอลัมน์ซึ่งมีจุกยางปิดอยู่ยังมีอุปกรณ์วัดความเป็นกรดด่าง (pH - probe) และมีอุปกรณ์วัดการเกิดฟอง (antifoam probe) ต่ออยู่และเชื่อมกับชุดควบคุม ซึ่งชุดควบคุมนี้จะเป็นเครื่องมือที่คอยรับสัญญาน และปรับสมดุลในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตตามที่กำหนด



รูปที่ 3 การผลิตกรดกลูโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

7.2 การผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนต

นำสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในชิ้นและแผ่น PUF มาผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก (ภาคผนวก ก4) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในคอลัมน์แก้วที่เตรียมตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 7.1 ที่อุณหภูมิห้อง (30 - 33 องศาเซลเซียส) โดยแปรผันความหนาแน่นสายใยตรึงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและอัตราการให้อากาศตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 5.5 - 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และใช้อะดีคานอล เป็นสารกำจัดฟอง

8. การเก็บเกี่ยวกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนต

แยกสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 จากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกรองด้วยกระดาษวอทแมนเบอร์ 1 นำน้ำใสที่ได้ไปตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 9 และปริมาณน้ำตาลที่เหลือตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 10 ส่วนสายใยตรึงนำไปหาการเติบโตตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 11

9. การวิเคราะห์กรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนต

9.1 การวิเคราะห์กรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยการใช้แอมเบอร์ไลท์ไอ-อาร์ 120 พี ดูดซับโซเดียมอิออนและไตเตรตกรดกลูโคนิกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตราฐานความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล (Su และคณะ, 1997; Ward, 1997) นำน้ำหมักจากการกรองสายใยตรึงออกแล้ว ตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 8 มาผ่านลงในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุแอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี 12 มิลลิลิตร โดยน้ำหมักนี้จะถูกเจือจางให้มีปริมาณกรดกลูโคนิกเหมาะสมต่อการถูกดูดซับด้วยแอมเบอร์ไลท์ไอ-อาร์ 120 พี (จินตนา ไกรวัฒนพงศ์ ได้ทำการทดลองเมื่อปี 2536 พบว่า แอมเบอร์ไลท์ไอ-อาร์ 120 พี ปริมาณ 12 มิลลิลิตร สามารถดูดซับโซเดียมอิออนออกจากโซเดียมกลูโคเนตมาตราฐาน 100 มิลลิกรัม) ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดการดูดซับโซเดียมอิออนอย่างสมบูรณ์ จากนั้นปรับให้มีการอัตราการไหลประมาณ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที นำสารละลายที่ได้มาตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิกโดยไตเตรตกับ 0.1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์

9.2 การวิเคราะห์กรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตที่สร้างขึ้นโดยสายใยตรึง

ของ *Aspergillus niger* G153 ด้วยวิธี HPLC (High performance liquid chromatography) นำน้ำหมักที่ได้จากการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตด้วยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 มาตรวจสอบกรดกลูโคนิกด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ (Shimadsu - LC - 3A) โดยใช้ Zorbox - C8 (L-3555) คอลัมน์ขนาดความยาว 25 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร ของบริษัท Dupont โดยใช้กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.5 เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิเมตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detector ที่ 210 นาโนเมตร และคอลัมน์ Spherisorb C-18 (S 50D S2) ของบริษัท Phase seperation โดยใช้กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.5 เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detector ที่ 210 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน และมีกรดอิทาโคนิกเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard)
(ใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

10. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ใช้ระบบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสร่วมกับกลูโคสออกซิเดส (Peroxidase and Glucose oxidase : PGO enzyme) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต (Sigma Chemical Company,1980) ดังนี้

เติมสารละลาย พีจีโอเอนไซม์ (ภาคผนวก ข 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาหาปริมาณกลูโคสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐาน (ภาคผนวก ค 2)

11. การหาการเติบโตของสายใยตรึง

นำชิ้นและแผ่น PUF ที่มีสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ที่ได้จากการดำเนินการทดลองข้อ 8 มาทำให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่

แล้วหาน้ำหนักแห้งของสายใยตรึง โดยหักน้ำหนักแห้งของชิ้นและแผ่น PUF ออกจากน้ำหนักของชิ้นและแผ่น PUF ที่มีสายใยตรึง

12. **การตรวจการเติบโตของสายใยตรึง** *Aspergillus niger* G153 **ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด** (Scanning Electron Microscope: SEM)

นำชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 มาตรวจการเติบโตของสายใยตรึง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, JEOL Model JMS-35CF, Japan) โดยตรวจการเติบโตของสายใยตรึงในชิ้นและแผ่น PUF โดยในชิ้น PUF ตรวจการเติบโตของสายใยตรึงบริเวณผิวของ PUF ทั้งชิ้นและชิ้น PUF ที่ผ่าเป็นแว่น ส่วนแผ่น PUF นั้นตรวจการเติบโตของสายใยเช่นเดียวกับแบบชิ้น PUF แต่จะตัดออกเป็นแผ่นเล็กๆ จากแผ่น PUF แผ่นใหญ่อีกที โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ดังนี้

1. แช่ตัวอย่างในน้ำยาตรึงขั้นแรก (primary fixative) ซึ่งประกอบด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ของพาราฟอร์มัลดีไฮด์ (p-formaldehyde) ใน 0.1 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 18 ชั่วโมง นำมาล้างใน 0.1 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วนำตัวอย่างไปแช่ดองในน้ำยาขั้นที่สอง (secondary fixative) ซึ่งประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ของออสเมียมเตตระออกไซด์ (osmiumtetraoxide, OsO_4) ใน 0.1 โมลาร์ ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ภายในตู้ดูดควัน

2. การขจัดน้ำออก (dehydration) โดยเทน้ำยาดองขั้นที่สองออก แล้วจุ่มตัวอย่างใน 35 50 70 95 และ100 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล ขั้นตอนละ 10-20 นาที ตามลำดับ

3. นำตัวอย่างมาทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) โดยใช้เครื่องทำให้แห้ง (critical point drying, Model SAMDRI-780)

4. นำตัวอย่างไปติดบนแผ่นทองเหลืองด้วยกาวติดตัวอย่างที่นำไฟฟ้าได้ (Eletroconductive adhesive)

5. นำตัวอย่างไปเคลือบผิวด้วยทอง ความหนาประมาณ 20 นาโนเมตร ในเครื่อง Ion Sputter Coater, Model JSC-11., Japan

6. นำตัวอย่างไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

(หมายเหตุ: การเตรียมตัวอย่างและการตรวจการเติบโตของสายใยตรึงใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

13. **การวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว** (melting temperature) **ของเกลือโซเดียมกลูโคเนตที่สร้างโดยรา** *Aspergillus niger* G153

นำน้ำหมักที่ได้จากการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยรา *Aspergillus niger* G153 ซึ่งทำการกรองสายใยออกแล้วมาทำให้เข้มข้นโดยนำไประเหยน้ำออกในอ่างน้ำเดือด ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้องจนเย็น หลังจากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 - 1 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเกิดการตกผลึกของเกลือโซเดียมกลูโคเนตอย่างสมบูรณ์ นำผลึกเกลือที่ได้ไปล้างด้วยน้ำเย็นแล้วทำการตกผลึกอีกจนกระทั่งได้ผลึกสีค่อนข้างขาว หลังจากนั้นนำผลึกเกลือโซเดียมกลูโคเนตที่ผลิตได้จาก *Aspergillus niger* G153 และเกลือโซเดียมกลูโคเนตมาตราฐานไปหาอุณหภูมิหลอมเหลวโดยเครื่อง Differential Termal Analysis (DTA) model DTA - 409 ในช่วงอุณหภูมิ 0 ถึงอุณหภูมิ 200 โดยให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นนาทีละ 10 องศาเซลเซียส

(ใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

14. **การผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยสายใยตรึงของ** *Aspergillus niger* G153 **ในชิ้น** PUF **ขนาด** 0.20 **เซนติเมตร**^{3} **ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง**

14.1 **การผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดยใช้ภาวะเหมาะสมซึ่งได้ศึกษาโดย นิติพงษ์ จิระวรานันท์**, 2539

นำสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในชิ้น PUF มาผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยใช้ภาวะเหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อสายใยตรึง และการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตที่ศึกษาโดย นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539 กล่าวคือ ใช้ภาวะต่างๆ ดังนี้

- ความหนาแน่นสปอร์ที่ใช้เตรียมกล้าเชื้อ $1\text{-}2.5 \times 10^8$

(สปอร์ต่อ PUF แห้ง 1 กรัม)

- เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อสายใยตรึง (ชั่วโมง) 48
- ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (กรัมต่อลิตร) 4
- ความเข้มข้นกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว (กรัมต่อลิตร) 300
- ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต (กรัมต่อลิตร) 0
- ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร) 500
- น้ำหนักแห้งของกล้าเชื้อสายใยตรึง (กรัมต่อลิตร) 6
- อัตราการให้อากาศ (ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) 9
- อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) อุณหภูมิห้อง (30-33)
- ปรับความเป็นกรดด่างตลอดการทดลองด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้ 5.5-6.5

ตรวจวัดปริมาณกรดกลูโคนิกและการใช้น้ำตาล ตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 9.1 และ 10 ตามลำดับ

14.2 การหาภาวะเหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงในชิ้น PUF

ผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยสายใยตรึง *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงในชิ้น PUF ขนาด 0.20 เซนติเมตร^3 โดยใช้ภาวะเหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงที่ศึกษามาแล้ว โดยนิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539 คือเพาะเลี้ยงสปอร์ความหนาแน่นเท่ากับ 1-2.5×10^8 สปอร์ต่อน้ำหนักแห้ง PUF 1 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก2) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำสายใยตรึง *Aspergillus niger* G153 ในชิ้น PUF มาผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตในคอลัมน์แก้วซึ่งจัดเตรียมตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 7.1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึง (ภาคผนวก

ก4) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ไม่มีแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันภาวะต่างๆ ดังนี้

14.2.1 แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วเป็น 350 300 และ 250 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้

14.2.2 แปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 7.5 10 12.5 และ 15 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที แล้วเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้

14.2.3 แปรผันขนาดของกล้าเชื้อสายใยตรึงเป็น 6.225 9.125 12.3 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด (ซึ่งเตรียมจากน้ำหนักแห้งของชิ้น PUF เท่ากับ 5 7.5 10 กรัมต่อลิตร) แล้วเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้

ตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตตามวิธีการทดลองข้อ 9.1 การใช้น้ำตาลตามวิธีการทดลองข้อ 10 และระยะเวลาที่ให้ปริมาณกรดสูงสุด

14.3 การเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิกที่ผลิตโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในชิ้น PUF ขนาด 0.20 เซนติเมตร^{3}ในรูปโซเดียมกลูโคเนตและในรูปแคลเซียมกลูโคเนตภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต

ผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในชิ้น PUF ขนาด 0.20 เซนติเมตร^3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก (ภาคผนวก ก4) ซึ่งบรรจุในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 7 โดยใช้ภาวะต่างๆ แสดงดังข้างล่าง จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตภายใต้ภาวะเหมาะสมที่ศึกษาโดยนิติพงษ์ จิระวรานันท์ ในปี พ.ศ. 2539

ภาวะต่างๆ	ผลิตในรูปโซเดียมกลูโคเนต	ผลิตในรูปแคลเซียมกลูโคเนต
- เวลาที่ใช้ในการเพาะกล้าเชื้อสายใยตรึง (ชั่วโมง)	48	40
- ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก(กรัมต่อลิตร)	4	4

ภาวะต่างๆ	ผลิตในรูปโซเดียม กลูโคเนต	ผลิตในรูปแคลเซียม กลูโคเนต
- ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอก (กรัมต่อลิตร)	150	150
- ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก(กรัมต่อลิตร)	4	4
- ความเข้มข้นของกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก (กรัมต่อลิตร)	300	50
- ความเข้มข้นของกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก (กรัมต่อลิตร)	300	50
- ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด (กรัมต่อลิตร)	0	0
- สารเคมีที่ใช้ควบคุมความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 5.5-6.5	NaOH	$CaCO_3$
- ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)	400	500
- น้ำหนักแห้งกล้าเชื้อสายใยตรึง (กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต)	9.125	6
- อัตราการให้อากาศ (ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที)	15	9
- อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิห้อง(30-33)	อุณหภูมิห้อง(30-33)

เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตและในรูปแคลเซียมกลูโคเนตและการใช้น้ำตาลและเวลาที่ใช้ในการผลิตกรด

นอกจากชิ้น PUF แล้ว แผ่น PUF ก็เป็นวัสดุตรึงที่น่าสนใจอีกลักษณะหนึ่ง และเนื่องจากระหว่างการผลิตพบว่าชิ้น PUF มักจะมาอัดกันที่ก้นคอลัมน์เป็นบางช่วงเวลา ซึ่ง

อาจเกิดจาก ชิ้น PUF เล็กๆ มาเกาะกลุ่มกัน จึงหนักและตกลงก้นคอลัมน์ ดังนั้นเพื่อเป็นการหาหนทางแก้ปัญหานี้ จึงทำการทดลองต่อไปโดยใช้ PUF ที่เป็นแผ่นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 4.4 เซนติเมตร^2 เพื่อการตรึงสายใยและใช้ผลิตกรดกลูโคนิกต่อไป

15. การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในแผ่น PUF 4.4 เซนติเมตร^2

15.1 การหาภาวะเหมาะสมบางประการในการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในแผ่น PUF

15.1.1 การหาการเติบโตของ *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงในแผ่น PUF

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Aspergillus niger* G153 ความหนาแน่น 1 -2.5 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร (ซึ่งมีจำนวนสปอร์ 5.0-12.5×10^6 สปอร์) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก2) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ที่มีแผ่น PUF ขนาด 4.4 เซนติเมตร^2 น้ำหนัก 0.05 กรัม (จำนวน 1 แผ่น) เพาะเลี้ยงตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 5.2 วัดการเติบโตของสายใยตรึงในแผ่น PUF ทุกๆ 8 ชั่วโมงโดยหาน้ำหนักแห้งตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 11 จนกระทั่งการเติบโตคงที่หรือลดลง

15.1.2 การหาอายุที่เหมาะสมของกล้าเชื้อสายใยที่ตรึงในแผ่น PUF สำหรับการผลิตกรดกลูโคนิก

ผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในแผ่น PUF ตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 6 โดยใช้กล้าเชื้ออายุต่างๆ กัน คือ 36 40 44 48 และ 52 ชั่วโมง เปรียบเทียบปริมาณกรด ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และการเติบโตของสายใยตรึงตามวิธีการดำเนินทดลองข้อ 9.1 10 และ 11 ตามลำดับ เลือกเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสายใยตรึงประสิทธิภาพสูง กล่าวคือ ให้ปริมาณกรดสูงและใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

15.1.3 การหาความหนาแน่นที่เหมาะสมของสปอร์ที่ตรึงในแผ่น PUF

ตรึงสปอร์ของ *Aspergillus niger* G153 ในแผ่น PUF ขนาด 4.4 เซนติเมตร^2 โดยแปรผันจำนวนสปอร์ที่ใช้เป็น 5.0-12.5×10^4 5.0-12.5×10^5 5.0-12.5×10^6 และ 5.0-12.5×10^7 สปอร์ต่อแผ่น PUF น้ำหนัก 0.05 กรัม จำนวน 1 แผ่น ซึ่งบรรจุในขวด

รูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อใช้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก2) เพาะเลี้ยงตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 5.2 โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสปอร์ที่เหมาะสม คือ 48 ชั่วโมง นำสายใยตรึงที่ได้มาทำการผลิตกรดกลูโคนิกตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 6 ตรวจปริมาณกรดกลูโคนิก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และการเติบโตของสายใยตรึง เลือกความหนาแน่นสปอร์ที่เหมาะสมซึ่งให้ผลผลิตกรดสูงเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

15.1.4 การหาของน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของสายใย *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงในแผ่น PUF 10 แผ่น

เพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในแผ่น PUF ขนาด 4.4 เซนติเมตร^2 น้ำหนัก 0.05 กรัม จำนวน 1 แผ่น โดยใช้ความหนาแน่นสปอร์ที่เหมาะสมคือ 5.0-12.5$\times 10^6$ สปอร์ และใช้ช่วงเวลาเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงคือ 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก2) ตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 5.2 ทำการทดลอง 10 ซ้ำ แล้วนำมาวัดการเติบโตของสายใยตรึงโดยหาน้ำหนักแห้งของสายใยตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 11

15.2 การหาภาวะเหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในแผ่น PUF ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

นำสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในแผ่น PUF ขนาด 4.4 เซนติเมตร^{2}มาผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ซึ่งจัดเตรียมตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 7.1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึง (ภาคผนวก ก4) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนไม่มีแหล่งไนโตรเจนใดใด และได้แปรผันภาวะต่างๆ ดังนี้

15.2.1 แปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 25 20 และ 15 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที แล้วเปรียบเทียบผลผลิตเพื่อหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม

15.2.2 แปรผันขนาดกล้าเชื้อสายใยตรึงโดยแปรผันน้ำหนักแห้งของกล้าเชื้อสายใยตรึงเป็น 1.64 2.87 6.15 9.085 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (ใช้แผ่น PUF แห้งหนักเท่ากับ 1.25 2.5 5 7.5 กรัมต่อลิตร) และเปรียบเทียบผลผลิตกรดเพื่อหาขนาดของกล้าเชื้อที่เหมาะสม

ตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตตามวิธีการทดลองข้อ 9.1 การใช้น้ำตาลตามวิธีการทดลองข้อ 10 และระยะเวลาที่ให้ปริมาณกรดสูงสุด

16. **การเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยสายใยตรึงของ** *Aspergillus niger* **G153ในชิ้นและแผ่น PUF**

ผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในชิ้นและแผ่น PUF ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนต (ภาคผนวก ก4) ซึ่งบรรจุในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างตามวิธีการทดลองข้อ 7 โดยใช้ภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมดังนี้

ภาวะต่างๆ	ตรึงสายใยในชิ้น PUF	ตรึงสายใยในแผ่น PUF
- เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อสายใยตรึง (ชั่วโมง)	48	48
- ความเข้มข้นของกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว (กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก)	150	150
- ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (กรัมต่อลิตร)	4	4
- ความเข้มข้นกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว (กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด)	300	300
- ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต (กรัมต่อลิตร)	0	0
- ชนิดของสารที่ใช้ปรับความเป็นกรดด่างระหว่างการผลิตให้เท่ากับ 5.5-6.5	NaOH	NaOH

- ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด (มิลลิลิตร)	400	400
- น้ำหนักแห้งของกล้าเชื้อ (กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)	9.125	2.87
- อัตราการให้อากาศ (กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที)	15	20
- อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิห้อง(30-33)	อุณหภูมิห้อง(30-33)

เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิกและการใช้น้ำตาลเมื่อใช้สายใยตรึงที่ตรึงในชิ้นและแผ่น PUF ในการผลิตกรด

17. **เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153ในชิ้น PUF และสายใยอิสระของ *Aspergillus niger* G153**

ผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในชิ้น PUF ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง และโดยสายใยอิสระของ *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งศึกษาโดย (จินตนา ไกรวัฒนพงศ์, 2536) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนต (ภาคผนวก ก4) โดยใช้ภาวะต่างๆ ดังนี้

ภาวะต่างๆ	ตรึงสายใยในชิ้น PUF	สายใยอิสระ
- เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อสายใยตรึง (ชั่วโมง)	48	16
- ปริมาณแอมโมเนียซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (กรัมต่อลิตร)	4	4
- ความเข้มข้นกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด (กรัมต่อลิตร)	300	300
- ความเข้มข้นของแอมโมเนียซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต (กรัมต่อลิตร)	0	4

- ชนิดของสารที่ใช้ควบคุมความเป็นกรดด่าง ระหว่างการผลิตเท่ากับ 5.5-6.5	NaOH	NaOH
- ชนิดของหอทดลองที่ใช้	คอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง	ถังหมักขนาด 5 ลิตร
- ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)	400	2000
- น้ำหนักแห้งกล้าเชื้อสายใยตรึง (กรัมต่อลิตรอาหารเพื่อการผลิต)	9.125	0.184
- อัตราการให้อากาศ (กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงต่อนาที)	15	1.5
- อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	ไม่มีการกวน	600
- สารกำจัดฟอง	อะดีคานอล	อะดีคานอล
- ความเป็นกรดด่าง	5.5-6.5	5.5-6.5
- อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิห้อง	อุณหภูมิห้อง

เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิก และระยะเวลาในการผลิต เมื่อใช้สายใยตรึงในชิ้น PUF และสายใยอิสระในการผลิตกรด