บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1. เคมีภัณฑ์

น้ำตาล ดี (+) กลูโคสโมโนไฮเดรต (D (+) glucose monohydrate) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลฟรุกโตส (fructose) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลทรายขาวมิตรผล ของบริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด

น้ำตาลทรายแดงมิตรผล ของบริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

แมกนีเซียมซัลเฟต ($Mg SO_4 . 7H_2O$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

คอร์นสตีพลิเคอร์ (corn steep liquor) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

เฟอร์ริกทาร์เทรต ($Fe_2(C_4H_4O_6)_3$) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 . 5H_2O$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 . 2H_2O$) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) ของบริษัท May and Baker Ltd, England

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Mallinckrodt Baker, U.S.A.

โบรมีน (Br_2) ของบริษัท Farmitalia Carlo erba, Italy

โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

โปตัสเซียมโบรไมด์ (KBr) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

โปตัสเซียมไอโอไดด์ (KI) ของบริษัท Mallinckrodt Baker, U.S.A.

โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) ของบริษัท Sigma Chemical Co, U.S.A.

แป้ง (soluble starch) ของบริษัท Difco laboratories, U.S.A.

กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5 - dinitrosalicylic acid) ของบริษัท Fluka Chemica, Switzerland

โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต (C_4H_4 $KNaO_6$. $4H_2O$) ของบริษัท Farmitalia Carlo erba, Italy

พีนอล (phenol) ของบริษัท Mallinckrodt Baker, U.S.A.

กรดซัลฟุริก (H_2SO_4) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

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

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

โซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

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

พอลิยูรีเทนโฟม (polyurethane foam) ของบริษัท บางกอกโฟม จำกัด ประเทศไทย

2. อุปกรณ์

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

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psycrotherm) ของบริษัท New Brunswick Scientific Co, U.S.A.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS - 325 ของบริษัท Tommy Seiko Co, Japan

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

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) รุ่น O - 270 ของบริษัท Mammert GmbH, Germany

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

คอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (glass bubble column) ได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ ดร. ชินอิชิ คิโนชิตะ (Prof. Dr. Shinishi Kinoshita) แห่งมหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องอัดอากาศ (air compressor) Puma รุ่น PP - 1 ของบริษัท ธีรวัฒน์เครื่องอัดลม จำกัด

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

เครื่องวัดปริมาณอากาศ (rotameter) รุ่น RK - 1050 ของบริษัท KOFLOC, Japan

ไอโอดีนฟลาสก์ (iodine flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร ของบริษัท Bibby Sterllin, Ltd., England

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) รุ่น LC - 3Aของบริษัท Shimadzu, Japan

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

วิธีดำเนินการทดลอง

1. จุลินทรีย์และการเก็บรักษา

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ *Aspergillus terreus* I10 ที่คัดเลือกได้จากดินในประเทศไทย มีความสามารถในการผลิตกรดอิทาโคนิกได้สูง (อุษา กรีอักษร, 2535) ทำการเก็บรักษาโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยสปอร์ของเชื้อราแล้วลากลงบนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส (potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก 1) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 - 6 วัน เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บที่ 4 - 8 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเตรียมสปอร์แขวนลอย

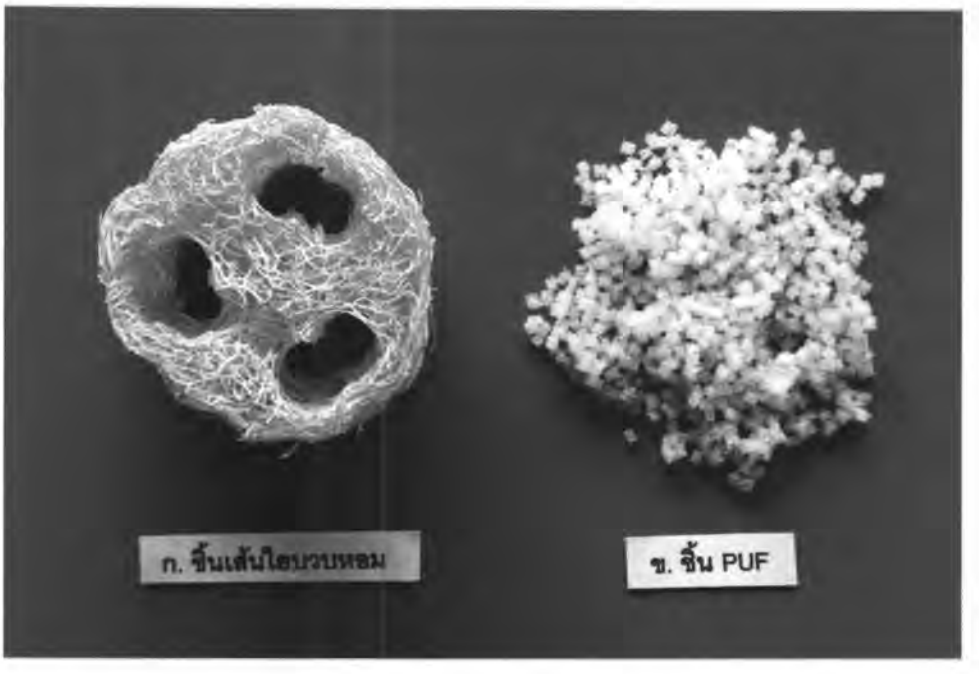
ถ่ายสปอร์ของ *A. terreus* I10 ลงบนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรสซึ่งบรรจุในหลอดแก้ว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30 - 33 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 4 - 6 วัน เติมน้ำกลั่นผสมทวีน 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ เขี่ยสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอยและผสมให้เข้ากัน เพื่อใช้เป็นสปอร์แขวนลอยในการทดลองต่อไป

3. **การเตรียมวัสดุตรึง**

วัสดุตรึงที่ใช้ในการทดลองนี้มี 2 ชนิด คือ

1. ชิ้นเส้นใยบวบหอม (*Luffa cylindrica (L.) Roem*) รูปทรงกระบอก ซึ่งเตรียมจากผลบวบหอมแห้งที่ลอกเปลือกออกแล้ว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 - 4.2 เซนติเมตร ตัดตามขวางของผลโดยเลือกบริเวณกลางผลที่มีรูปทรงกระบอกให้ได้ความสูง 5 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักแห้งได้ 2.0 - 2.2 กรัม ล้างทำความสะอาด อบแห้งเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (รูปที่ 3)

2. ชิ้นพอลิยูรีเทนโฟม (polyurethan foam, PUF) รูปทรงลูกบาศก์ ขนาด 0.25 x 0.25 x 0.25 เซนติเมตร ซึ่งเตรียมโดยตัดจากแผ่น PUF หนา 0.25 เซนติเมตร ซึ่งมีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.4 - 0.6 มิลลิเมตร ล้างทำความสะอาด อบแห้งเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 วัสดุตรึงที่ใช้ในการทดลอง
ก. ชิ้นเส้นใยบวบหอม
ข. ชิ้น PUF

4. **การเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึง**

4.1 **การเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอม**

เตรียมสปอร์แขวนลอยตามวิธีการทดลองในข้อ 2 ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ $1 - 2 \times 10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับจำนวนด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ่ายสปอร์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 3) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดทรงกระบอกซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร ความสูง 18 เซนติเมตร ความจุ 700 มิลลิลิตร และมีชิ้นเส้นใยบวบหอมขนาดความสูง 5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 - 4.2 เซนติเมตร หนัก 2.0 - 2.2 กรัมจำนวน 1 ชิ้นบรรจุอยู่ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 44 - 48 ชั่วโมง จะได้ชิ้นเส้นใยบวบหอมที่มีสายใยตรึงหนัก 28 - 30 กรัม (น้ำหนักเปียก)หรือคิดเป็นน้ำหนักแห้งสายใยตรึงเท่ากับ 1.3 - 1.5 กรัม ใช้ชิ้นเส้นใยบวบหอมที่มีสายใยตรึงเป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

4.2 **การเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงในชิ้น** PUF

เตรียมสปอร์แขวนลอยตามวิธีการทดลองในข้อ 2 ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ $1 - 2 \times 10^9$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับจำนวนด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ่ายสปอร์แขวนลอย 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกซึ่งดัดแปลงจากสูตรที่ทำการทดลองโดย เจษฎาพันธ์ จันทขันธ์ (2538) (ภาคผนวก ก 2) โดยใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลซูโครส ปริมาตร 150 มิลลิลิตรที่มีชิ้น PUF รูปลูกบาศก์ขนาด 0.25 x 0.25 x0.25 เซนติเมตร หนัก 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) โดยบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะได้ PUF ที่มีสายใยตรึงหนัก 12 กรัม (น้ำหนักเปียก) ซึ่งคิดเป็นน้ำหนักแห้งสายใยตรึงเท่ากับ 1.3 - 1.5 กรัม ใช้ชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึงเป็นกล้าเชื้อสำหรับการทดลองต่อไป

5. **การผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ** *A. terreus* **I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอมในระดับขวดเขย่า**

ถ่ายชิ้นเส้นใยบวบหอมที่มีสายใยตรึงซึ่งเตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 4.1 จำนวน 1 ชิ้น ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง (ภาคผนวก ก 5) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทรงกระบอกซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร

ความสูง 18 เซนติเมตร ความจุ 700 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน

6. การผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้น PUF ระดับขวดเขย่า

ถ่ายชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึงซึ่งเตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 4.2 หนัก 10 กรัม (น้ำหนักเปียก) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง (ภาคผนวก ก 5) ปริมาตร 120 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน

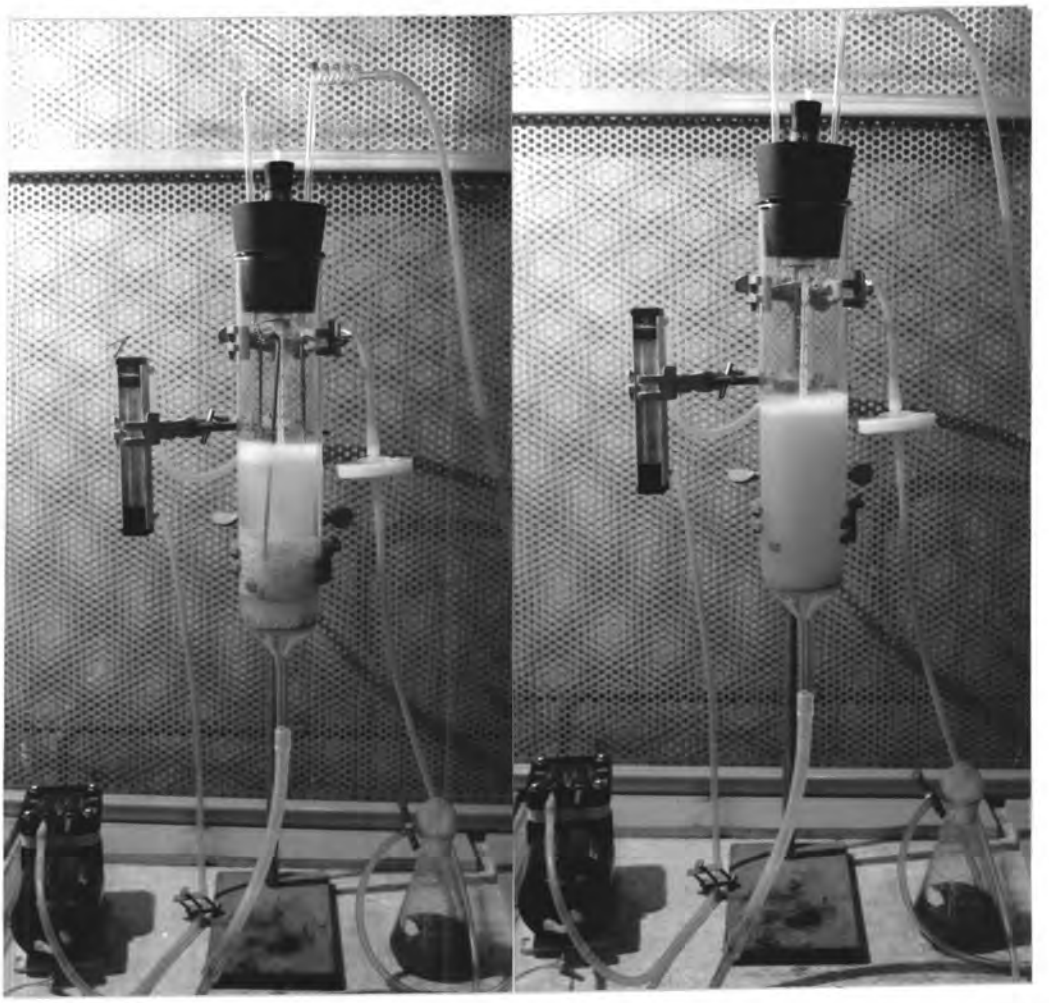
7. การผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (glass bubble column)

7.1 การเตรียมคอลัมน์แก้ว

ยึดคอลัมน์แก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ปริมาตรใช้งาน 400 มิลลิลิตร กับขาตั้งเหล็กโดยให้คอลัมน์ทำมุม 90 องศากับแนวราบ ด้านล่างของคอลัมน์แก้วมีแผ่นกระจายอากาศซินเตอร์กลาส (sintered glass) ซึ่งทำหน้าที่รองรับสายใยตรึงที่บรรจุในคอลัมน์แก้ว พร้อมทั้งเป็นตัวกระจายอากาศเข้าสู่คอลัมน์แก้ว ปลายล่างสุดของคอลัมน์แก้วต่อเข้ากับเครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ อุปกรณ์กรองอากาศ และเครื่องอัดอากาศ ตามลำดับ โดยสายยางซิลิโคน (silicone tube) เมื่ออากาศผ่านเข้าคอลัมน์แล้วอากาศที่เหลือจะออกสู่ภายนอกทางท่อนำก๊าซทางด้านบนของคอลัมน์แก้วซึ่งมีจุกยางปิดอยู่ (รูปที่ 4)

7.2 การผลิตกรดอิทาโคนิก

นำสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอมและชิ้น PUF มาผลิตกรดอิทาโคนิกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง (ภาคผนวก ก 5) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในคอลัมน์แก้วที่เตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 7.1 ที่อุณหภูมิห้อง (30 - 33 องศาเซลเซียส) โดยแปรผันความหนาแน่นของสายใยตรึงและอัตราการให้อากาศตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง



ก ข

รูปที่ 4 การผลิตกรดอิทาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง
ก. ใช้สายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมในการผลิตกรด
ข. ใช้สายใยตรึงใน PUF ในการผลิตกรด

8. **การเก็บเกี่ยว** (harvest) **กรดอิทาโคนิก**

กรองแยกชิ้นวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 จากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปตรวจหาปริมาณกรดอิทาโคนิก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือตามวิธีการทดลองข้อ 9.1 และ10 ตามลำดับ ส่วนสายใยตรึงนำไปหาการเติบโตตามวิธีการทดลองข้อ 12

9. **การวิเคราะห์กรดอิทาโคนิก**

9.1 **วิเคราะห์หาปริมาณกรดอิทาโคนิกด้วยวิธีโบรมิเนชัน** (Bromination method) (Friedkin, 1945)

นำน้ำหมักซึ่งได้กรองแยกสายใยตรึงออกแล้วตามวิธีการทดลองในข้อ 8 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในไอโอดีนฟลาสก์ เติมน้ำโบรมีน (ภาคผนวก ข 1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์เข้มข้น (ภาคผนวก ข 2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้น 10 นาทีจึงนำไปไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (ภาคผนวก ข 3) โดยใช้สารละลายแป้งความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นตัวบ่งชี้ คำนวณหาปริมาณกรดอิทาโคนิกโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค 1)

9.2 **การวิเคราะห์กรดอิทาโคนิกที่สร้างขึ้นโดยสายใยตรึงของ** *A. terreus* **I10 ด้วยวิธี** HPLC

นำส่วนน้ำหมักที่ได้จากการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 มาตรวจสอบกรดอิทาโคนิกด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (Shimadzu LC - 3A) โดยใช้คอลัมน์ Zorbox - C8 (L - 3555) ขนาดความยาว 25 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร โดยใช้กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีค่าความเป็นกรด - ด่าง 2.5 เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับอิทาโคนิกมาตรฐาน และมีกรดกลูโคนิกเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) (หมายเหตุ : ใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

10. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

10.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยการทำปฏิกิริยาของฟีนอลและกรดกำมะถัน (Hansen และ Phillips, 1981)

เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข 4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เขย่าแรง ๆ ตั้งทิ้งต่อไปอีกประมาณ 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร หาค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค 2)

10.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Bernfeld (Bernfeld, 1955)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA) (ภาคผนวก ข 5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค 3)

11. การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักโดยใช้วิธีของ Kempers (Kempers, 1974)

เจือจางน้ำหมักที่กรองแยกสายใยออกแล้วเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม จากนั้นเติมน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ (ภาคผนวก ข 6) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและสารละลาย EDTA (ภาคผนวก ข 7) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพรัสไซด์รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข 8) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรต์รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข 9) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 636 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 636 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค 4) คำนวณหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)} = \frac{A_{636} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times 132}{\text{ความชัน} \times 5 \times 1000 \times 28}$$

28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต

132 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมซัลเฟต

12. การวัดการเติบโตของสายใยตรึง

12.1 การวัดการเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักแห้ง

ล้างชิ้นเส้นใยบวบหอมหรือชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ที่ได้จากการทดลองข้อ 8 ให้สะอาด ทำให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักแห้งของชิ้นเส้นใยบวบหอมหรือชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึง แล้วหาน้ำหนักแห้งของสายใยตรึงโดยหักน้ำหนักแห้งของชิ้นเส้นใยบวบหอมหรือชิ้น PUF ออกจากน้ำหนักของชิ้นเส้นใยบวบหอมหรือชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึง

12.2 การวัดการเติบโตโดยการหาค่าปัจจัยในการเปลี่ยนน้ำหนักเปียกไปเป็นน้ำหนักแห้ง (dry weight factor)

ใช้วัดการเติบโตของสายใยตรึงเฉพาะการทดลองที่ไม่สามารถหาน้ำหนักแห้งโดยการทำให้แห้งในขณะนั้นได้ ได้แก่ การหาการเติบโตของสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมระหว่างการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อหารูปแบบของการเติบโต การวัดการเติบโตวิธีนี้ทำได้โดยชั่งน้ำหนักเปียกของสายใยตรึงในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ที่กำหนด รวมทั้งเมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง แล้วหาน้ำหนักแห้งของสายใยตรึงเมื่อสิ้นสุดการทดลองโดยทำให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นำน้ำหนักที่ได้มาหาค่าปัจจัยในการเปลี่ยนน้ำหนักเปียกไปเป็นน้ำหนักแห้ง (dry weight factor) ดังนี้

$$\text{ปัจจัยในการเปลี่ยนน้ำหนักเปียกไปเป็นน้ำหนักแห้ง (dry weight factor)} = \frac{\text{น้ำหนักเปียกของสายใยตรึง}^{*}}{\text{น้ำหนักแห้งของสายใยตรึง}^{**}}$$

* น้ำหนักเปียกของสายใยตรึง = น้ำหนักเปียกของวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึง - น้ำหนักเปียกของวัสดุตรึง

** น้ำหนักแห้งของสายใยตรึง = น้ำหนักแห้งของวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึง - น้ำหนักแห้งของวัสดุตรึง

จากนั้นนำค่าน้ำหนักเปียกของสายใยตรึงที่ต้องการทราบค่าน้ำหนักแห้งมาคูณด้วยปัจจัยในการเปลี่ยนน้ำหนักเปียกไปเป็นน้ำหนักแห้ง จะได้น้ำหนักแห้งของสายใยตรึง

13. **การตรวจการเติบโตของสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด** (Scanning Electron Microscope : SEM)

นำชิ้นเส้นใยบวบหอมหรือชิ้นโฟมที่มีสายใยตรึงมาตรวจการเติบโตของสายใยตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, JEOL Model JSM - 35CF, Japan) โดยตรวจการเติบโตของสายใยตรึงบริเวณผิวของชิ้นเส้นใยบวบหอมและแต่ละเส้นใยบวบหอม รวมทั้งตรวจการเติบโตของสายใยตรึงในพอลิยูรีเทนโฟมบริเวณผิวของ PUF ทั้งชิ้นและชิ้น PUF ผ่าเป็นแว่น โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้

1. แช่ตัวอย่างในน้ำยาดองขั้นแรก (primary fixative) ซึ่งประกอบด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ของพาราฟอร์มัลดีไฮด์ (p - formaldehyde) ใน 0.1 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 18 ชั่วโมง นำมาล้างใน 0.1 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วนำตัวอย่างไปแช่ในน้ำยาดองขั้นที่สอง (secondary fixative) ซึ่งประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ของออสเมียมเตตระออกไซด์ (osmium tetraoxide, OsO_4) ใน 0.1 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 - 2 ชั่วโมง ภายในตู้ดูดควัน

2. การขจัดน้ำออก (dehydration) โดยเทน้ำยาดองขั้นที่ 2 ออกแล้วจุ่มตัวอย่างใน 35 50 70 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ขั้นตอนละ 10 -20 นาที ตามลำดับ

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

4. นำตัวอย่างไปติดบนแท่นทองเหลืองด้วยกาวติดตัวอย่างที่นำไฟฟ้าได้ (electroconductive adhesive)

5. นำตัวอย่างไปเคลือบผิวด้วยทอง ความหนาประมาณ 20 นาโนเมตร ในเครื่อง Ion Sputter Coater, Model JSC - 110, Japan

6. นำตัวอย่างไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

(หมายเหตุ : การเตรียมตัวอย่างและการตรวจการเติบโตของสายใยตรึงใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

14. การหาแหล่งคาร์บอนทดแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์สำหรับการผลิตกรดอิทาโคนิกและการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอม

จากการทดลองผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยอิสระของ *A. terreus* I10 โดย อุษา กรีอักษร (2539) พบว่าสามารถใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ในการผลิตกรดอิทาโคนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยปริมาณกรดอิทาโคนิกที่ผลิตได้ไม่ลดลง แต่งานวิจัยนี้เป็นการผลิตโดยสายใยตรึง ดังนั้นจึงมุ่งที่จะหาแหล่งของน้ำตาลซูโครสที่มีราคาถูกกว่าน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ เมื่อทำการผลิตโดยสายใยตรึงโดยทำการทดลองในระดับขวดเขย่า

14.1 การหาแหล่งคาร์บอนทดแทนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอม

ผลิตกรดอิทาโคนิกในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงซึ่งดัดแปลงจาก เทพนาฏ พุ่มไพบูลย์ (2536) โดยไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (ภาคผนวก ก 4) ที่ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.5 ในขวดเขย่า โดยใช้ชิ้นเส้นใยบวบที่มีสายใยตรึงที่เตรียมได้ตามวิธีการทดลองข้อ 4.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเปียกของชิ้นวัสดุตรึงรวมสายใยตรึงเท่ากับ 28 - 30 กรัม นำสายใยตรึงมาผลิตกรดอิทาโคนิกตามวิธีการทดลองข้อ 5 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายแดง ตรวจปริมาณกรดอิทาโคนิกที่ผลิตได้ตามวิธีการทดลองข้อ 9.1 การใช้น้ำตาลตามวิธีการทดลองข้อ 10 เปรียบเทียบปริมาณกรดอิทา โคนิกเมื่อใช้แหล่งของน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน

14.2 การหาแหล่งคาร์บอนทดแทนที่เหมาะสมต่อการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอม

ตรึงสปอร์ของ *A. terreus* I10 ความหนาแน่น 1 - 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ต่อชิ้นเส้นใยบวบหอมรูปทรงกระบอกสูง 5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 - 4.2 เซนติเมตร หนัก 2.0 -2.2 กรัม จำนวน 1 ชิ้น เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ตามวิธีการทดลองข้อ 4.1 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายแดง นำสายใยตรึงมาผลิตกรดอิทาโคนิกตามวิธีการทดลองข้อ 5 ตรวจสอบลักษณะการเติบโตของกล้าเชื้อ ปริมาณกรดอิทาโคนิกที่ผลิตได้ และการใช้น้ำตาล

15. การหาความสม่ำเสมอในการใช้ชิ้นเส้นใยบวบหอมสำหรับการตรึงและการผลิตกรดอิทาโคนิกในระดับขวดเขย่า

การทดลองนี้ใช้ชิ้นเส้นใยบวบหอมรูปทรงกระบอกสูง 5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 - 4.2 เซนติเมตร หนัก 2.0 -2.2 กรัม จำนวน 10 ชิ้น ทำการตรึงสปอร์ของ *A. terreus* I10 ความหนาแน่น 1 - 2 x 10^8 สปอร์ต่อชิ้นเส้นใยบวบหอม 1 ชิ้น ทำให้สปอร์ตรึงงอกในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) แต่ใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนจากผลการทดลองข้อ 14.2 ตามวิธีการทดลองข้อ 4.1 นำชิ้นเส้นใยบวบหอมที่มีสายใยตรึงแต่ละชิ้นมาผลิตกรดอิทาโคนิกในขวดเขย่าตามวิธีการทดลองข้อ 5 เปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของสายใยที่ตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมแต่ละชิ้นในขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อ ปริมาณกรดที่ผลิตได้ และการเติบโตของสายใยตรึงระหว่างการผลิต

16. การหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอม

16.1 การหาการเติบโตของ *A. terreus* I10 ที่ตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกเมื่อแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน

ตรึงสปอร์ของ *A. terreus* I10 ความหนาแน่น 1 - 2 x 10^8 สปอร์ต่อชิ้นเส้นใยบวบหอมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 - 4.2 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร ซึ่งมีน้ำหนักแห้ง 2.0 - 2.2 กรัม จำนวน 1 ชิ้น เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) แต่ใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่าง ๆ กัน คือ 2.70 1.35 0.81 และ 0.27 กรัมต่อลิตร ทำให้สปอร์ตรึงงอกตามวิธีการทดลองข้อ 4.1 วัดการเติบโตของสายใยตรึงทุก 3 ชั่วโมง โดยหาน้ำหนักแห้งจากค่าปัจจัยในการเปลี่ยนน้ำหนักเปียกไปเป็นน้ำหนักแห้ง จนการเติบโตคงที่หรือลดลง

16.2 การหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึง

ตรึงสปอร์และทำให้สปอร์ตรึงงอกเช่นเดียวกับข้อ 16.1 เลือกสายใยตรึงที่อยู่ในระยะของการเติบโตต่าง ๆ กัน ได้แก่ ช่วงกลางของระยะการเติบโตรวดเร็ว (mid log phase) ช่วงปลายของระยะการเติบโตรวดเร็ว (late log phase) และระยะการเติบโตคงที่ (stationary phase) โดยพิจารณาจากการเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้การเติบโตสูงเป็นเกณฑ์ ซึ่งได้แก่อายุ 28 44 และ60 ชั่วโมง ตามลำดับ จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกที่มีความเข้มข้น

ของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 2.70 1.35 และ 0.81 กรัมของแอมโมเนียมซัลเฟตต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำชิ้นเส้นใยบวบหอมที่มีสายใยตรึงดังกล่าวมาผลิตกรดอิทาโคนิกตามวิธีการทดลองข้อ 5 ตรวจปริมาณกรดอิทาโคนิกที่ได้ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และการเติบโตของสายใยตรึง เลือกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกและช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสายใยตรึงเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

16.3 การหาความหนาแน่นที่เหมาะสมของสปอร์ตรึง

ตรึงสปอร์ของ *A. terreus* I10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 3) ที่ได้จากการทดลองข้อ 16.2 คือ ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.35 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน แปรผันจำนวนสปอร์ที่ใช้เป็น $1 - 2 \times 10^{6}$ $1 - 2 \times 10^{7}$ $1 - 2 \times 10^{8}$ $1 - 2 \times 10^{9}$ และ $1 - 2 \times 10^{10}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรต่อชิ้นเส้นใยบวบหอมสูง 5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 - 4.2 เซนติเมตร หนัก 2.0 - 2.2 กรัม จำนวน 1 ชิ้น ทำให้สปอร์ตรึงงอกตามวิธีการทดลองข้อ 4.1 เป็นเวลา 44 ชั่วโมง (จากการทดลองข้อ 16.2) นำสายใยตรึงที่ได้มาผลิตกรดอิทาโคนิกตามวิธีการทดลองข้อ 5 เปรียบเทียบผลผลิตกรด ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และการเติบโตของสายใยตรึง เลือกความหนาแน่นของสปอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสายใยตรึงเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

17. การหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมในระดับขวดเขย่า

เนื่องจากสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยอิสระได้ทำการศึกษามาแล้วโดย เทพนาฏ พุ่มไพบูลย์ (2536) แต่สายใยตรึงจะมีความต้องการปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่น้อยกว่าสายใยอิสระ เนื่องจากถูกจำกัดบริเวณในการเติบโต ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง โดยทำการทดลองผลิตกรดอิทาโคนิกด้วยสายใยตรึงที่เตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 4.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง (ภาคผนวก ก 4) แต่ใช้น้ำตาลทรายขาวแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ (จากการทดลองข้อ 14.1) ซึ่งได้แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน เป็น 0.4 0.2 และ 0 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ใช้ภาวะต่าง ๆตามวิธีการทดลองข้อ 5 ตรวจสอบปริมาณกรดที่ผลิตได้ และการเกิดสายใยอิสระ

18. การหาภาวะเหมาะสมบางประการในการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

นำสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 มาผลิตกรดอิทาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่ได้จัดเตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 7.1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง (ภาคผนวก ก 5) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยแปรผันภาวะต่าง ๆ ดังนี้

18.1 แปรผันอัตราการให้อากาศ เป็น 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

18.2 แปรผันขนาดชิ้นวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึง โดยคงค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของชิ้นวัสดุตรึงไว้แต่แปรความสูงเป็น 7 5 และ 3 เซนติเมตร ทำให้มีน้ำหนักแห้งของชิ้นเส้นใยบวบหอมเท่ากับ 2.8 2.0 และ 1.2 กรัม ตามลำดับ และเมื่อทำการตรึงสายใยราได้น้ำหนักเปียกรวมเท่ากับ 44.76 29.12 และ 17.48 กรัม ตามลำดับ คิดเป็นน้ำหนักแห้ง 5.27 3.59 และ 2.21 กรัม ตามลำดับ ซึ่งเท่ากับน้ำหนักแห้งของสายใยรา 2.47 1.49 และ 1.02 กรัม ตามลำดับ

18.3 ปรับลดความเข้มข้นของน้ำตาลทรายขาวซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงเป็น 40 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

19. การหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึง PUF

19.1 การหาการเติบโตของ *A. terreus* I10 ที่ตรึงใน PUF เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

ตรึงสปอร์ของ *A. terreus* I10 ความหนาแน่น 1 - 2 x 10^9 สปอร์ต่อ PUF 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ทำให้สปอร์ตรึงงอกในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) แต่ใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2 วัดการเติบโตของสายใยตรึงทุก 12 ชั่วโมง โดยหาน้ำหนักแห้งตามวิธีการทดลองข้อ 12.1 จนกระทั่งการเติบโตคงที่หรือลดลง

19.2 การหาช่วงเวลาเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสปอร์ที่ตรึงใน PUF

เพาะเลี้ยงสปอร์ของ *A. terreus* I10 ความหนาแน่น 1 - 2 x 10^9 สปอร์ต่อ PUF 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) แต่ใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้สปอร์งอกตามวิธีการทดลองข้อ 4.2 เลือกช่วงเวลาใน

การเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงจากการทดลองข้อ 19.1 ดังนี้ คือ 60 และ 72 ชั่วโมงซึ่งอยู่ในช่วงปลายของระยะการเติบโตรวดเร็ว และ 84 ชั่วโมงซึ่งเป็นระยะที่มีการเติบโตคงที่ นำสายใยตรึงที่ได้มาผลิตกรดอิทาโคนิกตามวิธีการทดลองข้อ 6 เปรียบเทียบผลผลิตกรดดังกล่าว การใช้น้ำตาลและการเติบโตของสายใยตรึงระหว่างการผลิต

19.3 **การหาความหนาแน่นที่เหมาะสมของสปอร์ในการตรึงใน** PUF

ตรึงสปอร์ของ *A. terreus* I10 ใน PUF โดยแปรผันจำนวนสปอร์ที่ใช้เป็น $1 - 2 \times 10^{8}$ $1 - 2 \times 10^{9}$ และ $1 - 2 \times 10^{10}$ สปอร์ต่อ PUF 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) ซึ่งได้ศึกษามาแล้วโดย เจษฎาพันธุ์ จันทขันธ์ (2538) แต่ใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 150 มิลลิลิตรบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงให้สปอร์ตรึงงอกตามวิธีการทดลองข้อ 4.2 นำสายใยตรึงที่ได้มาผลิตกรดอิทาโคนิกตามวิธีการทดลองข้อ 6 เปรียบเทียบปริมาณกรด การใช้น้ำตาล การเติบโตของสายใยตรึง เลือกความหนาแน่นสปอร์ที่เหมาะสมซึ่งให้ผลผลิตกรดสูง

เนื่องจากจากการศึกษาของเจษฎาพันธุ์ จันทขันธ์ (2538) ได้ทำการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในระดับขวดเขย่าแล้ว ในการทดลองนี้จึงไม่ทำการทดลองในระดับขวดเขย่าแต่จะขยายส่วนโดยหาภาวะบางประการในการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงใน PUF ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

20. **การหาภาวะเหมาะสมบางประการในการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยใช้สายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ใน PUF ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง**

นำสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 มาผลิตกรดอิทาโคนิกในคอลัมน์แก้วซึ่งได้จัดเตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 7.1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง (ภาคผนวก ก 5) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยแปรผันภาวะต่าง ๆดังนี้

20.1 แปรผันอัตราการให้อากาศ เป็น 1.25 2.5 และ 5.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

20.2 แปรผันขนาดหัวเชื้อโดยแปรผันน้ำหนักเปียก PUF ที่มีสายใยตรึงเป็น 7.5 15.0 22.5 และ 30.0 กรัมต่อลิตร (ซึ่งเตรียมจาก PUF ที่มีน้ำหนักแห้ง 0.63 1.25 1.86 และ 2.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นน้ำหนักแห้งสายใยเท่ากับ 0.96 1.08 2.69 และ 3.31 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ)

20.3 ปรับลดความเข้มข้นของน้ำตาลทรายขาวในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงเป็น 25 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

21. การเปรียบเทียบปริมาณกรดอิทาโคนิกภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอมและใน PUF

ผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยที่ตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมและที่ตรึงใน PUF ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง (ภาคผนวก ก 5) ซึ่งบรรจุในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างตามวิธีการทดลองข้อ 7 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงในวัสดุตรึงทั้งสองชนิดที่ได้ศึกษามาแล้วดังรายงานข้างต้น ดังนี้

ภาวะต่าง ๆ	ตรึงสายใยในชิ้นเส้นใยบวบหอม	ตรึงสายใยใน PUF
- ความหนาแน่นสปอร์ที่ใช้เตรียมกล้าเชื้อ	$1 - 2 \times 10^8$	$1 - 2 \times 10^9$
- เวลาที่ใช้ในการเพาะกล้าเชื้อสายใยตรึง (ชั่วโมง)	44	72
- ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก	1.35	2.70
- ความเข้มข้นน้ำตาลทรายขาว (กรัมต่อลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง	40	25
- ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต	0	0
- ค่าความเป็นกรด - ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	4.5	4.5
- ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)	400	400
- ขนาดหัวเชื้อ (น้ำหนักแห้งของสายใยตรึงต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 400 มิลลิลิตร)	1.49	1.08
	ชิ้นวัสดุตรึงสูง 5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 เซนติเมตร	ใช้ชิ้น PUF แห้ง 0.74 กรัม
- อัตราการให้อากาศ (ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที)	2.0	2.5
- อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิห้อง (30 -33)	อุณหภูมิห้อง (30 -33)

เปรียบเทียบปริมาณกรดอิทาโคนิกและการใช้น้ำตาล เมื่อใช้สายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมและสายใยตรึงใน PUF ในการผลิตกรด

22. **การทดลองผลิตกรดอิทาโคนิกโดยใช้สายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ซ้ำในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศทางด้านล่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน**

22.1 **ผลิตกรดอิทาโคนิกโดยใช้สายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมซ้ำ**

ผลิตกรดอิทาโคนิกซ้ำภายใต้ภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกับข้อ 20 โดยใช้น้ำตาลทรายขาว 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด ทำการผลิตกรดอิทาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างตามวิธีการทดลองข้อ 7 ซ้ำรวม 3 ครั้ง เปรียบเทียบปริมาณกรดอิทาโคนิก และการใช้น้ำตาลของแต่ละซ้ำ

22.2 **ผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงใน PUF ซ้ำ**

ผลิตกรดอิทาโคนิกซ้ำภายใต้ภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกับข้อ 20 โดยใช้น้ำตาลทรายขาว 25 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด ทำการผลิตกรดอิทาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศทางด้านล่างตามวิธีการทดลองข้อ 7 ซ้ำรวม 3 ครั้ง เปรียบเทียบปริมาณกรดอิทาโคนิก และการใช้น้ำตาลของแต่ละซ้ำ

23. **การทดลองผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนในการผลิตครั้งแรก แต่มีแหล่งไนโตรเจนในการผลิตซ้ำ**

ผลิตกรดอิทาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ใน PUF ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกับข้อ 22.2 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนในการผลิตครั้งแรก แต่ในการผลิตซ้ำเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.44 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบปริมาณกรดอิทาโคนิก และการใช้น้ำตาลของแต่ละซ้ำ