บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการหาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณกรดสูง ดังแสดงผลไว้ในรูปที่ 6 จะเห็นว่าในการผลิตกรดกลูโคนิคโดย Aspergillus sp.สายพันธุ์G153 แอมโมเนียมซัลเฟต 0.4%(น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณกรดสูงสุด

ในกรณีของแหล่งไนโตรเจนนั้นปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสัมพันธ์กับการผลิตกรดกล่าวคือไม่ควรให้มีแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมากนักเพราะจะทำให้จุลินทรีย์มีการเติบโตมากซึ่งเป็นสาเหตุให้ได้ปริมาณกรดกลูโคนิคลดน้อยลง(3,4,5) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เกินกว่า 0.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะมีการผลิตกรดกลูโคนิคลดต่ำลง จากการทดลองของ Takao และ Sasaki (5) และการทดลองของ Yuan-Chi Su และคณะ (43) ซึ่งได้ผลิตกรดกลูโคนิคด้วย Pullularia pullulans No.9190 และ Pullularia pullulans ตามลำดับ พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตก็เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด

สำหรับแหล่งไนโตรเจนอื่นที่ใช้ในการทดลองนี้ให้ปริมาณกรดต่ำกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตทั้งนั้น ในกรณียูเรียนั้นได้มีผู้ทำการทดลองพบว่ายูเรียในปริมาณที่ไม่เหมาะสมจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส (9) ซึ่งเอนไซม์นี้จะมีบทบาทที่สำคัญในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ดังนั้นปริมาณกรดที่ได้จึงต่ำลง ส่วนโซเดียมไนเตรตสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสได้ถ้ามีในปริมาณไม่เหมาะสม (19)

จากการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์ 7 ชนิด พบว่า น้ำตาลกลูโคสให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงที่สุด ที่เป็นเช่นนี้เพราะน้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นสำหรับออกซิเดชั่นด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสไปเป็นกรดกลูโคนิคโดยตรง ดังนั้นน้ำตาลกลูโคสย่อมดีที่สุด (8,18,19,20) สำหรับน้ำตาลซูโครสซึ่งให้ปริมาณกรดกลูโคนิครองลงมาเป็นอันดับ 2 และน้ำตาลมอลโตสที่ให้ปริมาณกรดดังกล่าวเป็นอันดับ 3 นั้น เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของน้ำตาลทั้ง 2 ซึ่งเป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ 2 หน่วยต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) โดยน้ำตาลซูโครสประกอบด้วยกลูโคสและฟรุกโตสต่อกันด้วยพันธะ (1---→ 2) และน้ำตาลมอลโตสซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะ (1---→ 4) แล้ว น่าจะสันนิษฐานว่า

Aspergillus sp.สายพันธุ์G153 อาจมีเอนไซม์สำหรับแยกโมเลกุลของกลูโคสออกมาใช้เป็นสารตั้งต้นได้ การที่ปริมาณกรดกลูโคนิคจากน้ำตาลซูโครส 25-40% และจากน้ำตาลมอลโตส 20-40% ขึ้นๆลงๆ สันนิษฐานว่ามีฟรุกโตสและกลูโคสเหลือมากตามลำดับ จึงอาจทำให้กิจกรรมการผลิตกรดกลูโคนิคไม่เป็นไปตามปกติ ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนจึงเป็นสิ่งที่สำคัญที่ต้องคำนึงถึงอย่างมาก

จากการหาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุดโดยเปรียบเทียบจากน้ำตาล 3 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลมอลโตส พบว่า น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ปริมาณกรดสูงสุดถึง 74.08% (น้ำหนักต่อน้ำหนักกลูโคสที่ใช้) ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับที่มีรายงานไว้ว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดกลูโคนิคจาก Aspergillus niger คือ 110-250 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (4) ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่สูงกว่า 30% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ขึ้นไปให้ปริมาณกรดกลูโคนิคลดลง ซึ่งสอดคล้องกับที่ Gastrock และคณะที่ได้รายงานว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเกินกว่า 30 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรจะลดประสิทธิภาพการผลิตกรดลงเมื่อใช้ Aspergillus niger 67 เป็นจุลินทรีย์เพื่อการผลิต ซึ่งเขาได้สันนิษฐานว่าจุลินทรีย์มีกิจกรรมในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิคลดต่ำลง(30) ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับการทดลองของ Yuan-Chi Su และคณะ โดยใช้ Pullularia pullulans ในการผลิตกรด เมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงจนเกินไปอัตราการใช้น้ำตาลและการผลิตกรดกลูโคนิคจะยิ่งลดลงคือที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะได้ปริมาณกรดเป็น 94.3% และมีการใช้น้ำตาล 98.2% แต่เมื่อเพิ่มปริมาณกลูโคสเป็น 30%(น้ำหนักต่อปริมาตร) กลับได้ปริมาณกรดและการใช้น้ำตาลลดลงเหลือ 85.4% และ 85.7% ตามลำดับ (43) แต่อย่างไรก็ตามถ้าเปลี่ยนวิธีการผลิตจากการหมักแบบครั้งเดียวเป็นการผลิตแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) ดังที่กลุ่มบริษัท Fujisawa Pharmaceutical แห่งประเทศญี่ปุ่นสามารถผลิตโซเดียมกลูโคเนตได้ถึง95% เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 35% เป็นแหล่งคาร์บอน (44)

จากการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจนพบว่าอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมให้ปริมาณกรดสูงสุด คือ 125:2 ถ้าอัตราส่วนของแหล่งทั้ง 2 มากเกินไป คือ มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนน้อยปริมาณกรดที่ได้น้อยลงทั้งนี้เนื่องมาจากในอาหารเลี้ยงเชื้อขาดแหล่งไนโตรเจนที่จะช่วยให้เกิดการเติบโตของสายใยให้ได้จำนวนพอเหมาะกับการผลิตกรดกลูโคนิคจากปริมาณน้ำตาลจำนวนนี้ ในทางกลับกันถ้าอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีค่าต่ำ เช่น ที่ 125:5 คือมีแหล่งไนโตรเจนปริมาณสูง การเติบโตของจุลินทรีย์จะสูงขึ้นมากแต่

ปริมาณกรดกลูโคนิคกลับลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์มีการเติบโตมากเกินไป ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนจะถูกใช้ไปเพื่อการเติบโตจึงทำให้มีการผลิตกรดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับที่ Gastrock และคณะ ได้รายงานไว้ว่า ความสามารถในการออกซิไดซ์นี้ไม่ได้เป็นสัดส่วนกับการเติบโตของสายใยที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิต ทั้งนี้ความสามารถในการออกซิไดซ์จะลดลงมากเมื่อมีการเติบโตของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว และน้ำตาลยิ่งมีปริมาณมากการเติบโตของสายใยก็มากด้วย (30) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการจัดอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจนให้เหมาะสมจะเป็นการใช้แหล่งอาหารทั้ง2 เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์อย่างคุ้มค่าที่สุด

จากการเตรียมหัวเชื้อ โดยขั้นแรกเป็นการหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้ Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 สร้างสปอร์มาก เมื่อเปรียบเทียบอาหารแข็ง 3 สูตรคืออาหารแข็งโปเตโตเดกซ์โตรส อาหารแข็งที่มีสูตรเหมือนอาหารสูตรที่2 และอาหารแข็งสูตรที่ 3 ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนสูง พบว่า ได้จำนวนสปอร์จากอาหารทั้ง 3 ชนิดไล่เลี่ยกันคือ $1.5-5.0 \times 10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เมื่อได้ทำการเพาะสปอร์จากอาหารแข็งโปเตโตเดกซ์โตรสลงในอาหารเหลว 3 ชนิดคืออาหารเหลวโปเตโตเดกซ์โตรส อาหารเหลวสูตรที่ 2 และ อาหารเหลวสูตรที่ 4 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อพบว่าสปอร์ในอาหารเหลวโปเตโตเดกซ์โตรส อาหารเหลวสูตรที่4 และอาหารเหลวสูตรที่ 2 งอกได้ครบ 100% ในชั่วโมงที่ 8 9 และ 11 ตามลำดับ แต่เมื่อนำสปอร์ที่งอกแล้วจากอาหารเหลวทั้ง3 ชนิดมาเป็นหัวเชื้อในการผลิตกรดกลูโคนิคกลับพบว่าหัวเชื้อชนิดสปอร์ที่งอกแล้วที่เตรียมในอาหารเหลวสูตรที่ 2 ซึ่งเป็นสูตรเดียวกับที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิคให้ปริมาณกรดสูงกว่าหัวเชื้อจากอาหารเหลวโปเตโตเดกซ์โตรสซึ่งผลการงอกครบ 100% เร็วที่สุดและดีกว่าอาหารเหลวสูตรที่ 4 ด้วย โดยหัวเชื้อจากอาหารสูตรที่ 2 อายุ 16 ชั่วโมงให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงที่สุดใน 5 วัน

การที่หัวเชื้ออายุ 16 ชั่วโมงที่เตรียมจากอาหารเหลวสูตรที่2 ให้ปริมาณกรดสูงอาจเนื่องมาจาก หัวเชื้อชนิดนี้ผลิตจากอาหารสูตรเดียวกับอาหารที่ใช้เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคซึ่งมีแมงกานีสเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย แมงกานีสเป็นธาตุที่ช่วยทำให้ Aspergillus sp. มีการสร้างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสได้มาก (2,4,6) ดังนั้นหัวเชื้อที่ได้จากอาหารสูตรที่ 2 นี้ จึงมีความพร้อมที่จะใช้เพื่อการผลิตกรดดังกล่าวมากกว่าสูตรอื่น

หลังจากนั้นใช้หัวเชื้อชนิดสปอร์และหัวเชื้อชนิดสปอร์ที่งอกแล้ว 16 ชั่วโมงหลังการเพาะสปอร์ในอาหารเหลวสูตรที่ 2 เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยแปรขนาดของหัวเชื้อทั้ง 2 ชนิด พบว่า หัวเชื้อชนิดสปอร์ที่งอกแล้วขนาด $2.5-5.0 \times 10^7$ สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตรให้ปริมาณกรดสูงที่สุดซึ่งสอดคล้องกับที่ Gastrock และคณะที่ได้รายงานว่า สปอร์ของ Aspergillus niger 67 ที่งอกแล้วเป็นหัวเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคที่ดีกว่าการใช้สปอร์ที่ยังไม่ได้งอกเป็นหัวเชื้อ (30)

จากการหาปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิค พบว่าแคลเซียมคาร์บอเนต 24% (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำตาลกลูโคสที่ใช้) ให้ปริมาณกรดสูงสุดและคุ้มค่าที่สุด ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่น้อยหรือมากกว่า24% ต่างก็ให้ปริมาณกรดต่ำลง โดยที่ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ต่ำกว่า 24% ให้ปริมาณใกล้เคียงหรือต่ำกว่าในวันแรกๆ ของการเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 4 วันเป็นต้นไป ปริมาณกรดจะต่ำกว่าเมื่อมีแคลเซียมคาร์บอเนต 24% ลงเรื่อยๆ เมื่อตรวจดูความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่วันที่ 4 เป็นต้นไปของปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ต่ำกว่า 24% มีค่าต่ำ แสดงว่า ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตยังไม่เพียงพอ เมื่อพิจารณาถึงการใช้น้ำตาล พบว่าที่แคลเซียมคาร์บอเนต 16% Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153 ไม่สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างสมบูรณ์แม้จะเลี้ยงเชื้อนานถึง 8 วันนั้น สันนิษฐานได้ว่าเมื่อแคลเซียมคาร์บอเนตไม่เพียงพอปริมาณกรดที่เชื้อผลิตขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงจนจุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมไปอย่างปกติได้ (45) นอกจากนี้การไฮโดรไลซ์กลูโคโนแลคโตนไปเป็นกรดกลูโคนิคจะเกิดขึ้นได้น้อยเมื่อค่าความเป็นกรดด่างต่ำ(33)และกลูโคโนแลคโตนที่สะสมอยู่จะยับยั้งออกซิเดชั่นของน้ำตาล (46) ดังนั้นปริมาณกรดจึงต่ำและมีน้ำตาลกลูโคสเหลือมาก

ปริมาณกรดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตมากกว่า 24% นั้นต่ำในวันแรกๆของการเลี้ยงเชื้อคือวันที่ 3 ตั้งแต่วันที่ 4 เป็นต้นไปให้ปริมาณใกล้เคียงหรือต่ำกว่า 24% เล็กน้อย ได้มีรายงานว่า ถ้าเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคมากเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์ลดกิจกรรมหรือสายใยอาจตายได้(6) ซึ่งสามารถนำมาอธิบายถึงผลผลิตกรดดังกล่าวในวันแรก ๆ ของการเลี้ยงเชื้อเมื่อใส่แคลเซียมคาร์บอเนตมากกว่า 24% ได้ว่า จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับผลกระทบจากการที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตมากในช่วงแรกจึงทำให้ปริมาณต่ำแต่ต่อมาจุลินทรีย์อาจจะค่อยๆ ปรับตัว และแคลเซียมคาร์บอเนตก็ถูกใช้ไปเพื่อเป็นตัวสะเทินต่อกรดที่สร้างด้วยจึงทำให้ปริมาณกรดค่อยๆสูงขึ้นในช่วงหลังของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อตรวจดูค่าความเป็นกรดด่างของ

อาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าอยู่ในช่วง 5-6 ซึ่งเป็นช่วงที่ยังเหมาะสมต่อการดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ (45) ย่อมแสดงว่าแคลเซียมคาร์บอเนตที่มากกว่า 24% เพียงพอต่อการสะเทินกรดแต่ไม่คุ้มค่าที่จะใช้เพราะสิ้นเปลือง ดังนั้นแคลเซียมคาร์บอเนตมีผลโดยตรงต่อกรดกลูโคนิคโดยจะควบคุมสภาวะความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้จุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีการผลิตเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสได้ดีในสภาพความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม (47) Rogalski และคณะได้กล่าวว่าการสร้างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสของ Aspergillus sp.G13 นั้นจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ไม่มากจนเกินไป (46)

จากการหาชนิดของขวดทดลองและความเร็วของเครื่องเขย่าที่ให้ปริมาณกรดสูงและเหมาะสมต่อการเลือกใช้ พบว่าขวดแก้วทรงกรวยชนิดที่มีก้นบุบให้ปริมาณกรดสูงสุดที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีและเหมาะสมที่สุดต่อการใช้ผลิตกรดในการทดลองนี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ชนิดของภาชนะที่ได้รับการออกแบบให้มีอากาศละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มาก คือ ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบจะทำให้ปริมาณกรดสูงและใช้เวลาในการผลิตสั้น สำหรับขวดแก้วทรงกรวยธรรมดานั้นต้องใช้ความเร็วของเครื่องเขย่ามากขึ้น ในกรณีขวดแก้วทรงกรวยที่ใส่ขดลวดอยู่ภายในนั้นให้ปริมาณกรดไล่เลี่ยกับขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบแต่มีข้อเสียที่มีสายใยไปเกาะติดขดลวดมากทำให้แยกเอาเส้นใยออกยากและทำความสะอาดยากจึงไม่เหมาะสมต่อการใช้งานในการทดลองนี้ Ghosh และ Ghose ได้กล่าวว่าออกซิเจนในอากาศจะละลายเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อในรูปกลุ่มของฟองอากาศ จากนั้นออกซิเจนจะถูกลำเลียงไปยังเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องด้วยขบวนการแพร่ของโมเลกุล (molecular diffusion) (48) จากการทดลองนี้พบว่าเมื่อใช้ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบในการเขย่าจะเกิดฟองอากาศขึ้นในอาหารมากกว่าในขวดแก้วทรงกรวยธรรมดา จึงเป็นการเพิ่มออกซิเจนให้กับอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากกว่าด้วยปริมาณกรดจึงสูง การเพิ่มความเร็วของเครื่องเขย่ามากขึ้นโดยที่ไม่มีการเติมหรืออัดอากาศเข้าไปด้วย อัตราการนำเอาออกซิเจนไปใช้ก็ยังคงที่ซึ่งในสภาวะเช่นนี้จุลินทรีย์จะใช้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น(48) ซึ่งหมายความว่าถ้าสามารถทำให้มีออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อมากโดยไม่มีการอัดอากาศก็จะทำให้จุลินทรีย์นำออกซิเจนไปใช้ได้มากด้วย ดังนั้นการใช้ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบซึ่งได้ออกแบบให้มีการเกิดฟองอากาศขึ้นมากในการเขย่าย่อมทำให้จุลินทรีย์ได้ใช้ออกซิเจนมากกว่าขวดแก้วทรงกรวยธรรมดา

จากการหาอุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 เพื่อให้ได้ปริมาณกรดสูงสุด พบว่า Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 ให้ปริมาณกรดกลูโคนิคได้สูงสุดในอุณหภูมิ 2 ช่วง คือ 25 องศาเซลเซียสเลี้ยงเชื้อนาน 6 วัน และ 33 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน แต่เมื่อคำนึงถึงความคุ้มค่า การสิ้นเปลืองพลังงานและเวลาแล้ว อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด Yuan-Chi Su และคณะ พบว่า เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจาก Pullularia pullulans ทำงานได้ดีที่สุดที่ 25 องศาเซลเซียส (43) O'Malley และ Weaver ได้รายงานว่าอุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสของ Aspergillus niger ทำงานดีที่สุด คือ อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส (49) นอกจากนี้มีรายงานอีกว่า เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจาก Aspergillus niger ทำงานได้ดีที่สุดที่ 35-50 องศาเซลเซียส (9)

การที่จะได้ผลผลิตสูงหรือต่ำย่อมขึ้นกับกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสโดยตรง เนื่องจากการเกิดกรดกลูโคนิคเป็นการเติมออกซิเจนให้กับโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสโดยมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (1,4,6,16) ดังนั้นการจัดอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมย่อมจะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดี ปริมาณกรดก็จะสูงด้วย ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดหรือแต่ละสายพันธุ์ย่อมแตกต่างกัน

จากการตรวจการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพภายในขวดทดลองในระหว่างการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคในระยะ 8 วันของการเลี้ยงเชื้อพบว่า กรดจะถูกสร้างขึ้นควบคู่ไปกับการใช้น้ำตาลและการเติบโต ปริมาณกรดสูงสุดเท่ากับ 94.08%(น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำตาลกลูโคสที่ใช้) ในวันที่ 5 เมื่อตรวจดูปริมาณกรดกับการเติบโต พบว่ากรดถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่มีการเติบโตสูง (log phase) ซึ่งก็เป็นไปตามที่ Miura และคณะ ได้รายงานว่า เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะมีความสามารถในการทำงานสูงสุดเมื่อมีการเติบโตอยู่ในช่วงต้นๆของ log phase (50) และเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างในช่วง 8 วันของการเลี้ยงเชื้อพบว่า อยู่ในช่วง 5-6 ซึ่งเท่ากับยืนยันว่าปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 24 % (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น) นั้นเพียงพอต่อการรักษาสภาพความเป็นกรดด่างของระบบได้ และสำหรับการเติบโตของจุลินทรีย์นั้น พบว่า ตั้งแต่วันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อมีการเติบโตเพิ่มสูงมากทั้งๆที่น้ำตาลกลูโคสถูกใช้ไปเกือบ 100% แล้วและปริมาณกรดก็ลดลงทันที ปรากฏการณ์เช่นนี้คาดว่าจุลินทรีย์ใช้แหล่งคาร์บอนอื่นเพื่อการเติบโตแทนน้ำตาลกลูโคสได้ ซึ่งน่าจะเป็นแคลเซียมกลูโคเนตอันเป็นผลิตผลที่ได้จากการทดลองนี้ จึงเป็นเหตุให้ตรวจพบปริมาณกรดลดลงในช่วงดังกล่าวด้วย จากผลการทดลองตรวจการเติบโตของ Aspergillus sp.สายพันธุ์

G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว พบว่า จุลินทรีย์นี้เติบโตได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้การทดลองดังกล่าวยืนยันได้ว่า การเติบโตที่เพิ่มขึ้นและกรดที่ลดลงนั้นเป็นเพราะ Aspergillus sp.สายพันธุ์G153 นำแคลเซียมกลูโคเนตมาใช้เพื่อการเติบโตนั่นเอง

จากการย่อยสลายข้าวเหนียวด้วย Rhizopus sp. สายพันธุ์ที่มีเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสูง นาน 48-52 ชั่วโมง เมื่อสกัดน้ำตาลออกมา พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงถึง 14.20 กรัมต่อน้ำที่ใช้สกัด 100 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถใช้น้ำหมักนี้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ได้

เมื่อเลี้ยงเชื้อ Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153 ในน้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าว โดยจัดให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 25%(น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า จุลินทรีย์นี้สามารถใช้น้ำตาลจากการหมักข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตกรดได้ แต่ให้ปริมาณต่ำกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ประมาณ 50% น่าจะสันนิษฐานได้ว่าน้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวอาจมีสารอื่นๆซึ่งเป็นผลผลิตร่วมจากการหมักข้าวโดย Rhizopus sp. ซึ่งสารปนเปื้อนดังกล่าวอาจมีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดย Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153 ก็ได้ และเมื่อเปรียบเทียบการเติบโตของ Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153 จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์และน้ำตาลจากการหมักข้าวพบว่า น้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวให้การเติบโตสูงกว่าน้ำตาลกลูโคสประมาณ 3-5 เท่า ในช่วง 8 วันของการเลี้ยงเชื้อ เนื่องมาจากน้ำหมักข้าวมิได้ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว ดังนั้นจุลินทรีย์จึงมีแหล่งคาร์บอนเพื่อการเติบโตเหลือเฟือ นอกจากนี้ยังมีโปรตีน วิตามิน ซึ่ง Aspergillus sp.สายพันธุ์G153 สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งของสารที่มีผลต่อการเติบโต(growth factor) ตามลำดับเพื่อการเติบโตได้อีกด้วย และเมื่อการเติบโตสูงก็อาจจะเป็นสาเหตุให้จุลินทรีย์ต้องนำน้ำตาลกลูโคสมาใช้เพื่อการดำรงชีวิตมากขึ้น ดังนั้นน้ำตาลกลูโคสที่จะใช้เพื่อการผลิตกรดก็จะน้อยลงไปด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย