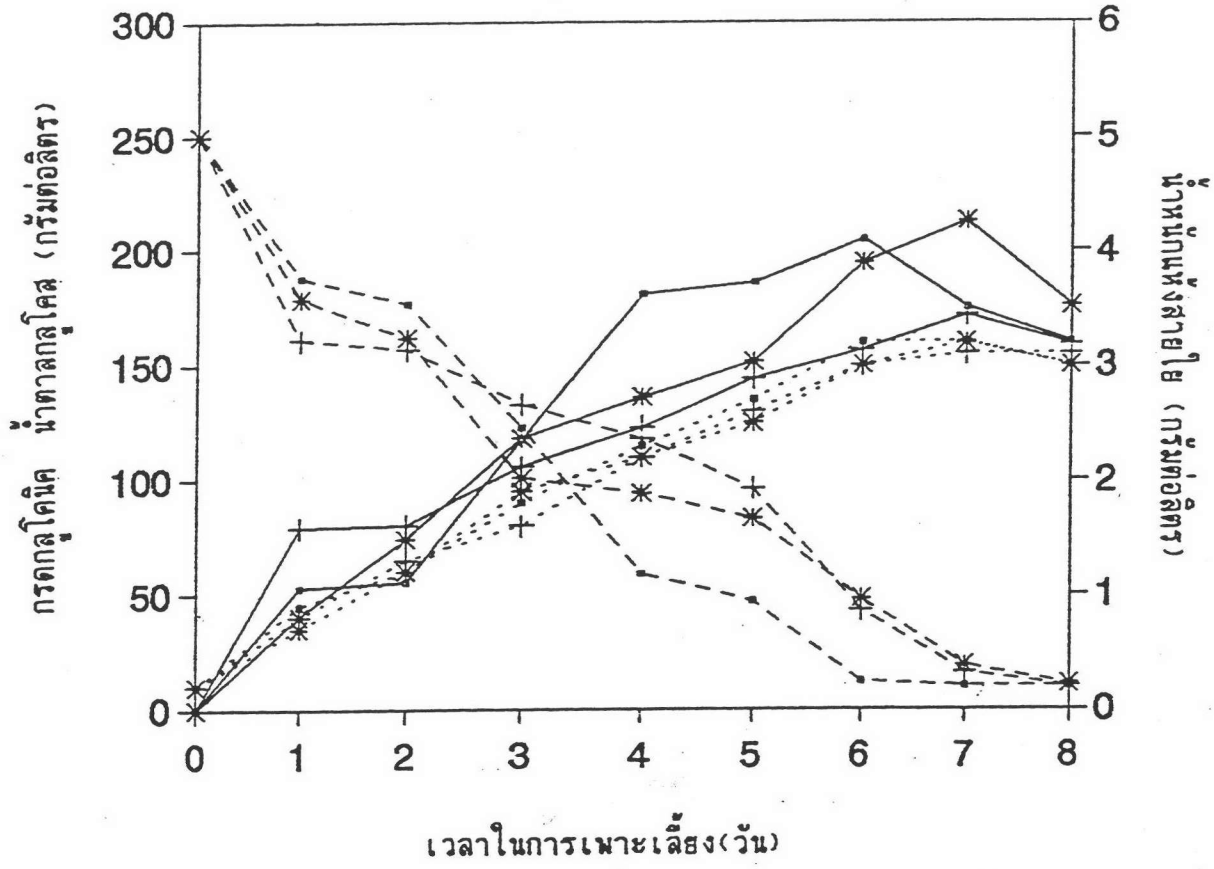
บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลการหาภาวะที่เหมาะสมในการตริงสปอร์และการเพาะเลี้ยงสปอร์ตริง

1.1 ผลการหาชนิดและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมในการตริงสปอร์

เมื่อตริงสปอร์ของ *Aspergillus* sp.G153 1.0-2.5 x 10^5 สปอร์ใน โซเดียมอัลจิเนตของบริษัท นาคาราอิ (Nakarai Co.,Ltd.) และบริษัทฟลูกา (Fluka Chemica) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าสปอร์ที่ตริงในโซเดียมอัลจิเนตของบริษัท นาคาราอิ ความเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) งอกภายในเวลา 3 วัน แต่ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซนต์ สปอร์ตริงไม่สามารถงอกได้ตลอดช่วงเวลา 7 วัน เมื่อนำเม็ดเจลสายใยตริงที่ได้จากโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซนต์ ไปผลิตกรดกลูโคนิคในระดับขวดเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) พบว่าโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุด คือ 212.5 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการผลิต ส่วนโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 และ 2.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ปริมาณกรด 204.6 และ 171.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 และ 7 ของการผลิต ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลกลูโคสระหว่างการผลิตกรดกลูโคนิคจากสายใยที่ตริงในโซเดียมอัลจิเนตทุกความเข้มข้นให้ผลคล้ายกัน คือปริมาณน้ำตาลจะลดลงจาก 250 กรัมต่อลิตรในวันที่เริ่มต้นผลิต เป็น 10-11 กรัมต่อลิตรเมื่อสิ้นสุดการทดลองโดยการใช้น้ำตาลกลูโคสของสายใยที่ตริงในโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2.0 จะรวดเร็วกว่า 2.5 และ 1.5 เปอร์เซนต์ตามลำดับในช่วงเวลา 2 วันแรกของการผลิต แต่ในช่วง 6 วันหลังของการผลิต สายใยที่ตริงในโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสเร็วกว่าสายใยที่ตริงในโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2.5 และ 2.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนการเติบโตของสายใยที่ตริงในโซเดียมอัลจิเนตทั้ง 3 ความเข้มข้นนั้นใกล้เคียงกัน โดยมีการเติบโตสูงสุดในวันที่ 7 ของการผลิต ให้น้ำหนักแห้ง 3.2 3.1 และ 3.2 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้โซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)



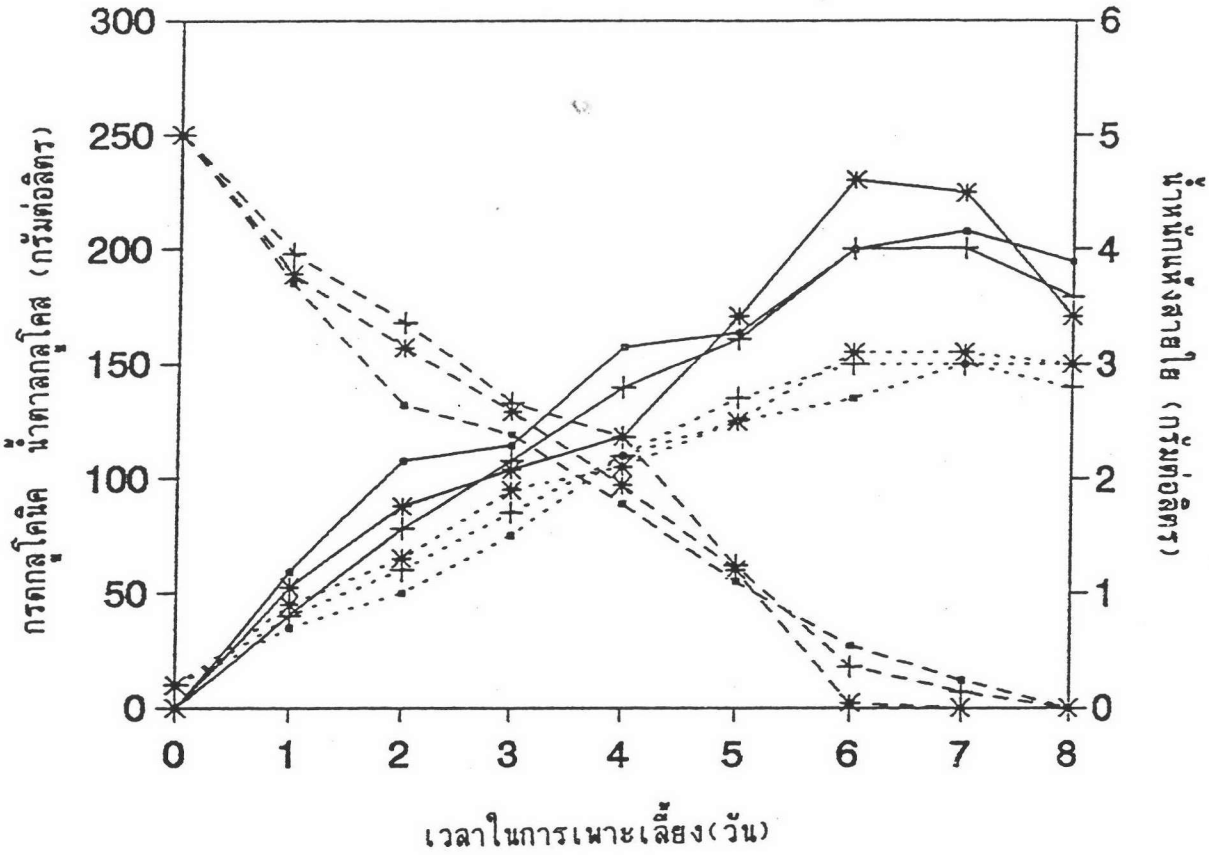
รูปที่ 4 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้โซเดียมอัลจิเนตของบริษัท นาคาราอิ ความเข้มข้นต่าง ๆ กันในการตริงสปอร์ (เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง)

— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค
--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ
····· หมายถึง น้ำหนักแห้งสายใยตริง
—•— หมายถึง โซเดียมอัลจิเนต 1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
—+— หมายถึง โซเดียมอัลจิเนต 2.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
—✳— หมายถึง โซเดียมอัลจิเนต 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองน้ำหนักแห้งของสายใยที่ตริงในโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็น 3.0 3.1 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4)

สำหรับการทดลองใช้โซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา ให้ผลเช่นเดียวกับการใช้โซเดียมอัลจิเนตของบริษัท นาคาราอิ คือที่ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สปอร์ตริงสามารถงอกได้ภายในเวลา 3 วัน แต่ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซนต์ สปอร์ตริงไม่สามารถงอกได้ตลอดช่วงเวลา 7 วัน เมื่อนำเม็ดเจลสายใยตริงที่ได้จากโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มาผลิตกรดกลูโคนิคในระดับขวดเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30 - 33 องศาเซลเซียส) พบว่า สายใยที่ตริงในโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)ให้ปริมาณกรดสูงสุด คือ 230.3 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการผลิต ส่วนความเข้มข้น 1.5 และ 2.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ปริมาณกรด 207.7 และ 200.6 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการผลิต ตามลำดับ การใช้น้ำตาลและการเติบโตของสายใยตริงเมื่อใช้โซเดียมอัลจิเนตทุกความเข้มข้นให้ผลใกล้เคียงกัน คือปริมาณน้ำตาลจะลดลงจาก 250 กรัมต่อลิตรในวันที่เริ่มต้นการผลิตจนหมดในวันสิ้นสุดการทดลอง โดยการใช้น้ำตาลของสายใยที่ตริงในโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์จะเร็วกว่า 2.5 และ 2.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ในช่วง 4 วันแรกของการผลิต แต่ในช่วง 4 วันหลังของการผลิต สายใยที่ตริงในโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ใช้น้ำตาลกลูโคสได้เร็วกว่าสายใยตริงในโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ คือใช้น้ำตาลหมดในวันที่ 6 8 และ 8 ตามลำดับ ส่วนการเติบโตของสายใยตริงจะเพิ่มขึ้นจาก 0.2 กรัมต่อลิตรในวันที่เริ่มต้นการผลิต เป็น 3.0 2.8 และ 3.0 กรัมต่อลิตรในวันที่สิ้นสุดการทดลอง โดยวันที่ 7 ของการผลิตมีการเติบโตสูงสุด คือ 3.0 3.0 และ 3.1 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้โซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ (รูปที่ 5)

เมื่อเปรียบเทียบการงอกของเม็ดเจลสปอร์ตริง และปริมาณกรดกลูโคนิคเมื่อใช้โซเดียมอัลจิเนตทั้ง 2 ชนิดในการตริง พบว่าการงอกของสปอร์ตริงไม่แตกต่างกัน คือที่ความเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สปอร์ตริงสามารถงอกได้ภายใน 3 วัน แต่ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซนต์ สปอร์ตริงไม่งอกตลอดช่วงเวลา 7 วัน ส่วนปริมาณกรดกลูโคนิคจากสายใยที่ตริงในโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก



รูปที่ 5 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้โซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา ความเข้มข้นต่าง ๆ กันในการตริงสปอร์ (เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง)

— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค

--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

····· หมายถึง น้ำหนักแห้งสายใยตริง

—•— หมายถึง โซเดียมอัลจิเนต 1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

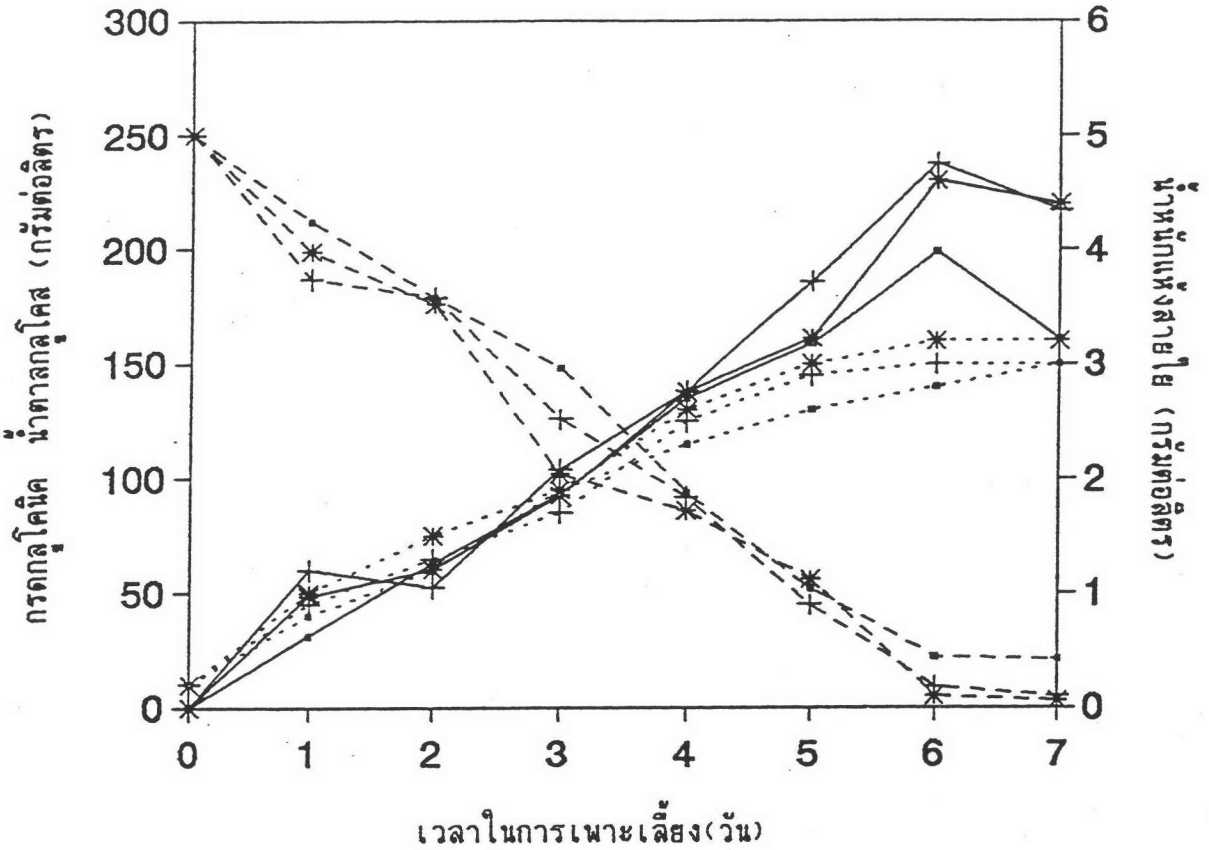
—+— หมายถึง โซเดียมอัลจิเนต 2.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

—✳— หมายถึง โซเดียมอัลจิเนต 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ต่อปริมาตร) จากทั้ง 2 บริษัทสูงกว่าความเข้มข้นอื่น แต่โซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา เข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ปริมาณกรดสูงกว่าของบริษัท นาคาราอิ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน คือให้ปริมาณกรด 230.3 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการผลิต และ 212.5 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการผลิต ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้โซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา เข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นสารพาหะในการตรึงสำหรับการทดลองต่อไป

1.2 ผลการหาความหนาแน่นที่เหมาะสมของสปอร์ในการตรึง

เมื่อตรึงสปอร์ของ *Aspergillus* sp.G153 ในโซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้ความหนาแน่นของสปอร์ต่างกัน คือ $1.7x10^{8}$ $1.7x10^{9}$ และ $1.7x10^{10}$ สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงให้สปอร์ตรึงงอก และนำสายใยตรึงที่ได้มาผลิตกรดกลูโคนิคในระดับขวดเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) พบว่าความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ $1.7x10^{9}$ สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร ให้ปริมาณกรดสูงสุด คือ 237.5 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการผลิต ในขณะที่ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ $1.7x10^{8}$ และ $1.7x10^{10}$ สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร ให้ปริมาณกรด 199.1 และ 230.0 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการผลิต ตามลำดับ สำหรับการใช้น้ำตาล พบว่าสายใยตรึงที่ได้จากการตรึงสปอร์ความหนาแน่นต่างกันมีการใช้น้ำตาลแตกต่างกัน คือที่ความหนาแน่น $1.7x10^{8}$ $1.7x10^{9}$ และ $1.7x10^{10}$ สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร มีน้ำตาลเหลือ 21.0 5.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เมื่อพิจารณาการเติบโตของสายใยตรึง พบว่า ความหนาแน่นสปอร์ $1.7x10^{10}$ สปอร์ มีการเติบโตของสายใยตรึงสูงสุด คือจาก 0.2 กรัมต่อลิตรเป็น 3.2 กรัมต่อลิตรเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ส่วนความหนาแน่นสปอร์ $1.7x10^{8}$ สปอร์มีการเติบโตของสายใยตรึงน้อยที่สุด คือจาก 0.2 กรัมต่อลิตรเป็น 3.0 กรัมต่อลิตร สำหรับความหนาแน่น $1.7x10^{9}$ สปอร์มีการเติบโตจาก 0.2 กรัมต่อลิตรเป็น 3.0 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 6) เมื่อตรวจสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้แขวนลอยเม็ดเจลสปอร์ตรึง พบว่าเมื่อความหนาแน่นของสปอร์เป็น $1.7x10^{8}$ และ $1.7x10^{9}$ สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร ไม่มีสปอร์เหลืออยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ แต่ที่ความหนาแน่น $1.7x10^{10}$ สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร มีสปอร์เหลืออยู่



รูปที่ 6 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 เมื่อตริงสปอร์ความหนาแน่นต่าง ๆ กันในโซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง)

— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค

--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

..... หมายถึง น้ำหนักแห้งสายใยตริง

—•— หมายถึง ความหนาแน่นสปอร์ 1.7×10^{8} สปอร์

—+— หมายถึง ความหนาแน่นสปอร์ 1.7×10^{9} สปอร์

—✳— หมายถึง ความหนาแน่นสปอร์ 1.7×10^{10} สปอร์

$8.3x10^{3}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แสดงว่าความหนาแน่นของสปอร์สูงสุดที่จะตรึงในโซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คือ 8.7×10^{3} สปอร์ และความหนาแน่นที่เหมาะสมสำหรับการตรึงและการผลิตกรดกลูโคนิคภายใต้ภาวะการทดลองนี้ คือการใช้สปอร์ตรึงหนาแน่น 1.7×10^{3} สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร

1.3 ผลการหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึง

เมื่อตรึงสปอร์ *Aspergillus* sp. G153 $1.0-2.5 \times 10^{3}$ สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา เข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงให้งอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์อิสระงอก ซึ่งมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 4.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก) และในสูตรเหมาะสมที่แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 2.0 1.2 0.8 0.4 และ 0.2 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร พบว่าความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 4.0 2.0 และ 1.2 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสปอร์งอก พบสายใยอิสระปริมาณมากตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึง ดังนั้นจึงไม่นำมาทดลองผลิตกรด ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.8 และ 0.4 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สปอร์ตรึงงอกภายในเวลา 3 วัน ไม่พบสายใยอิสระ แต่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร สปอร์ตรึงไม่งอกตลอด 7 วัน เมื่อนำสายใยตรึงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับสปอร์งอกที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.8 และ 0.4 กรัมต่อลิตรไปผลิตกรดกลูโคนิค พบว่าให้ปริมาณกรดสูงสุด 235.8 และ 222.4 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 86.31 และ 81.41 เปอร์เซนต์ เทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นในวันที่ 7 ของการผลิต ตามลำดับ (ตารางที่ 3) การใช้น้ำตาลและการเติบโตของสายใยตรึงเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.8 และ 0.4 กรัมต่อลิตรให้ผลเหมือนกัน คือปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วจาก 250 กรัมต่อลิตรในวันที่เริ่มต้นการทดลองจนไม่มีน้ำตาลเหลือในวันสิ้นสุดการทดลอง โดยเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.4 กรัมต่อลิตรมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วกว่าใน 2 วันแรก และใช้น้ำตาลช้ากว่าในช่วง 4 วันหลัง การเติบโตของสายใยตรึงเพิ่มขึ้นจาก 0.2 กรัมต่อลิตรในวันเริ่มต้นการทดลองเป็น 3.0 และ 2.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ได้ผลผลิตสูงสุด ตามลำดับ (รูปที่ 7)

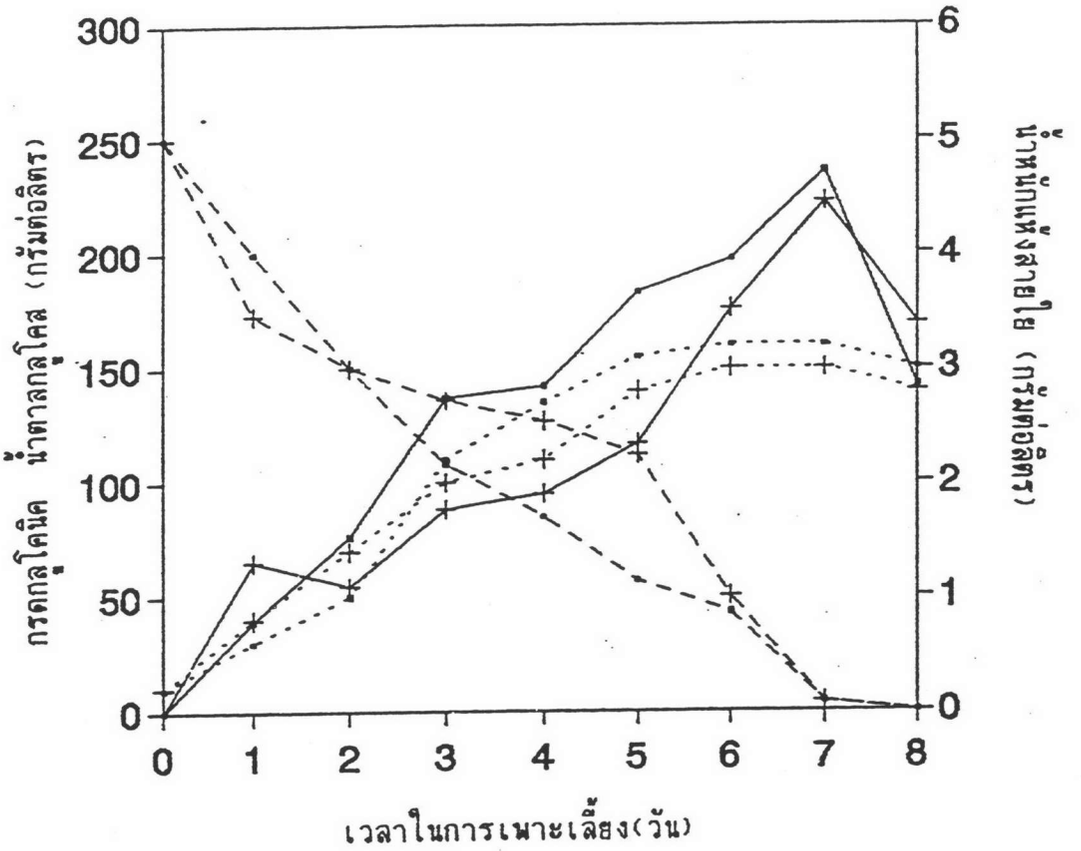
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการพบสายใยอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอกที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และผลผลิตกรดกลูโคนิคจากสายใยตรึง

แอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอก (กรัมต่อลิตร)	เซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอก	วันที่ให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุด (วัน)	ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
4.0	พบ	-	-
2.0	พบ	-	-
1.2	พบ	-	-
0.8	ไม่พบ	7	235.8
0.4	ไม่พบ	7	222.4
0.2	ไม่พบ (สปอร์ไม่งอก)	-	-

- คือ ไม่ได้ทำการทดลอง

1.4 ผลการหาช่วงเวลาเหมาะสมในการเตรียมสายใยตรึงที่มีประสิทธิภาพสูง

เมื่อเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก) บนเครื่องเขย่าแบบโรตารี ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 10-72 ชั่วโมง แล้วนำสายใยตรึงที่ได้ไปผลิตกรดกลูโคนิคในระดับขวดเขย่าที่อุณหภูมิห้อง พบว่าสายใยตรึงอายุ 10 24 30 และ 36 ชั่วโมงให้ปริมาณกรดกลูโคนิคใกล้เคียงกันคือ 179.6 175.4 170.0 และ 175.6 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการผลิต และมีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ 18 17 12 และ 8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แต่เมื่อใช้สายใยตรึงอายุ 42 ชั่วโมงให้ปริมาณกรด



รูปที่ 7 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรงของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตต่าง ๆ กัน (เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง)

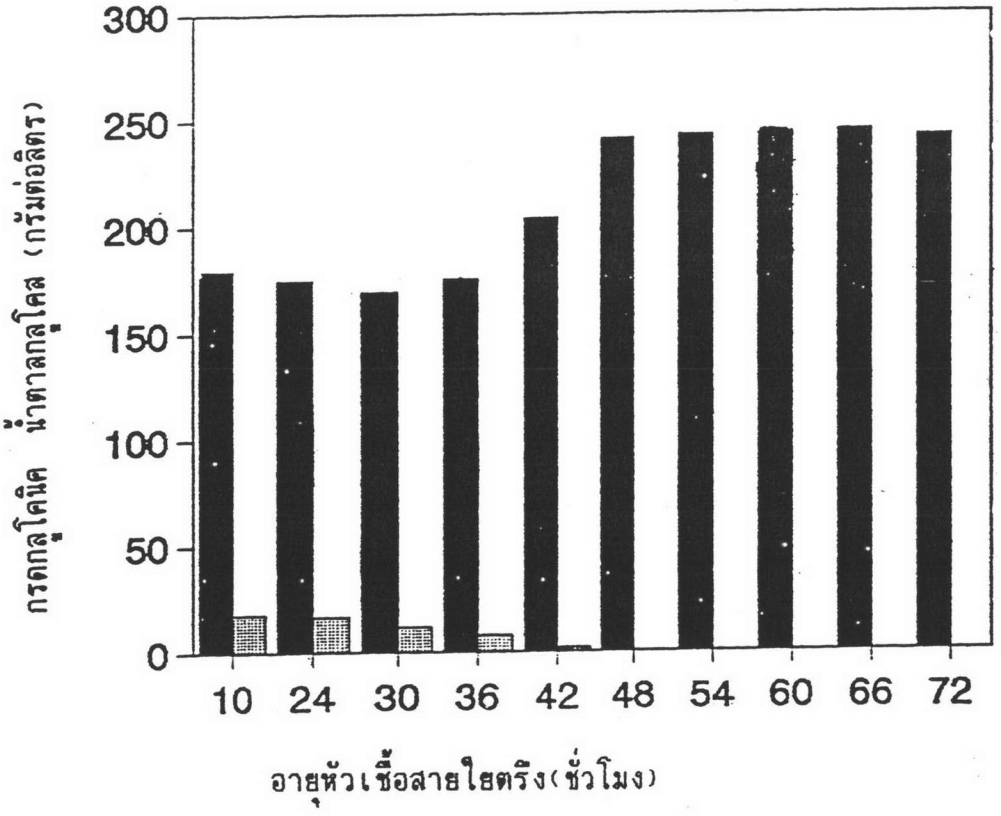
— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค
--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ
····· หมายถึง น้ำหนักแห้งสายใยตรง
—•— หมายถึง ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.8 กรัมต่อลิตร
—+— หมายถึง ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.4 กรัมต่อลิตร

กลูโคนิคสูงขึ้นเป็น 204.4 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการผลิตเช่นเดียวกัน มีปริมาณน้ำตาลเหลือ 2 กรัมต่อลิตรเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ส่วนสายใยตริงอายุ 48 54 60 66 และ 72 ชั่วโมง ให้ผลผลิตสูงขึ้นอีก และใกล้เคียงกันคือ 241.6 243.0 243.8 245.6 และ 242.2 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยสายใยตริงอายุ 66 ชั่วโมงให้ผลผลิตกรดสูงสุด คือ 245.6 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการผลิต ไม่มีน้ำตาลเหลืออยู่เลยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 8) ดังนั้นระยะเวลา 66 ชั่วโมงจึงเหมาะสมสำหรับการเตรียมสายใยตริงที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดสูง จึงเลือกใช้สายใยตริงอายุ 66 ชั่วโมงเป็นหัวเชื้อในการผลิตกรดกลูโคนิค ในการทดลองต่อไป

1.5 ผลการหาขนาดของเม็ดเจลสปอร์ตริงที่เหมาะสม

เมื่อตริงสปอร์ของ *Aspergillus* sp.G153 ความหนาแน่น 1.0-2.5x10^{9} สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันขนาดของเม็ดเจลสปอร์ตริงเป็น 3.5 และ 4.5 มิลลิเมตร (ค่าเฉลี่ยจาก 500 เม็ด) ทำให้สปอร์ตริงงอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตริงงอก (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 66 ชั่วโมง นำสายใยตริงที่ได้มาผลิตกรดกลูโคนิคในระดับขวดเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) พบว่า เม็ดเจลสปอร์ตริงขนาด 3.5 มิลลิเมตรให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงกว่าเม็ดเจลสปอร์ตริงขนาด 4.5 มิลลิเมตร คือให้ปริมาณกรดสูงสุด 246.0 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการผลิต ในขณะที่เม็ดเจลสปอร์ตริงขนาด 4.5 มิลลิเมตรให้ปริมาณกรด 235.6 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการผลิต แต่การใช้น้ำตาลและการเติบโตของสายใยตริงของเม็ดเจลทั้ง 2 ขนาดให้ผลคล้ายคลึงกัน คือปริมาณน้ำตาลจะลดลงจาก 250 กรัมต่อลิตรในวันแรกของการผลิตจนไม่มีน้ำตาลเหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และการเติบโตของสายใยตริงใกล้เคียงกันโดยจะค่อย ๆเพิ่มจาก 0.2 กรัมต่อลิตรเมื่อเริ่มทำการทดลองเป็น 3.0 กรัมต่อลิตรในวันที่สิ้นสุดการทดลอง โดยเม็ดเจลขนาด 3.5 มิลลิเมตรมีการเจริญต่ำกว่าในช่วง 2 วันแรกแต่เจริญสูงกว่าในช่วง 5 วันหลังของการผลิต (รูปที่ 9) จึงใช้เม็ดเจลสปอร์ตริงขนาด 3.5 มิลลิเมตรในการทดลองต่อไป

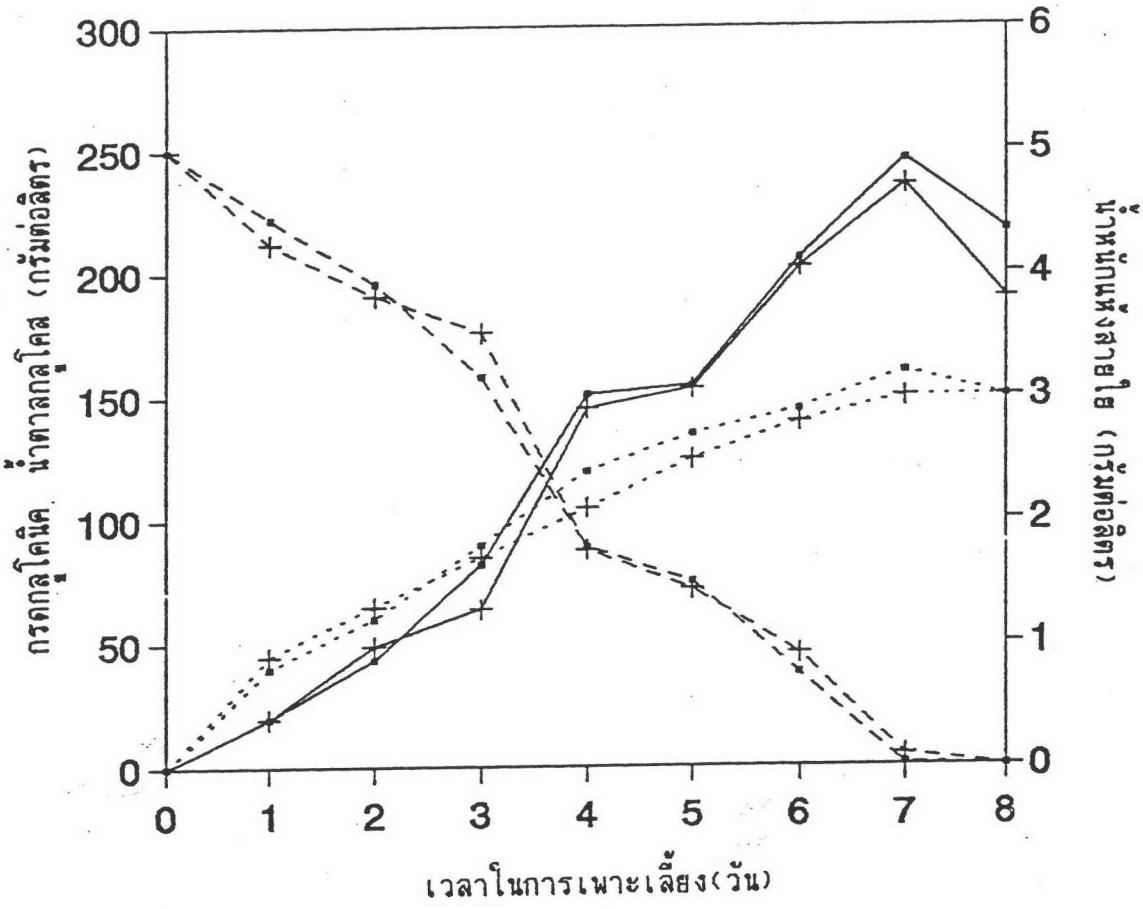
ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตริงสปอร์ และการเพาะเลี้ยงสปอร์ตริงของ *Aspergillus* sp.G153 เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค คือ ใช้ความหนาแน่นสปอร์เท่ากับ



รูปที่ 8 ผลการแปรผันอายุของหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึง *Aspergillus* sp. G153 (เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง)

หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค

หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ



รูปที่ 9 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึง *Aspergillus* sp.G153 เมื่อแปรผันขนาดเม็ดเจลสปอร์ตรึง 2 ขนาดต่าง ๆ กัน (เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง)

— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค
--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ
···· หมายถึง น้ำหนักแห้งสายใยตรึง
—•— หมายถึง เม็ดเจลสายใยตรึงขนาด 3.5 มิลลิเมตร
—+— หมายถึง เม็ดเจลสายใยตรึงขนาด 4.5 มิลลิเมตร

1.0-2.5 x 10^7 สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา เข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ขนาดเม็ดเจลสปอร์ตริงที่เหมาะสมคือ 3.5 มิลลิเมตร และภาวะที่เหมาะสมในการทำให้สปอร์ตริงงอก คือเพาะเลี้ยงเม็ดเจลสปอร์ตริงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตริงงอก (ภาคผนวก ก)เป็นเวลา 66 ชั่วโมงจะได้เม็ดเจลสายใยตริงที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดกลูโคนิค สามารถผลิตกรดได้ 246.0 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการผลิต ปริมาณน้ำตาลลดลงจาก 250 กรัมต่อลิตรเมื่อเริ่มการทดลองจนไม่มีน้ำตาลเหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลอง การเติบโตของสายใยตริงเพิ่มจาก 0.2 กรัมต่อลิตรเมื่อเริ่มทำการทดลองเป็น 3.2 กรัมต่อลิตรเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

2. ผลการหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงในระดับขวดเขย่า

2.1 ผลการหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค

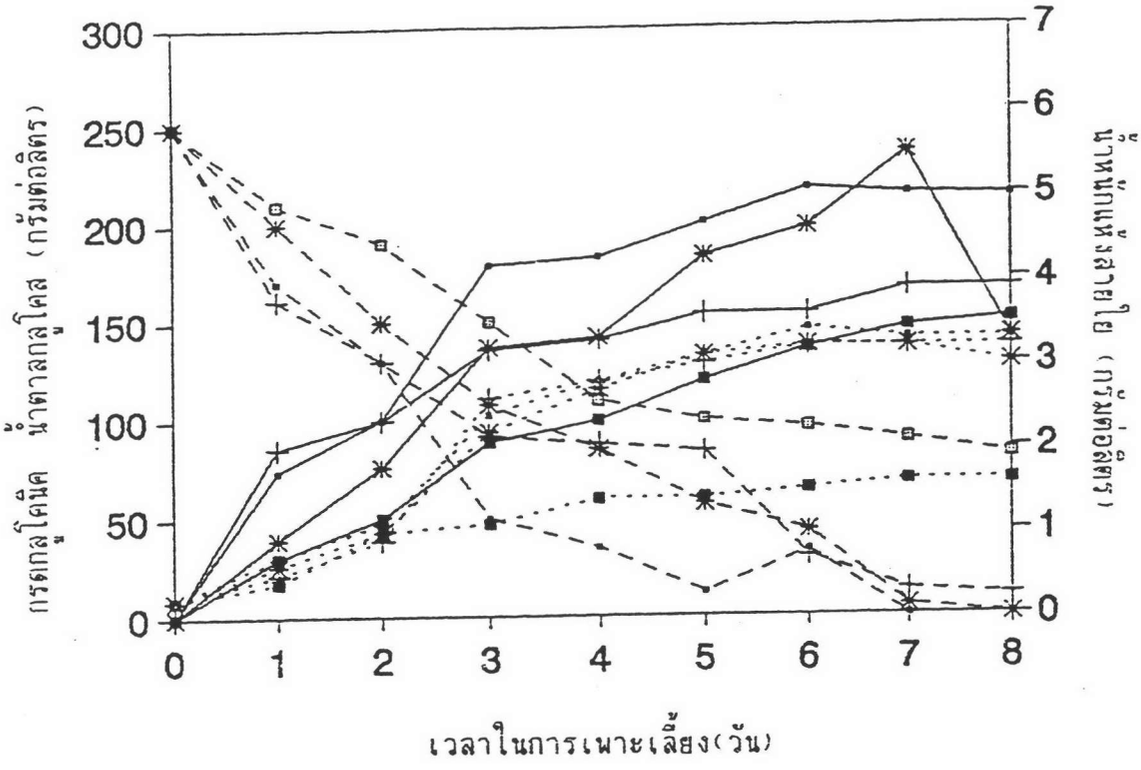
เมื่อผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงของ *Aspergillus* sp.G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยอิสระ(ภาคผนวก ก) ซึ่งมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 4.0 กรัมต่อลิตร และในสูตรเหมาะสมที่แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 2.0 1.2 0.8 0.4 0.2 และ 0 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร พบว่าไม่สามารถใช้อาหารสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยอิสระ ซึ่งมีแอมโมเนียมซัลเฟต 4.0 กรัมต่อลิตร และอาหารสูตรเหมาะสมที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 และ 1.2 กรัมต่อลิตรในการผลิตได้ เนื่องจากพบเซลล์อิสระมากตั้งแต่วันที่ 2 ของการผลิต (ตารางที่ 4) สำหรับอาหารสูตรที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดสูงสุด 235.8 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการผลิต การใช้น้ำตาลจะลดลงจาก 250 กรัมต่อลิตรเมื่อเริ่มทำการทดลองจนไม่มีน้ำตาลเหลือในวันสิ้นสุดการทดลอง น้ำหนักแห้งของสายใยตริงเพิ่มขึ้นจาก 0.2 กรัมต่อลิตรในวันแรกของการทดลองเป็น 3.0 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง และไม่พบเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.8 และ 0.4 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดสูงสุดเพียง 217.0 และ 167.2 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 และ 7 ของการผลิตตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลในวันสุดท้ายของการทดลองเป็น 0 และ 10 กรัมต่อลิตร น้ำหนักแห้งของสายใยตริงในวันสุดท้ายของการทดลองเป็น 3.3 และ 3.2 กรัมต่อลิตร

ตามลำดับ และพบเซลล์อิสระเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 3 ของการผลิต เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.8 และ 0.4 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 10) ส่วนสูตรที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนไม่สามารถใช้น้ำตาลได้หมด การเติบโตของสายใยตริงเกือบไม่เพิ่มขึ้น ผลผลิตกรดช้าแม้ถึงวันที่ 8 ของการผลิต ปริมาณกรดก็ยังต่ำมาก ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร สูตรที่ 1(ภาคผนวก ก) ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการพบสายใยอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และผลผลิตกรดกลูโคนิคจากสายใยตริง

แอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค (กรัมต่อลิตร)	เซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค	วันที่ให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุด (วัน)	ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
4.0	พบ	-	-
2.0	พบ	-	-
1.2	พบ	-	-
0.8	พบเล็กน้อย	6	217.0
0.4	พบเล็กน้อย	7	167.2
0.2	ไม่พบ	7	235.8
0	ไม่พบ	ตรวจไม่ได้ในวันที่ 8	ตรวจไม่ได้ในวันที่ 8

- คือ ไม่ได้ทำการทดลอง



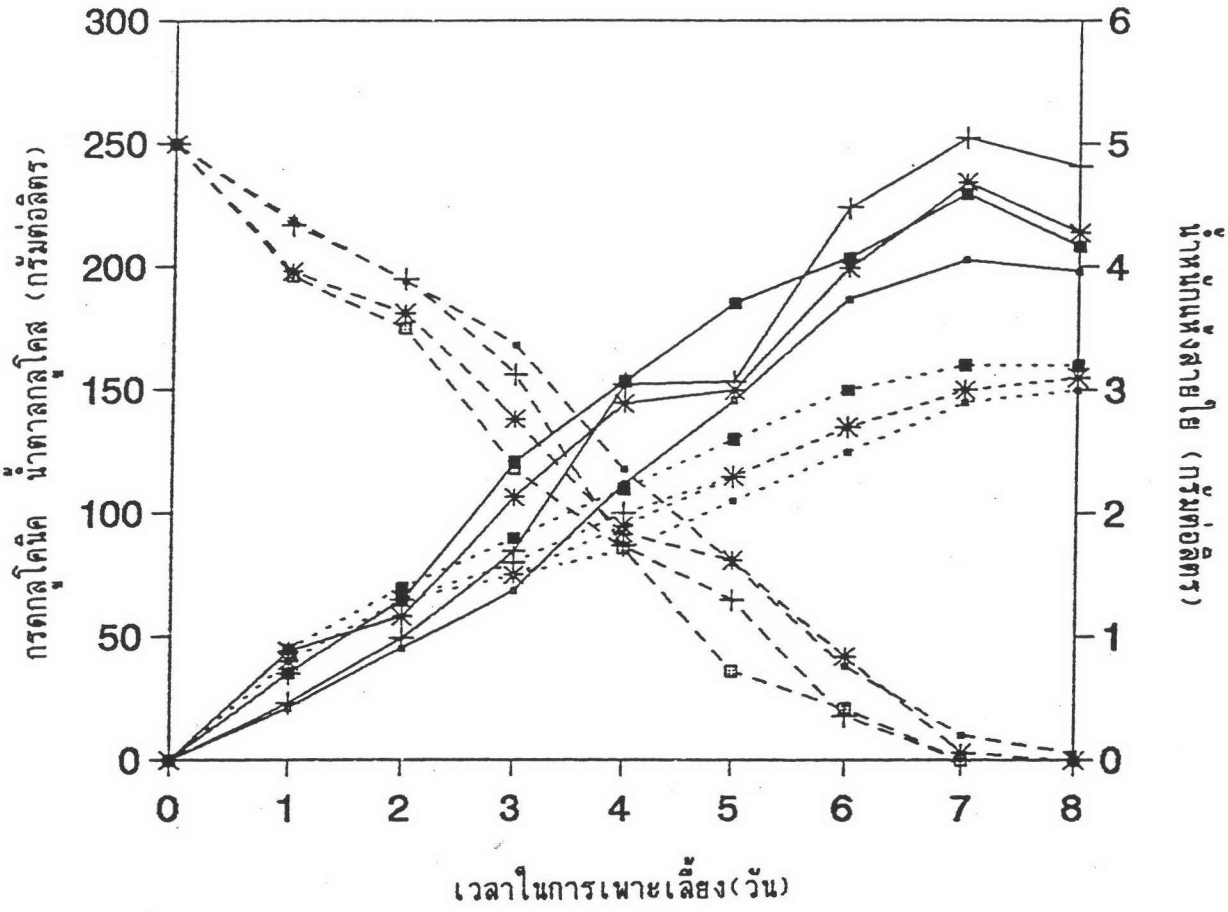
รูปที่ 10 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 เมื่อแปรผันความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงต่างกัน (เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง)

—— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค
--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ
···· หมายถึง น้ำหนักแห้งสายใยตริง
—•— หมายถึง ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.8 กรัมต่อลิตร
—+— หมายถึง ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.4 กรัมต่อลิตร
—✳— หมายถึง ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร
—•— หมายถึง ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0 กรัมต่อลิตร

2.2 ผลการหาความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริงที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิค

เมื่อผลิตกรดกลูโคนิคระดับขวดเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) ซึ่งได้จากผลการทดลองข้อ 2.1 โดยใช้สายใยตริง 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเมื่อใช้เม็ดเจลสายใยตริง 40 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ให้ปริมาณกรดสูงสุด คือ 252.4 กรัมต่อลิตร (92.4 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น) ในวันที่ 7 ของการผลิต ปริมาณน้ำตาลลดลงจาก 250 กรัมต่อลิตรเป็น 0 กรัมต่อลิตรในวันที่ให้ผลผลิตสูงสุด และการเติบโตของสายใยตริงเพิ่มขึ้นจาก 0.2 กรัมต่อลิตรเป็น 3.1 กรัมต่อลิตรในวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนเมื่อใช้เม็ดเจลสายใยตริง 20 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรด 202.9 234.4 และ 229.6 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการผลิต และปริมาณน้ำตาลลดลงจาก 250 กรัมต่อลิตรเหลือ 10 3 และ 0 กรัมต่อลิตร ในวันที่ให้ผลผลิตสูงสุด ตามลำดับ โดยเม็ดเจลสายใยตริง 20 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลในแต่ละวันช้าที่สุด และเม็ดเจลสายใยตริง 80 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลในแต่ละวันมากที่สุด สำหรับการเติบโตของสายใยตริงเมื่อใช้เม็ดเจลสายใยตริง 20 กรัมต่อลิตร มีการเจริญน้อยสุดคือ เพิ่มจาก 0.2 กรัมต่อลิตรในวันแรกของการทดลองเป็น 3.0 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เม็ดเจลสายใยตริง 40 และ 60 กรัมต่อลิตร การเจริญของสายใยตริงใกล้เคียงกัน คือเพิ่มจาก 0.2 กรัมต่อลิตรในวันแรกของการทดลองเป็น 3.1 กรัมต่อลิตรในวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนเม็ดเจลสายใยตริง 80 กรัมต่อลิตรมีการเจริญของสายใยตริงสูงสุด คือ 3.2 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดของการทดลอง (รูปที่ 11) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริงเป็น 40 กรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุดและให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงสุด จึงใช้สำหรับการผลิตกรดในการทดลองต่อไป

ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคในระดับขวดเขย่าโดยสายใยตริงของ *Aspergillus* sp.G153 คือ ใช้เม็ดเจลสปอร์ตริงขนาด 3.5 มิลลิเมตร ซึ่งเตรียมจากการใช้สปอร์หนาแน่น $1.0-2.5\times10^{9}$ สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเม็ดเจลสปอร์ตริงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อทำให้สปอร์ตริงงอก (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 66 ชั่วโมง ใช้เม็ดเจลสายใยตริง 40 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) 1 ลิตรซึ่งมีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัม ให้ปริมาณกรด 252.4 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 11 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 เมื่อแปรผันปริมาณเม็ดเจลสายใยตริงที่ใช้ในการผลิตกรดต่างกัน (เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง)

—— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค
--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ
···· หมายถึง น้ำหนักแห้งสายใยตริง
—•— หมายถึง เม็ดเจลสายใยตริง 20 กรัมต่อลิตร
—+— หมายถึง เม็ดเจลสายใยตริง 40 กรัมต่อลิตร
—✳— หมายถึง เม็ดเจลสายใยตริง 60 กรัมต่อลิตร
—■— หมายถึง เม็ดเจลสายใยตริง 80 กรัมต่อลิตร

ในวันที่ 7 ของการผลิต การใช้น้ำตาลและน้ำหนักแห้งของสายใยตรึงเมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็น 0 และ 3.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3. ผลการหาภาวะเหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนด้วยสายใยตรึงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column)

3.1 ผลการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค

เมื่อนำสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp.G153 มาผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึง สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 250 200 150 และ 100 กรัมต่อลิตร ความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตรึง 8.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) การให้อากาศ 8 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 250 และ 200กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตจำนวนมากตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 ของการผลิตและมากขึ้นจนการให้อากาศไม่ทั่วถึง จึงไม่สามารถดำเนินการผลิตต่อไปได้เช่นเดียวกับการทดลองใช้น้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตเกิดช้าและน้อยกว่า คือเริ่มเกิดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และพบตะกอนจำนวนมาก ทำให้การให้อากาศไม่ทั่วถึงในชั่วโมงที่ 42 จึงหยุดการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 แต่เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 กรัมต่อลิตร พบว่า ให้ปริมาณกรดสูงสุด 96 กรัมต่อลิตร (87.80 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น)ในชั่วโมงที่ 54 ของการผลิต สารละลายในคอลัมน์แก้วมีลักษณะขาวขุ่นข้นแต่ไม่พบตะกอนแข็งโดยเริ่มข้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 42 การทดลองดำเนินไปได้ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ชั่วโมงที่ 60) ไม่มีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ (รูปที่ 12)

จะเห็นได้ว่า น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถใช้ผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนผลิตในคอลัมน์แก้วที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 400 มิลลิลิตร และให้ปริมาณกรดสูงถึง 96 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 5 ปริมาณกรดกลูโคนิคและเวลาที่พบตะกอนข้นแข็ง เมื่อผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp.G153 เมื่อแปรความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสต่างกัน

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ชั่วโมงที่เกิดตะกอน	ปริมาณกรดสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
250	10	-*
200	10	-*
150	24	-**
100	42	96

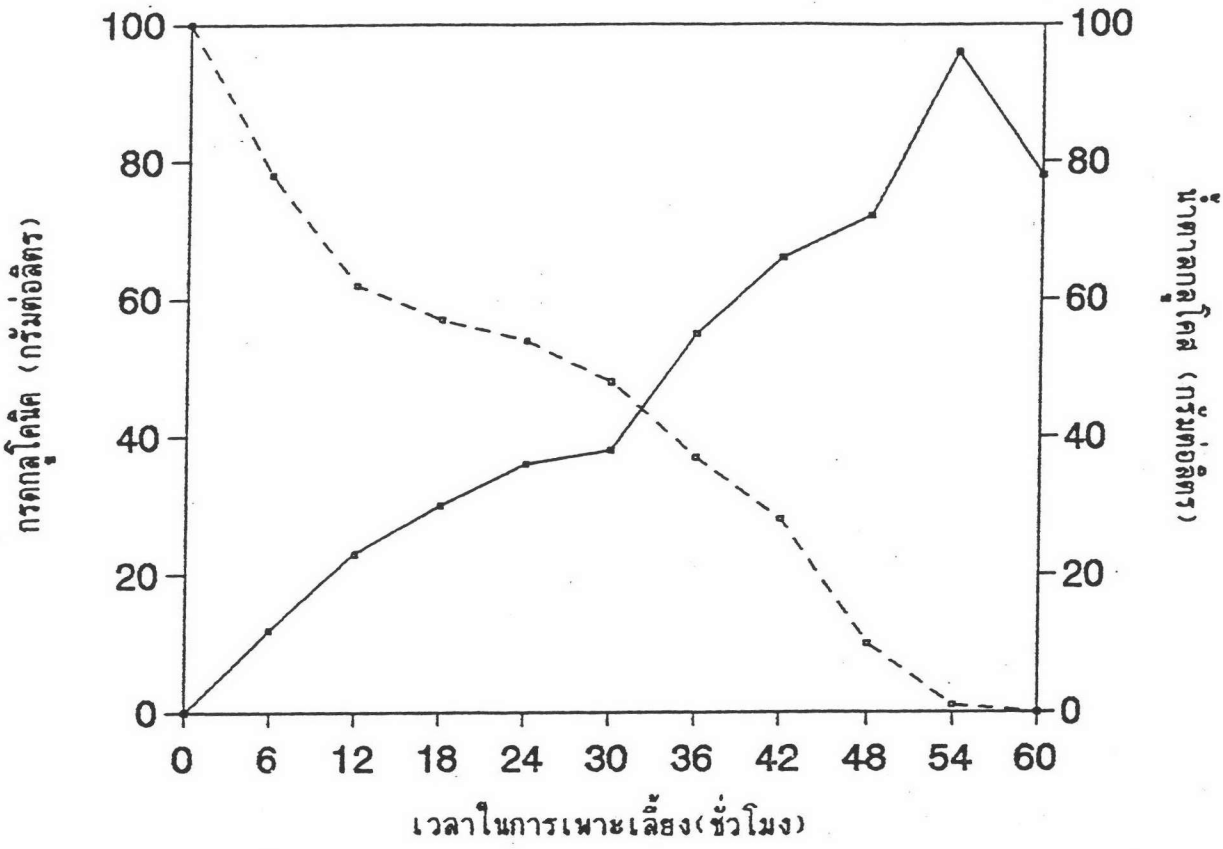
* หมายถึง หยุดทำการทดลองตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18

** หมายถึง หยุดทำการทดลองตั้งแต่ชั่วโมงที่ 42

\- หมายถึง ไม่ทราบปริมาณกรดสูงสุด

3.2 ผลการแปรผันอัตราการให้อากาศและผลิตกรดกลูโคนิค

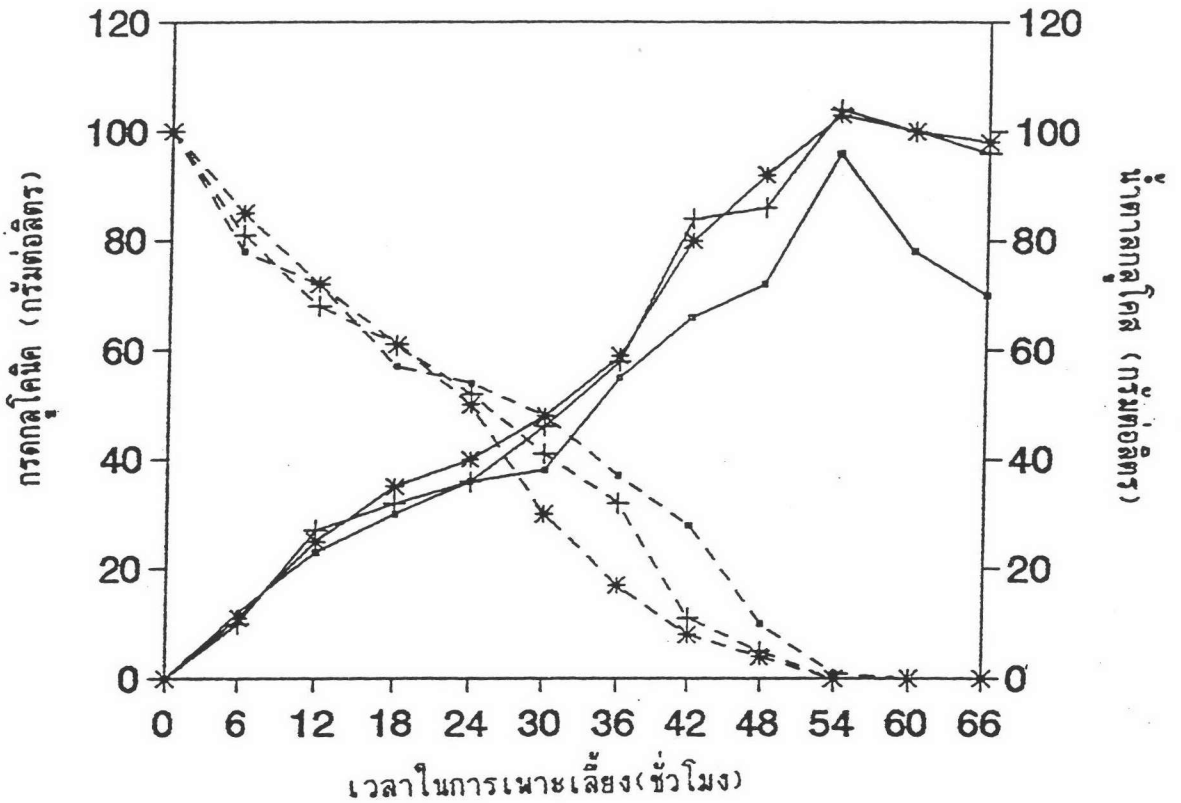
เมื่อผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้ว ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 400 มิลลิลิตร โดยใช้ความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตรึง 8 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร แปรผันอัตราการให้อากาศ 8 10 และ 12 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที พบว่าการให้อากาศ 8 ลิตรต่อลิตรเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้ผลผลิตกรดในแต่ละวันและผลผลิตสูงสุดต่ำกว่าการให้อากาศ 10 และ 12 ลิตร คือให้ปริมาณกรด 96 กรัมต่อลิตร (คิดเป็น 87.75 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น) ในเวลา 54 ชั่วโมง ส่วนการให้อากาศ 10 และ 12 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้ปริมาณกรดในแต่ละชั่วโมงและปริมาณกรดสูงสุดไล่เลี่ยกันคือ 104 และ 103 กรัมต่อลิตร (คิดเป็น 95.17 และ 94.25 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น) ในเวลา 54 ชั่วโมง ตามลำดับ การใช้น้ำตาลกลูโคสใน 24 ชั่วโมงแรกของการผลิตใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นการใช้น้ำตาลจะ



รูปที่ 12 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายไยตริงระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราการให้อากาศ 8 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที หัวเชื้อสายไยตริง 80 กรัมต่อลิตร

— หมายถึง กรดกลูโคนิค

--- หมายถึง น้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 13 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายไฮตริงระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศต่าง ๆ กัน

— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค

--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

—•— หมายถึง อัตราการให้อากาศ 8 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

—+— หมายถึง อัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

—*— หมายถึง อัตราการให้อากาศ 12 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

เร็วขึ้นเมื่อให้อากาศมากขึ้น กล่าวคือเมื่อให้อากาศ 12 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที น้ำตาลกลูโคสจะลดลงอย่างรวดเร็วกว่าการให้อากาศ 10 และ 8 ลิตร ตามลำดับ และหมดในชั่วโมงที่ 54 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่ให้ปริมาณกรดสูงสุด (รูปที่ 13) แต่เมื่อให้อากาศ 12 ลิตรเลี้ยงเชื้อต่อนาที พบว่าสารละลายในคอลัมน์แก้วกระเด็นเปียกจุกสำลี ทำให้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในคอลัมน์แก้วเปลี่ยนไป ดังนั้นอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม คือ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

3.3 ผลการแปรผันความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริงที่ใช้ผลิตกรดกลูโคนิค เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อทำการผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเป็น 100 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริงเป็น 8 และ 20 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าความหนาแน่นของเม็ดเจล 8 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุด 104 กรัมต่อลิตร (95.17 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับกลูโคสตั้งต้น) ในเวลา 54 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับที่น้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด พบตะกอนขาวขุ่นจำนวนมากในระบบแต่การผลิตยังดำเนินต่อไปได้ แต่เมื่อเพิ่มความหนาแน่นของเม็ดเจลเป็น 20 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้สูงและรวดเร็วกว่าเช่นเดียวกับการใช้น้ำตาล ดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 14 แต่เกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตข้นมากตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 ทำให้การให้อากาศไม่ทั่วถึง ผลจากการทดลองอาจคลาดเคลื่อนจึงหยุดการทดลอง จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มขนาดของหัวเชื้อจะให้ผลผลิตเร็วขึ้น แต่การใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนไม่เหมาะสมสำหรับการทดลองเพิ่มขนาดหัวเชื้อ เนื่องจากตะกอนที่เกิดขึ้นรบกวนการผลิตทำให้ไม่สามารถให้อากาศได้อย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นการทดลองต่อไปจะลดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 50 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 6 ปริมาณกรดกลูโคนิคและเวลาที่พบตะกอนข้นเมื่อแปรผันความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริง *Aspergillus* sp.G153 ที่ใช้ในการผลิต

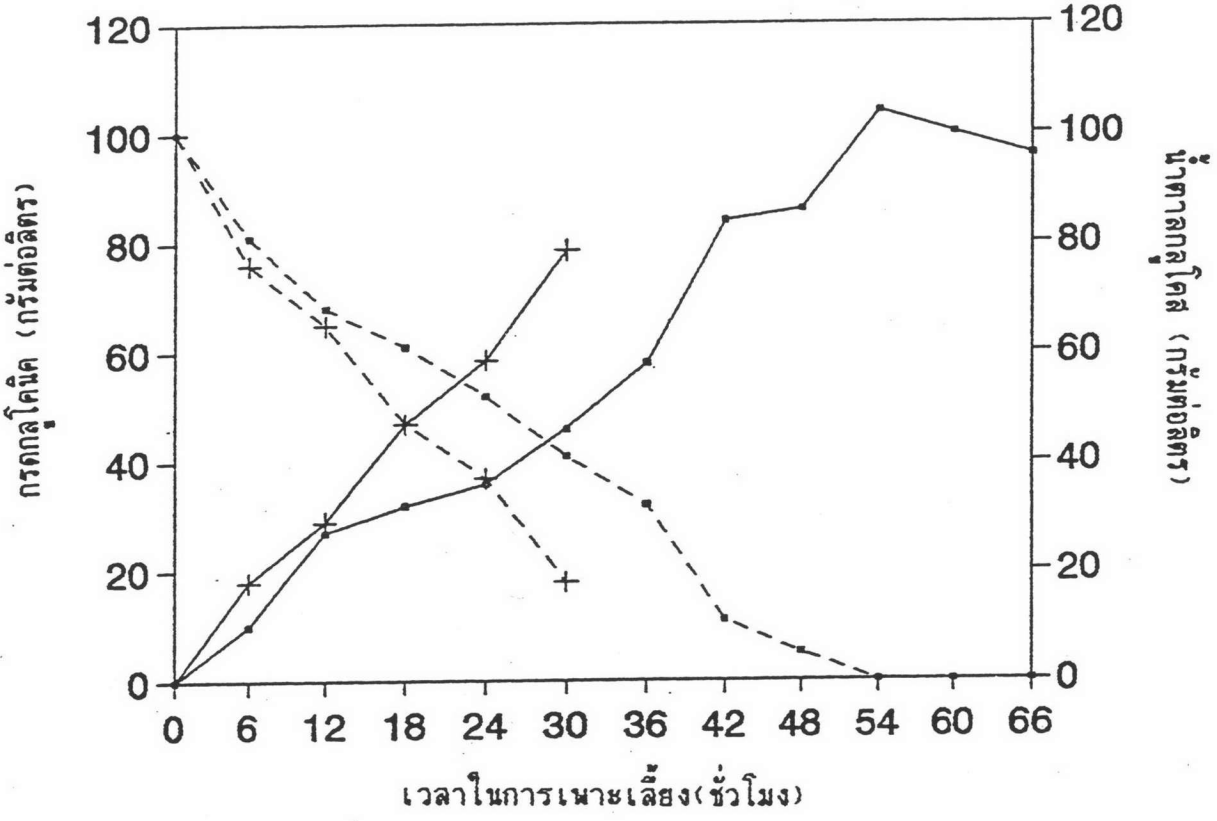
ความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริง (กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1ลิตร)	ชั่วโมงที่เกิดตะกอน	ปริมาณกรดสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
80	42	104
200	30	-*

* หมายถึง หยุดการทดลองตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36

\- หมายถึง ไม่ทราบปริมาณกรดสูงสุด

3.4 ผลการแปรผันความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริงที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิคเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อทำการผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 400 มิลลิลิตรที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเป็น 50 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที โดยแปรความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริงเป็น 80 200 300 และ400 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเม็ดเจลความหนาแน่น 300 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดสูงสุดและใช้น้ำตาลเร็วที่สุด คือ ให้ปริมาณกรด 54 กรัมต่อลิตร (คิดเป็น 98.83 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับน้ำตาลตั้งต้น) ในชั่วโมงที่ 18 ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับที่น้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด เม็ดเจลความหนาแน่น 80 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดน้อยที่สุดและใช้น้ำตาลช้าที่สุด คือให้ปริมาณกรด 50 กรัมต่อลิตร (คิดเป็น 91.51 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับน้ำตาลตั้งต้น) ในเวลาเดียวกับที่น้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด คือในชั่วโมงที่ 27 ส่วนเม็ดเจลความหนาแน่น 200 และ 400 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรด 51.4 และ 50 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 14 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อแปรผันปริมาณเม็ดเจลสายใยตรึงที่ใช้ในการผลิตต่าง ๆ กัน

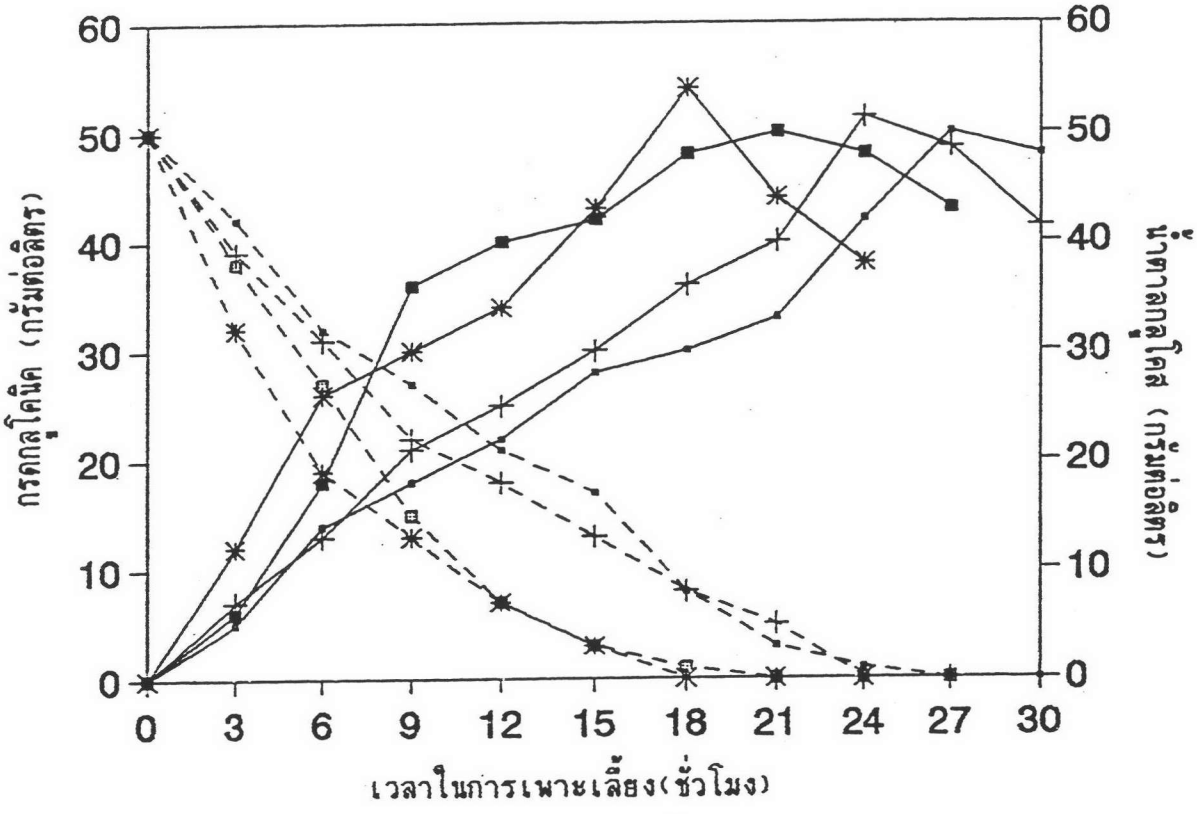
—— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค

--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

—•— หมายถึง ปริมาณเม็ดเจลสายใยตรึง 80 กรัมต่อลิตร

—+— หมายถึง ปริมาณเม็ดเจลสายใยตรึง 200 กรัมต่อลิตร**

** หมายถึง หยุดทำการทดลองตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36



รูปที่ 15 การผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยสายใยตรึง *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตรึงต่าง ๆ กัน

—— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค

--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

—•— หมายถึง ปริมาณเม็ดเจลสายใยตรึง 80 กรัมต่อลิตร

—+— หมายถึง ปริมาณเม็ดเจลสายใยตรึง 200 กรัมต่อลิตร

—✳— หมายถึง ปริมาณเม็ดเจลสายใยตรึง 300 กรัมต่อลิตร

—■— หมายถึง ปริมาณเม็ดเจลสายใยตรึง 400 กรัมต่อลิตร

(คิดเป็น 94.07 และ 91.51 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับน้ำตาลตั้งต้น) ในชั่วโมงที่ 24 และ 21 ตามลำดับ และใช้น้ำตาลกลูโคสหมดในชั่วโมงที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด โดยเม็ดเจลความหนาแน่น 200 กรัมต่อลิตรใช้น้ำตาลกลูโคสช้ากว่าความหนาแน่น 400 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 15)

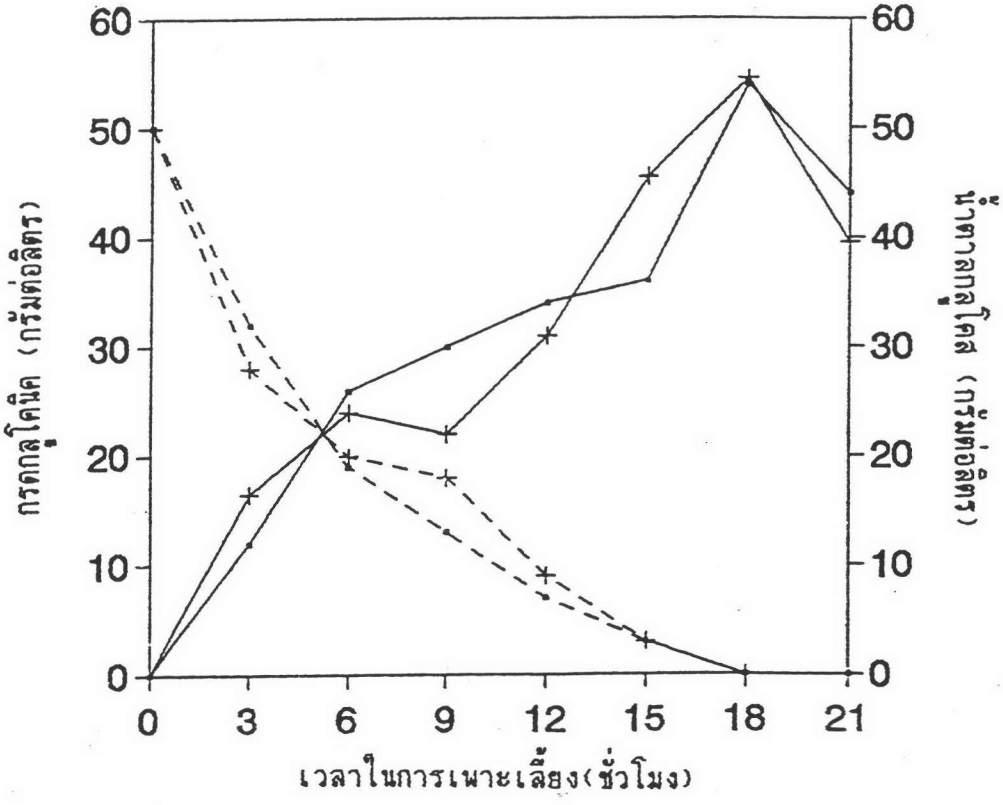
ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง คือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึง สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ความหนาแน่นเม็ดเจลสายใยตรึง 300 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุด 54 กรัมต่อลิตร ในเวลา 18 ชั่วโมง

4. ผลการผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างโดยใช้แป้งไฮโดรไลเสตเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์

เมื่อผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ 50 กรัมต่อลิตร และแป้งไฮโดรไลเสตที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเป็น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ความหนาแน่นเม็ดเจลสายใยตรึง 30 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า แป้งไฮโดรไลเสตให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุด 54.5 กรัมต่อลิตรในเวลา 18 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนหมดในชั่วโมงที่ได้ผลผลิตสูงสุด (รูปที่ 16) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกรดจากน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ พบว่าน้ำตาลจาก 2 แหล่งให้ปริมาณกรดกลูโคนิคที่ใกล้เคียงกัน คือเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดสูงสุด 54.0 กรัมต่อลิตร ในเวลา 18 ชั่วโมง และน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดในชั่วโมงที่ 18 เช่นเดียวกัน โดยปริมาณน้ำตาลที่ใช้ในแต่ละช่วงของการผลิตเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 2 ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 16)

5. ผลการใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการผลิตกรดกลูโคนิค

เมื่อทดลองผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึง สูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) 400 มิลลิลิตร ซึ่งใช้แป้งไฮโดรไลเสตที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุใน



รูปที่ 16 เปรียบเทียบผลการผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ 50 กรัมต่อลิตร และแป้งไฮโดรไลเสตที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค

--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

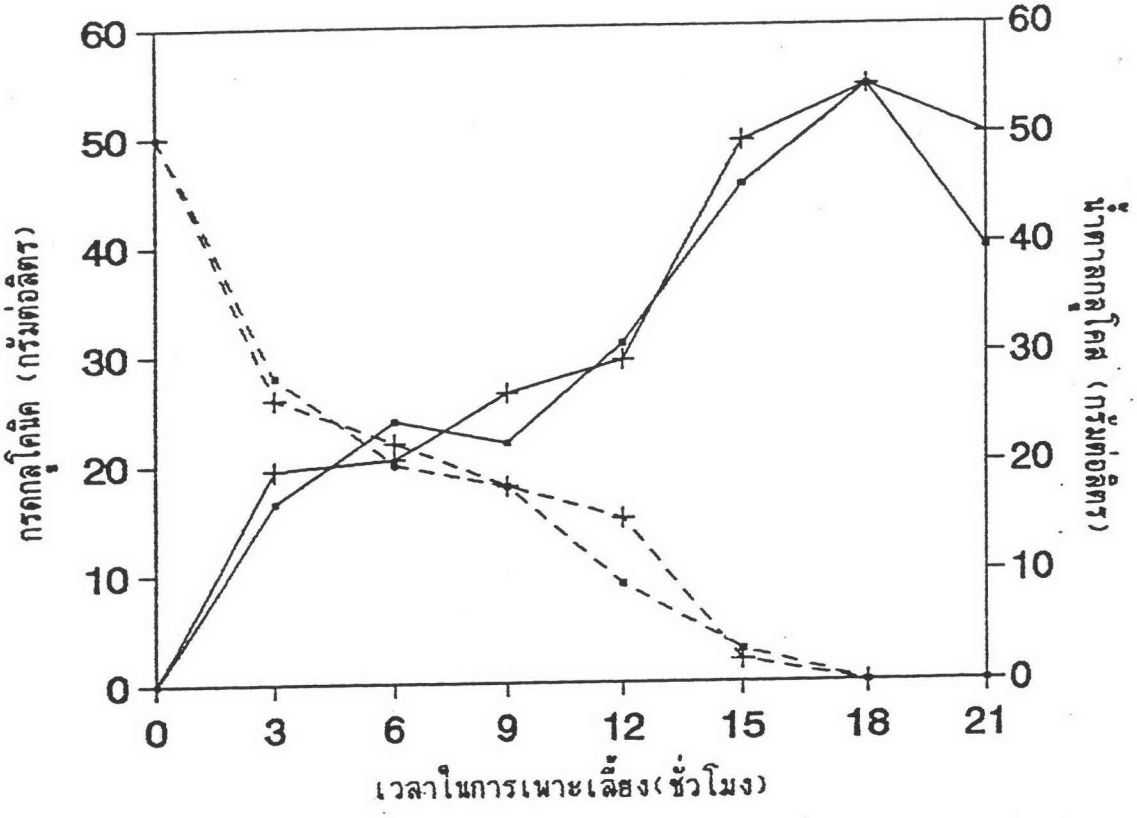
—•— หมายถึง เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน

—+— หมายถึง เมื่อใช้แป้งไฮโดรไลเสตเป็นแหล่งคาร์บอน

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่เติมธาตุต่าง ๆที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp. G153 สามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้สูงสุด 54.5 กรัมต่อลิตรในเวลา 18 ชั่วโมง (รูปที่ 17) ซึ่งเท่ากับปริมาณกรดที่ผลิตได้เมื่อใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การใช้น้ำตาลของสายใยตรึงเมื่อใช้น้ำจากทั้ง 2 แหล่งในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้เคียงกัน คือน้ำตาลลดลงตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนไม่มีน้ำตาลเหลืออยู่ในชั่วโมงที่ได้ปริมาณกรดสูงสุด (รูปที่ 17) ดังนั้นจึงสามารถใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองต่อไปได้

6. ผลการเปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยสายใยตรึงและสายใยอิสระของ *Aspergillus* sp.G153

เมื่อผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนโดยสายใยตรึง ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึง สูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) ความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตรึง 30 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) การให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที พบว่าให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุด 54.5 กรัมต่อลิตรในเวลา 18 ชั่วโมง (รูปที่ 17) สำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยอิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมัก (fermentor) (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในแป้งไฮโดรไลเสตเท่ากับการผลิตโดยสายใยตรึงคือ 50 กรัมต่อลิตร ขนาดหัวเชื้อ 7 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) การให้อากาศ 1.50 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที พบว่าให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุด 54.0 กรัมต่อลิตรในเวลา 12 ชั่วโมง (รูปที่ 18) เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดกลูโคนิคภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยสายใยตรึงและสายใยอิสระ พบว่าการผลิตโดยสายใยทั้ง 2 แบบให้ผลผลิตใกล้เคียงกันแต่การผลิตโดยสายใยอิสระในถังหมักที่มีการกวน และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนปริมาณมากกว่าการผลิตในคอลัมน์แก้วให้ปริมาณกรดสูงสุดเร็วกว่า เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาล พบว่าการผลิตกรดโดยสายใยทั้ง 2 รูปแบบมีการใช้น้ำตาลในรูปแบบเดียวกัน คือปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนหมดในชั่วโมงที่ได้ผลผลิตสูงสุด โดยสายใยอิสระมีการใช้น้ำตาลรวดเร็วกว่าสายใยตรึง (รูปที่ 18)



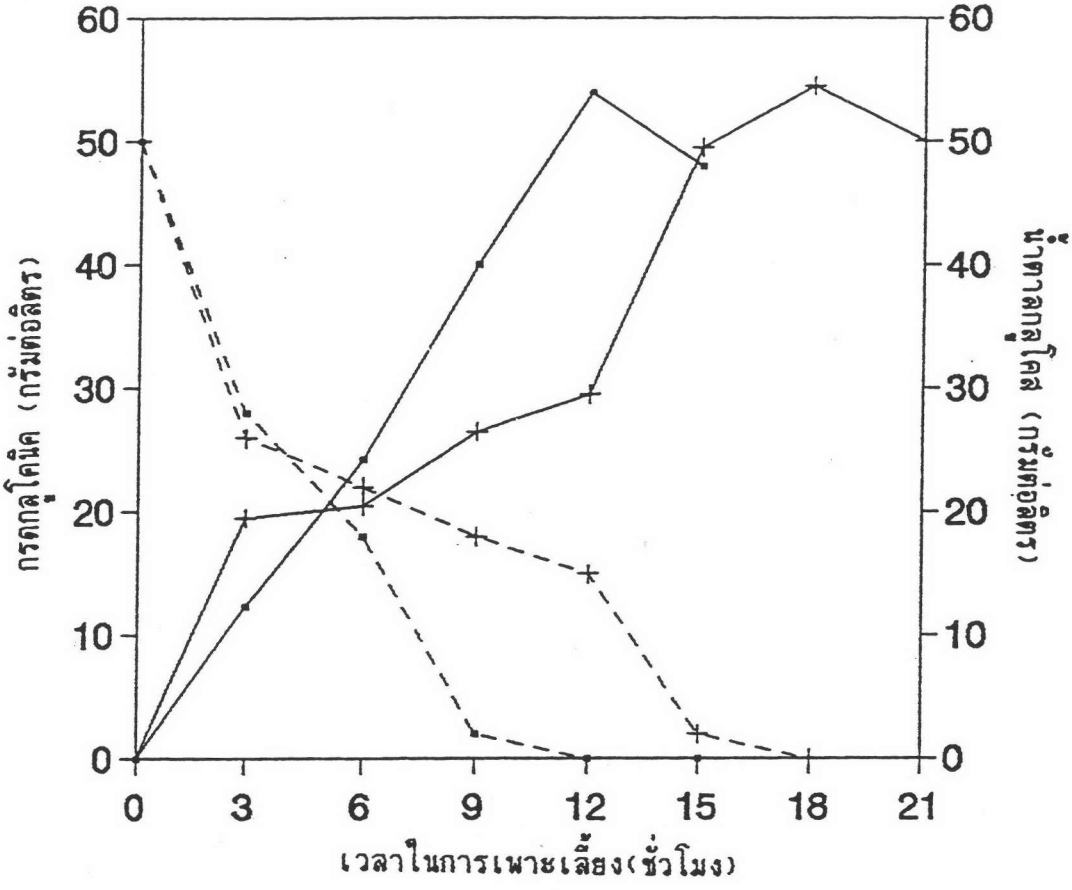
รูปที่ 17 เปรียบเทียบผลการผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างด้วยสายใยตริง เมื่อใช้น้ำปลอดประจุและน้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค

--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

—+— หมายถึง ใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

—•— หมายถึง ใช้น้ำประปาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 18 เปรียบเทียบผลการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง กับสายใยอิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแต่ละแบบ และใช้น้ำประปาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค

--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

—•— หมายถึง สายใยอิสระ

—+— หมายถึง สายใยตริง

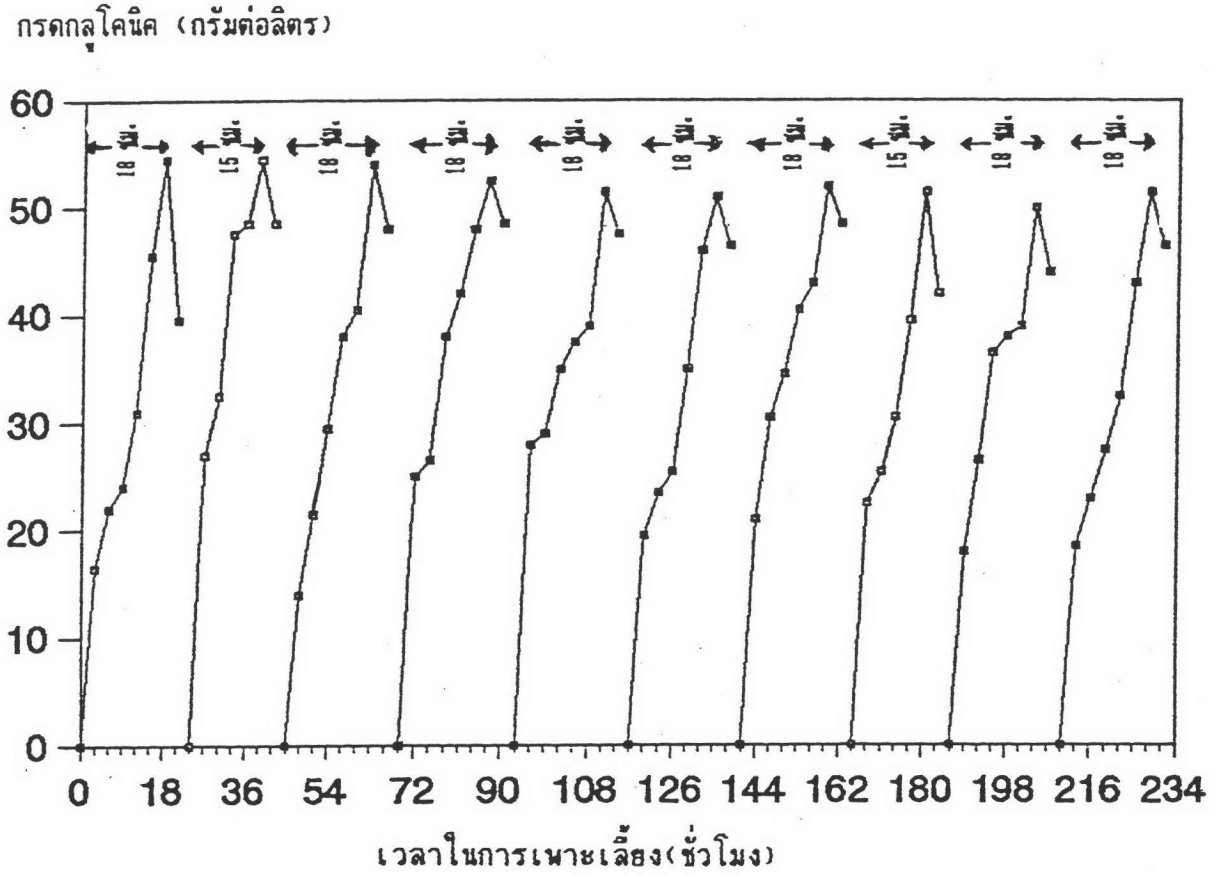
7. ผลการทดลองผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำ (repeated batch) โดยใช้สายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column)

7.1 ผลการทดลองชุดที่ 1 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเหมาะสม

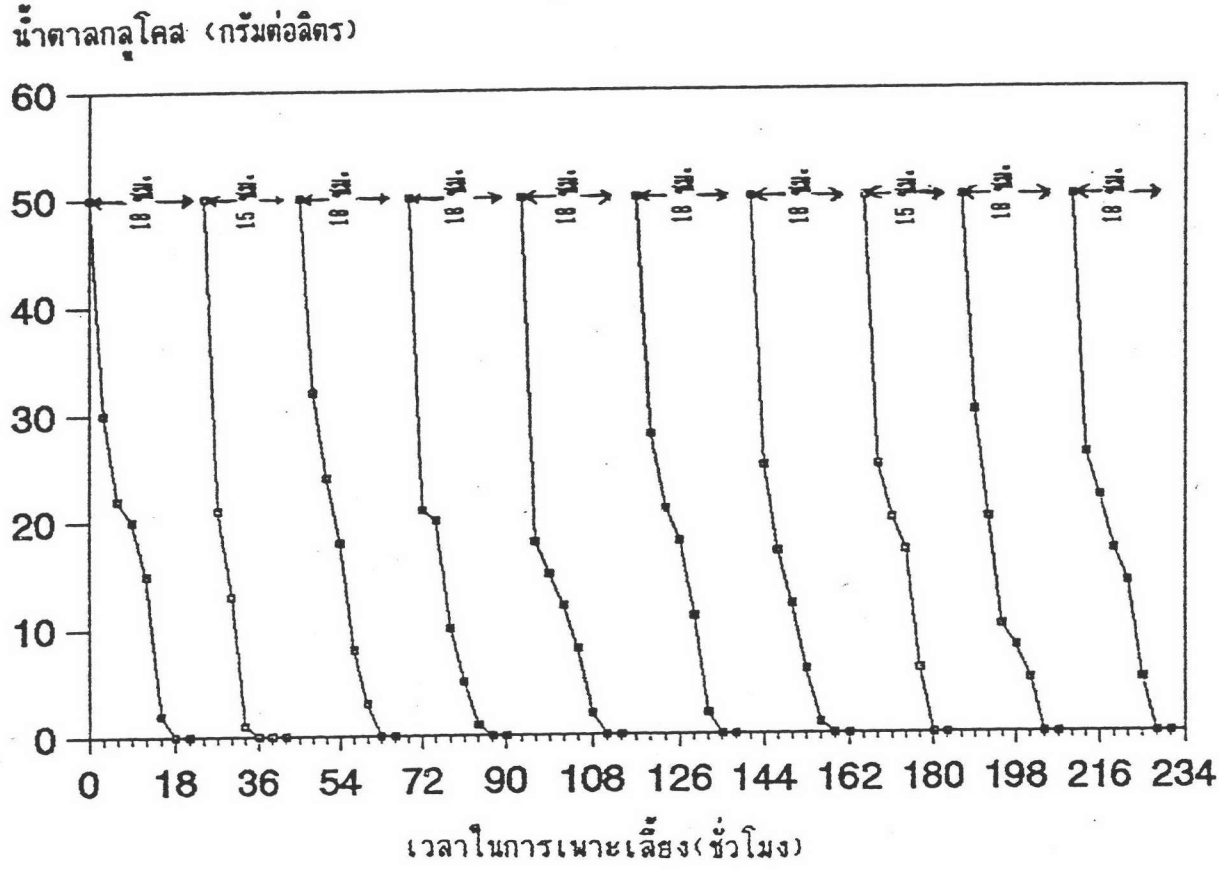
7.1.1 เมื่อทดลองผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) แต่ใช้แป้งไฮโดรไลเสต 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้สายใยตริงซ้ำได้รวม 10 ครั้งในเวลา 228 ชั่วโมง โดยผลผลิตกรดไม่ลดลง ได้ปริมาณกรดกลูโคนิคในช่วง 50.0-54.5 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดสูงสุดในชั่วโมงที่ 15-18 ของการใช้ซ้ำแต่ละครั้ง (รูปที่ 19) ส่วนการใช้น้ำตาลของสายใยตริงในการใช้ซ้ำแต่ละครั้งเป็นไปอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนน้ำตาลหมดในชั่วโมงที่ให้ปริมาณกรดสูงสุด (รูปที่ 20)

7.1.2 เมื่อทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) ซึ่งคือสูตรที่ 1 แต่ใช้แป้งไฮโดรไลเสตที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงซ้ำ พบว่าสามารถผลิตกรดโดยสายใยตริงซ้ำได้รวม 10 ครั้งในเวลา 228 ชั่วโมงโดยผลผลิตกรดไม่ลดลง ได้ปริมาณกรดกลูโคนิคในช่วง 50.0-54.5 กรัมต่อลิตร โดยได้ปริมาณกรดสูงสุดในชั่วโมงที่ 15-18 ของการใช้ซ้ำแต่ละครั้ง ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับที่น้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด (รูปที่ 21 และ 22)

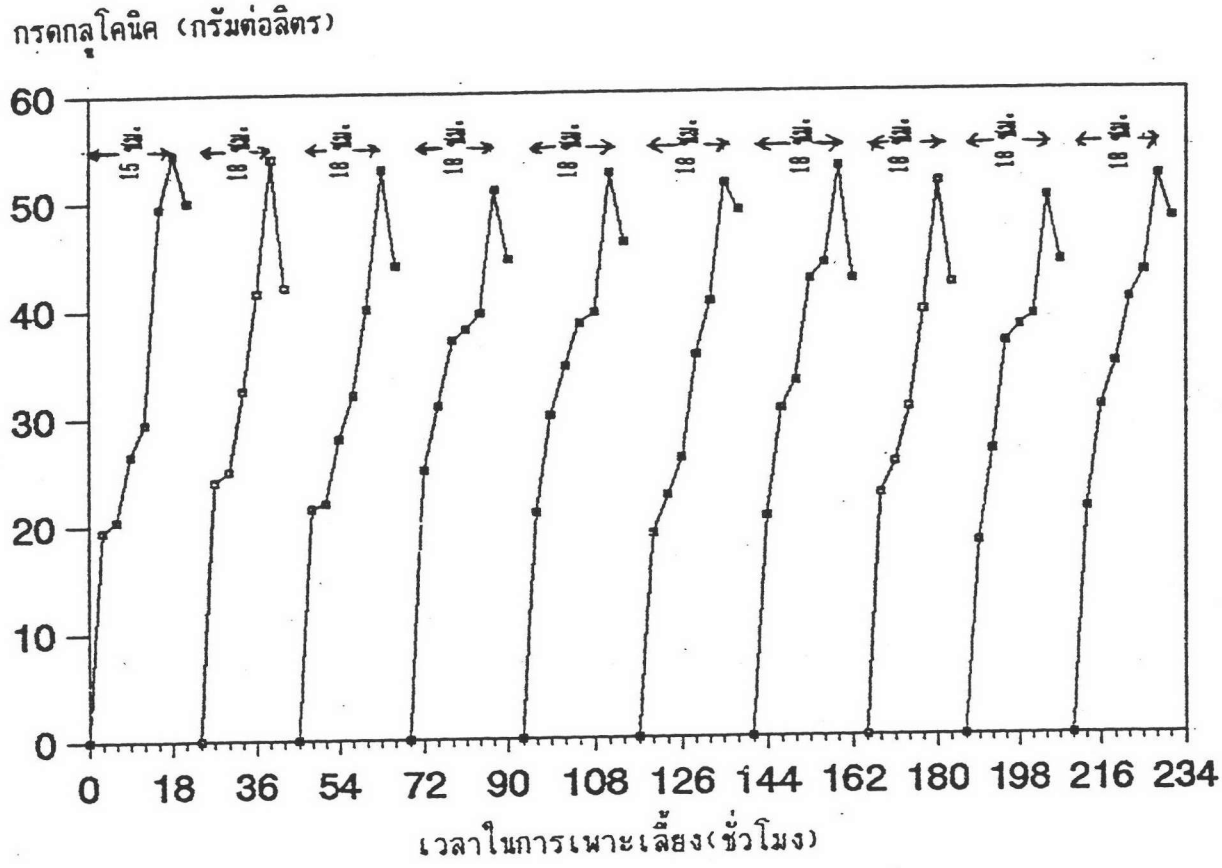
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคเมื่อใช้น้ำปลอดประจุและน้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ซึ่งก็คือแป้งไฮโดรไลเสตที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ขนาดหัวเชื้อสายใยตริง 300 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถใช้สายใยตริงซ้ำได้ 10 ครั้งในเวลา 228 ชั่วโมงโดยผลผลิตกรดไม่ลดลงเหมือนกัน และได้ปริมาณกรดสูงสุดในแต่ละซ้ำของการผลิตใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 50.0-54.5 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 23) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสามารถใช้สายใยตริงของ *Aspergillus* sp.G153 ผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำได้อย่างน้อย 10



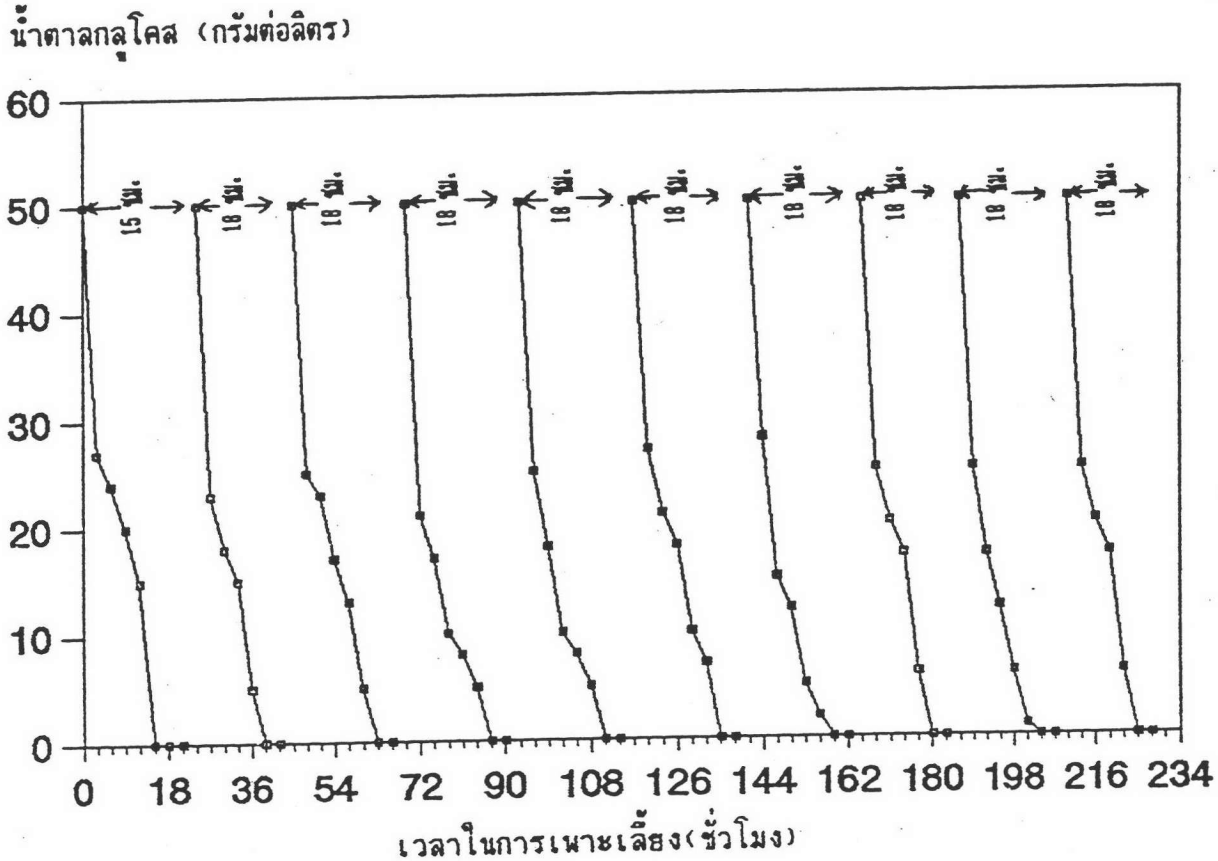
รูปที่ 19 ปริมาณกรดกลูโคนิคเมื่อทำการผลิตซ้ำ (repeated batch) 10 ครั้ง โดยสายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างเมื่อใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ



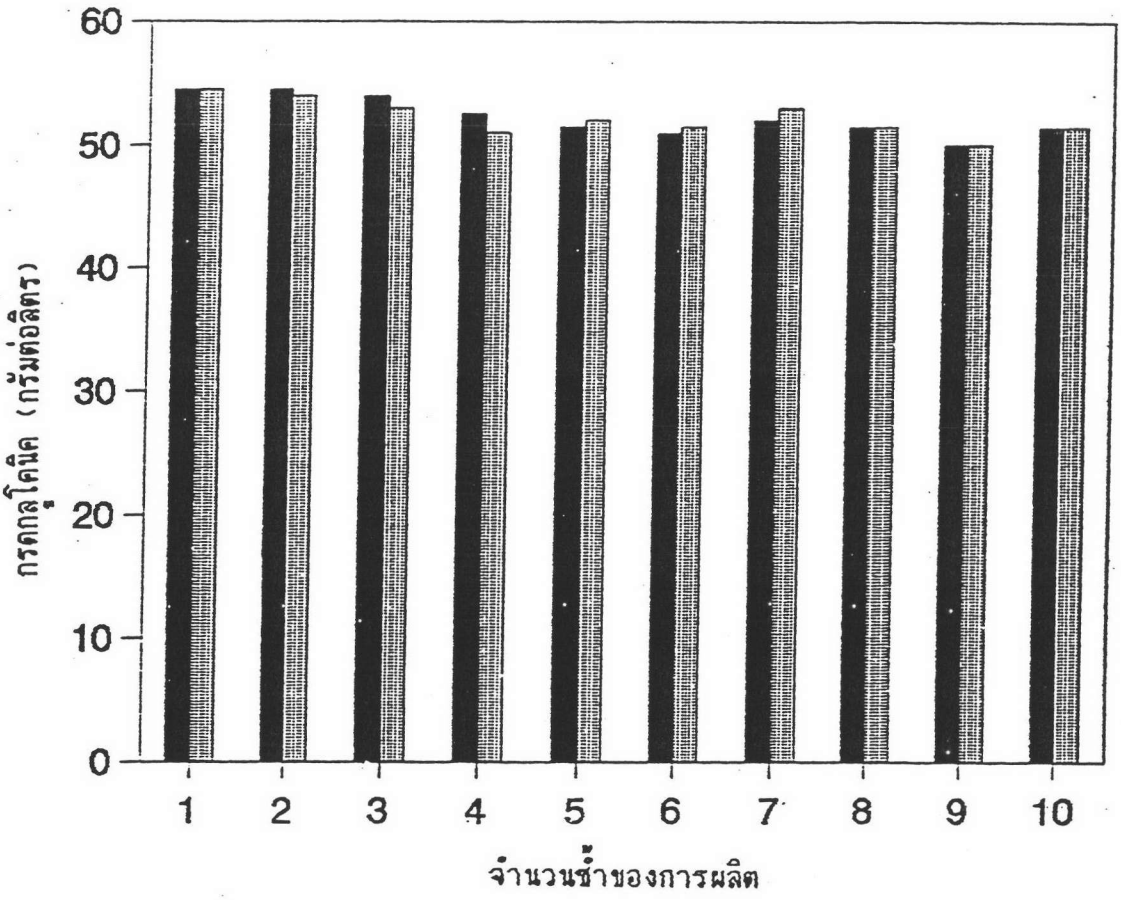
รูปที่ 20 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำ (repeated batch) 10 ครั้ง โดยสายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ



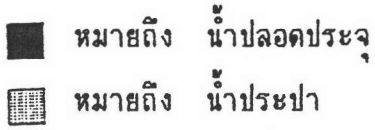
รูปที่ 21 ปริมาณกรดกลูโคนิคเมื่อทำการผลิตซ้ำ (repeated batch) 10 ครั้งโดยสายใยตรึง *Aspergillus* sp. G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างเมื่อใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 22 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำ (repeated batch) 10 ครั้ง โดยสายใยตรึง *Aspergillus* sp. G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 23 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคเมื่อผลิตซ้ำ (repeated batch) 10 ครั้ง โดยสายใยตรึงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ใช้น้ำปลอดประจุและน้ำประปาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ



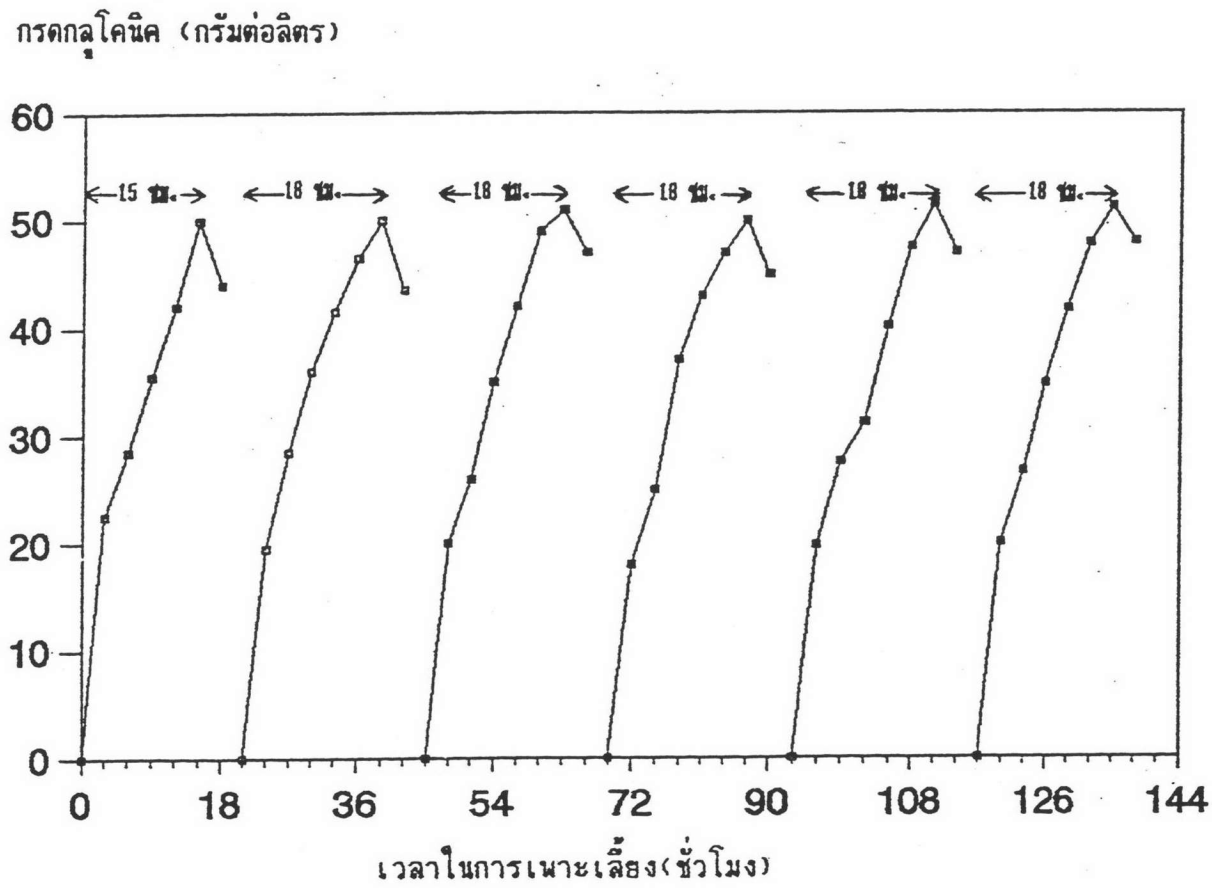
ครั้งโดยปริมาณกรดไม่ลดลง และยังสามารถลดต้นทุนในการผลิตซ้ำโดยใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อได้อีกด้วย

7.2 ผลการทดลองชุดที่ 2 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเหมาะสม แต่ลดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

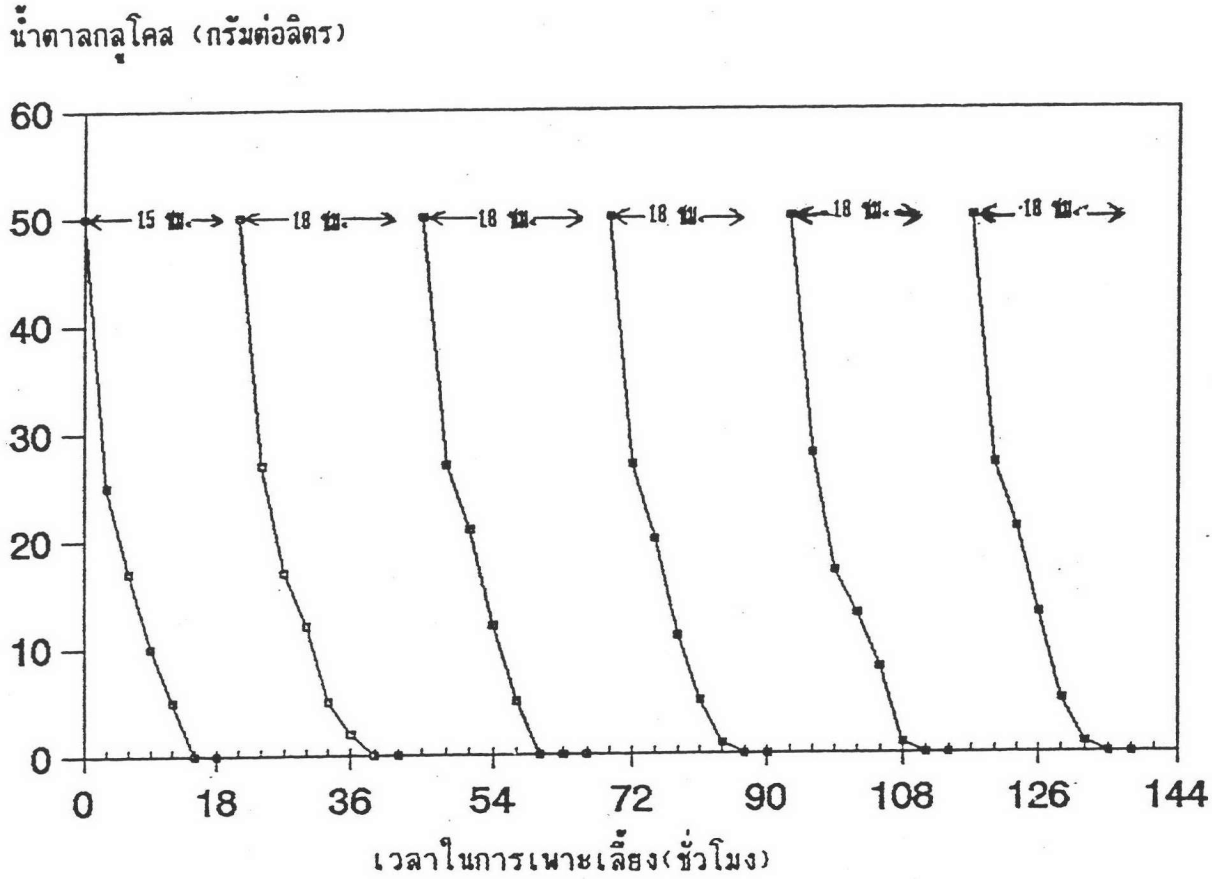
7.2.1 เมื่อทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) ในการผลิตครั้งแรก หลังจากนั้นใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวแต่ไม่ใส่แอมโมเนียมซัลเฟตในการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำในครั้งต่อ ๆ ไปอีก 5 ครั้ง รวมผลิต 6 ครั้ง พบว่าสามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้โดยผลผลิตกรดไม่ลดลง ปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 50-51.5 กรัมต่อลิตร เวลาที่ให้ปริมาณกรดสูงสุดในแต่ละซ้ำเป็นเวลาเดียวกับที่น้ำตาลถูกใช้หมด คืออยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 15-18 (รูปที่ 24 และ 25)

7.2.2 เมื่อทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) แต่ไม่ใส่แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน ในการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำ รวม 6 ครั้ง โดยสายใยตริง *Aspergillus* sp.G153 พบว่า สามารถผลิตกรดซ้ำได้โดยผลผลิตกรดไม่ลดลง ได้ปริมาณกรดกลูโคนิคในช่วง 51-52 กรัมต่อลิตรในเวลา 18 ชั่วโมงของการผลิตแต่ละซ้ำ ซึ่งเวลาดังกล่าวเป็นเวลาเดียวกับที่น้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด (รูปที่ 26 และ 27)

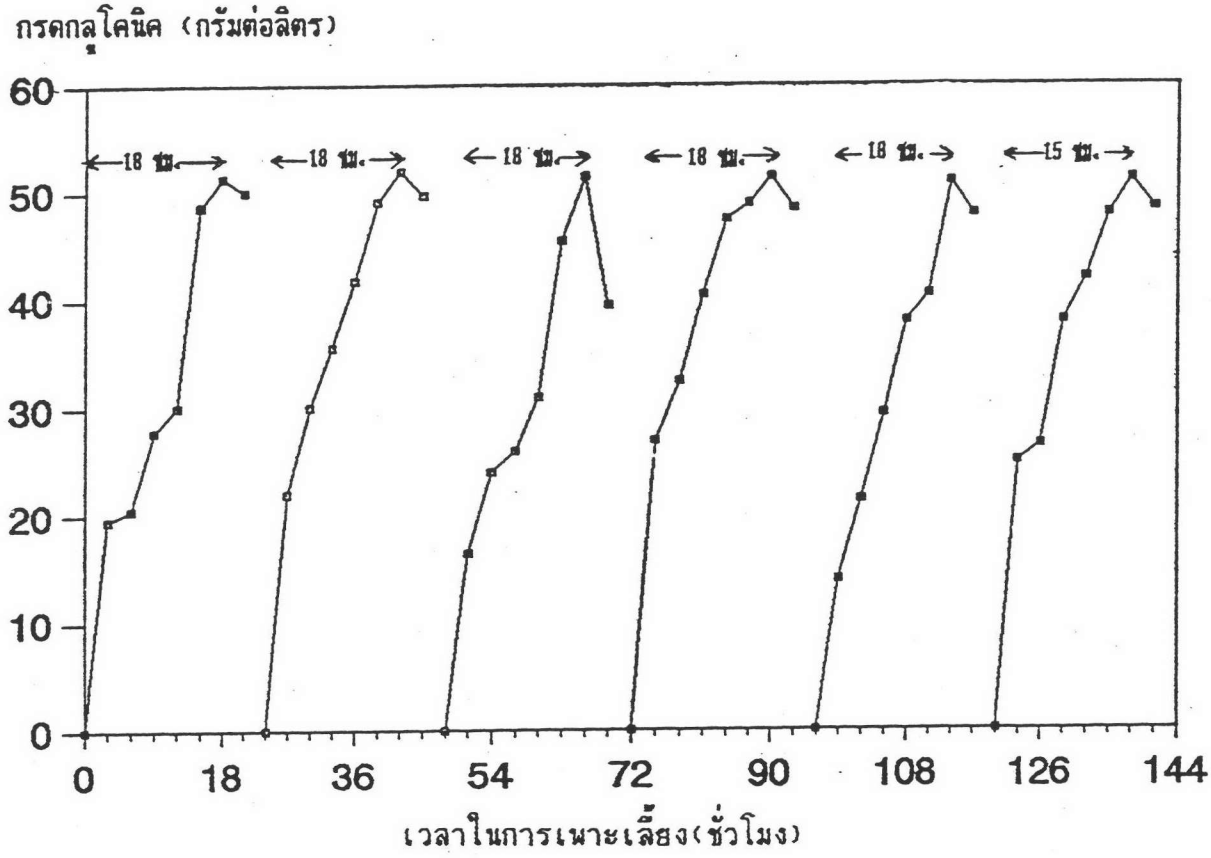
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิค เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) ในการผลิตครั้งแรก หลังจากนั้นใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวแต่ไม่ใส่แอมโมเนียมซัลเฟตในการผลิตซ้ำครั้งต่อไป กับเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดังกล่าวแต่ไม่ใส่แอมโมเนียมซัลเฟตในการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำทุกครั้ง พบว่าให้ผลการทดลองเหมือนกัน คือสามารถใช้สายใยตริงซ้ำได้ 6 ครั้งในเวลา 138 ชั่วโมง โดยผลผลิตกรดไม่ลดลง และได้ปริมาณกรดในแต่ละซ้ำใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 50-52 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 28) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเหมาะสม คือแป้งไฮโดรไลเสตที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรในการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำโดยสายใยตริงได้อย่างน้อย 6 ครั้ง โดยไม่ต้องเติมแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกซ้ำ



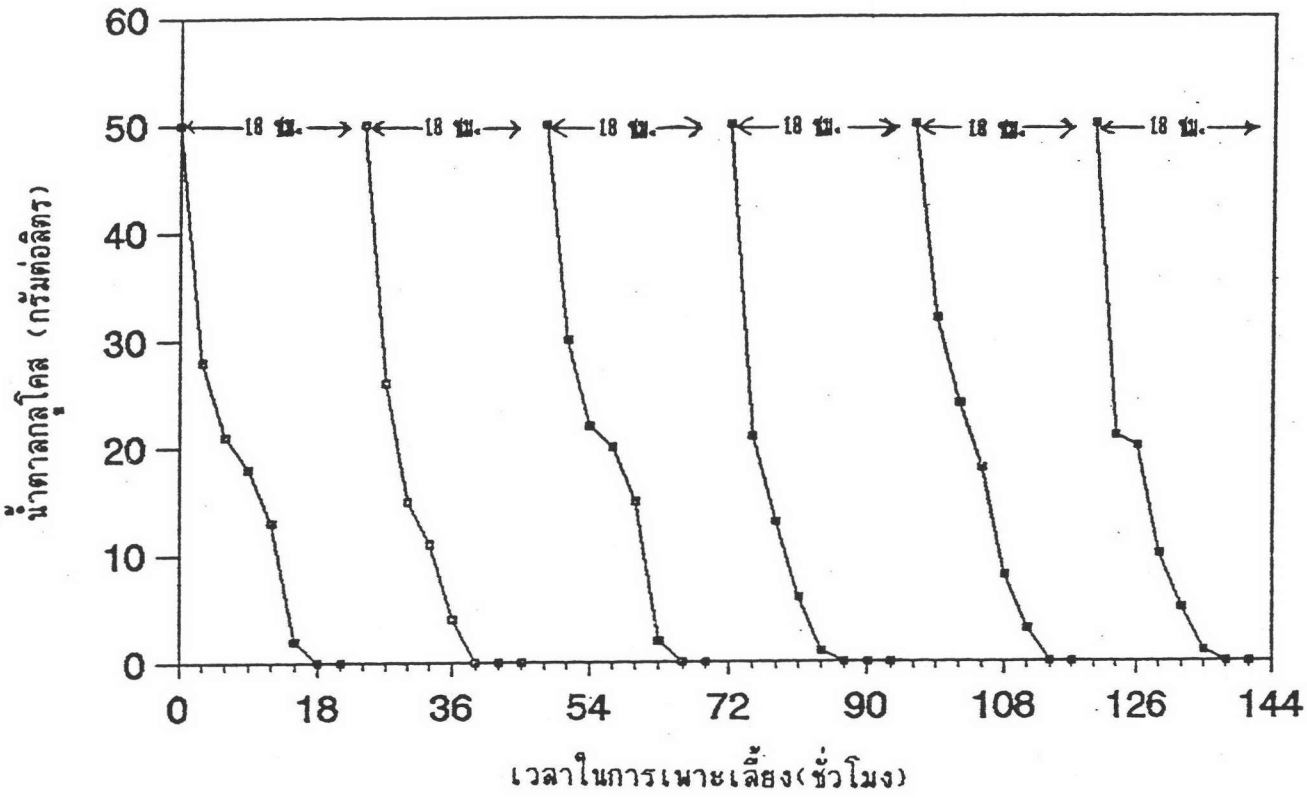
รูปที่ 24 ปริมาณกรดกลูโคนิคเมื่อทำการผลิตซ้ำ 6 ครั้ง โดยสายใยตรึงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อเติมแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร) ในการผลิตครั้งแรกแต่ไม่เติมในการผลิตซ้ำที่ 2 ถึง 6



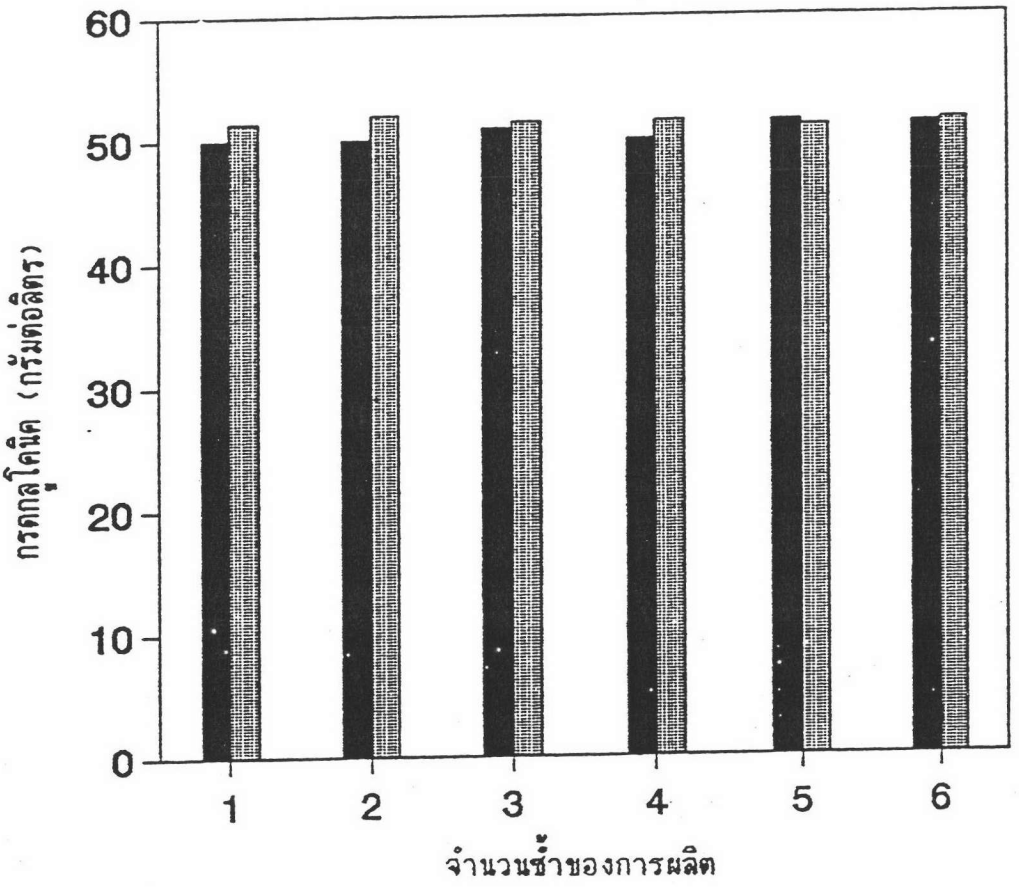
รูปที่ 25 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อทำการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำ 6 ครั้ง โดยสายใยตริงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อเติมแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร) ในการผลิตครั้งแรกแต่ไม่เติมในการผลิตซ้ำที่ 2 ถึง 6



รูปที่ 26 ปริมาณกรดกลูโคนิคเมื่อทำการผลิตซ้ำ 6 ครั้ง โดยสายไฮตริงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยไม่เติมแอมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคทุกซ้ำ



รูปที่ 27 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อทำการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำ 6 ครั้ง โดยสายไยตรึงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตการกลูโคนิคทุกซ้ำ



รูปที่ 28 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคในการผลิตซ้ำ 6 ครั้ง ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนในการผลิตครั้งแรก แต่ไม่เติมในการผลิตซ้ำที่ 2 ถึง 6 กับเมื่อไม่เติมแหล่งไนโตรเจนในการผลิตทั้ง 6 ซ้ำ

■ หมายถึง เติมแหล่งไนโตรเจนในการผลิตครั้งแรก แต่ไม่เติมในการผลิตซ้ำที่ 2 ถึง 6

▩ หมายถึง ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนในการผลิตทั้ง 6 ซ้ำ

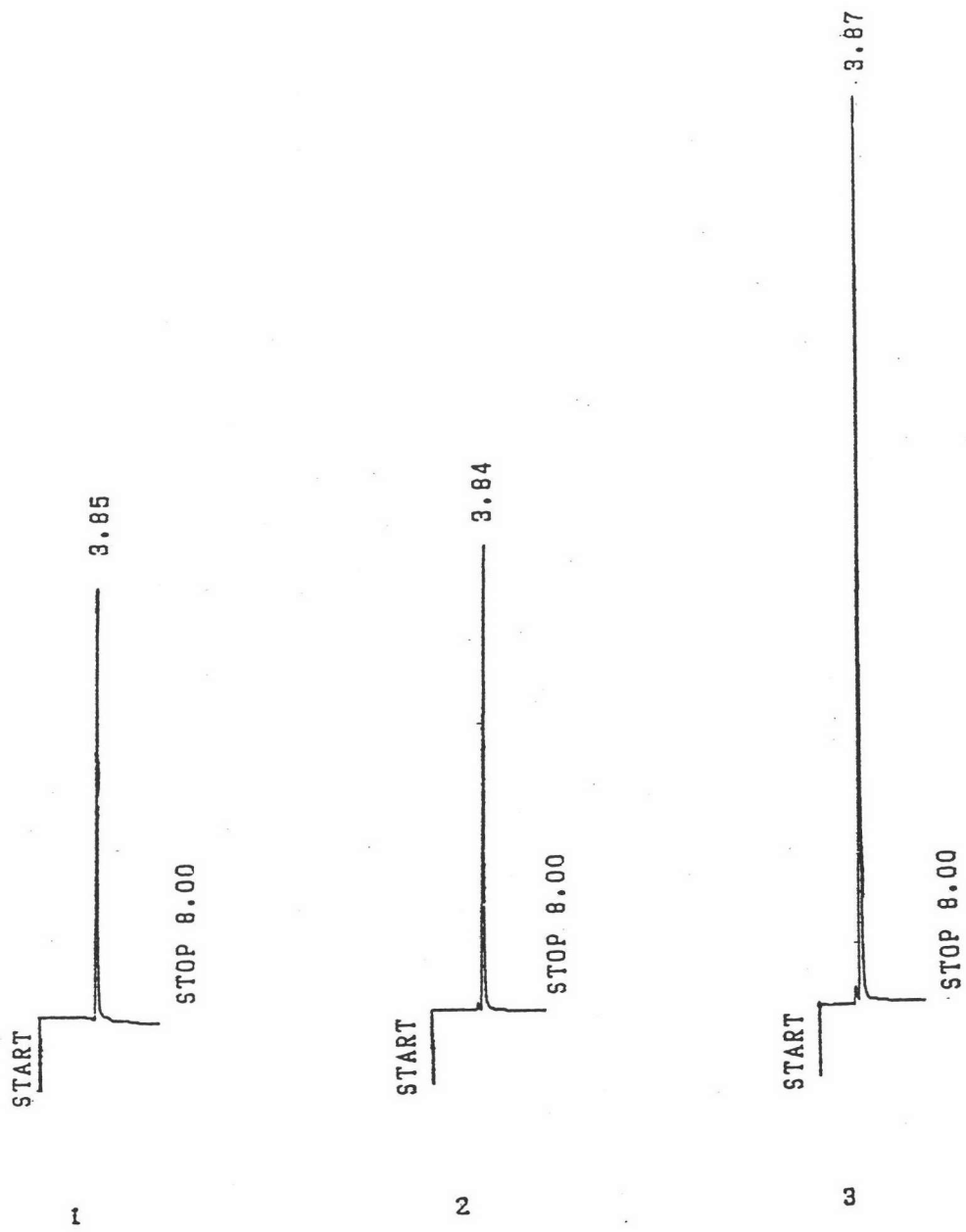
8. ผลการตรวจสอบเพื่อยืนยันเกลือกลูโคเนตที่สร้างโดยสายใยตริงของ *Aspergillus* sp. G153 ด้วยเครื่อง HPLC

เมื่อทำการวิเคราะห์เกลือของกรดที่สร้างโดยสายใยตริงของ *Aspergillus* sp. G153 เพื่อยืนยันว่าเป็นแคลเซียมกลูโคเนตโดยเทียบกับแคลเซียมกลูโคเนตมาตรฐาน พบว่าเกลือดังกล่าวเป็นแคลเซียมกลูโคเนต เนื่องจากมีช่วงเวลาอยู่ในคอลัมน์เช่นเดียวกับแคลเซียมกลูโคเนตมาตรฐาน คือ 3.84 และ 3.85 นาทีตามลำดับ และเมื่อฉีดเข้าคอลัมน์ร่วมกับเกลือแคลเซียมกลูโคเนตมาตรฐาน พบว่ามีช่วงเวลาอยู่ในคอลัมน์ช่วงเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 29

9. ผลการตรวจการเติบโตของสายใยตริง *Aspergillus* sp.G153 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

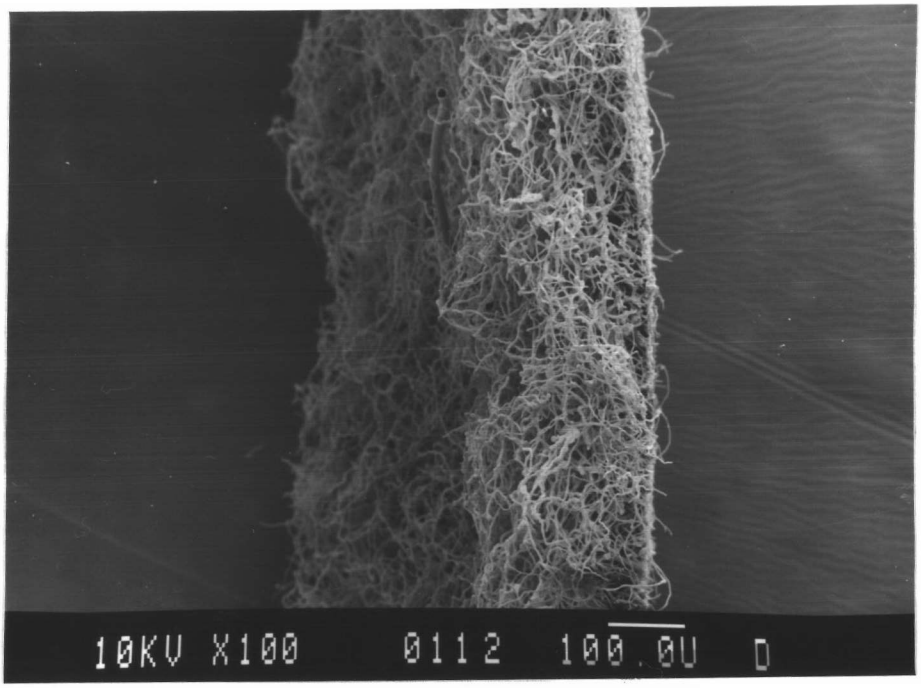
เมื่อนำเม็ดเจลมาตรวจการเติบโตของสายใยตริงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด โดยตรวจการเติบโตบริเวณผิวของเม็ดเจลจากเม็ดเจลทั้งเม็ด การเติบโตจากเม็ดเจลที่ผ่าครึ่งและจากเม็ดเจลที่ผ่าเป็นแว่น พบว่าเมื่อนำเม็ดเจลสายใยตริงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อทำให้สปอร์ตริงงอก (ภาคผนวก ก) ที่ผ่าครึ่งมาตรวจโดยขยาย 330 เท่า พบสายใยเจริญอยู่บริเวณผิวของเม็ดเจลในระดับหนึ่ง มิได้เจริญทั่วทั้งเม็ดเจล (รูปที่ 30) เมื่อตัดเม็ดเจลดังกล่าวเป็นแว่นแล้วตรวจโดยเพิ่มกำลังขยายให้สูงขึ้นเป็น 1000 เท่า พบว่าชั้นของสายใยตริงบริเวณผิวด้านในของเม็ดเจลหนา 0.5 มิลลิเมตร และมีสายใยเจริญอยู่อย่างสม่ำเสมอตั้งแต่ผิวเม็ดเจลลงมา (รูปที่ 31)

เมื่อตรวจการเติบโตสายใยตริงจากแว่นเม็ดเจลสายใยตริง ที่ได้จากการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) ในการผลิตครั้งแรก และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค สูตรที่ 2 แต่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในการผลิตซ้ำครั้งต่อไปอีก 5 ครั้ง รวมผลิต 6 ครั้งเป็นเวลา 138 ชั่วโมง พบว่า ให้ผลเช่นเดียวกับเม็ดเจลสายใยตริงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเม็ดเจลสปอร์ตริง คือมีการเจริญของสายใยบริเวณผิวของเม็ดเจลระดับหนึ่งเท่านั้น โดยชั้นสายใยที่เจริญมีความหนาเพิ่มขึ้นจากชั้นสายใยของเม็ดเจลสายใยตริงที่ได้หลังจากการทำให้สปอร์ตริงงอกเล็กน้อย คือหนา 0.6 มิลลิเมตร (รูปที่ 32) และมีการเจริญของสายใยสม่ำเสมอทั้งชั้นความหนานั้น (รูปที่ 33)

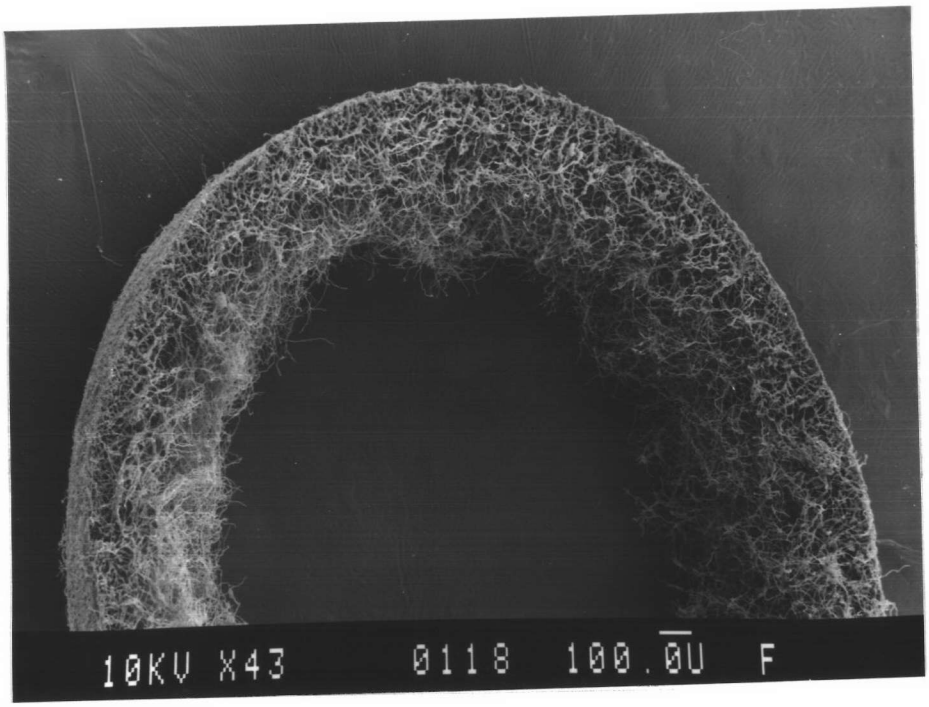


รูปที่ 29 HPLC โครมาโตแกรมของแคลเซียมกลูโคเนตมาตรฐาน (1) เกลือแคลเซียมกลูโคเนตที่สร้างโดยสายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 (2) และแคลเซียมกลูโคเนตที่สร้างโดยสายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 ผสมกับแคลเซียมกลูโคเนตมาตรฐาน (3)

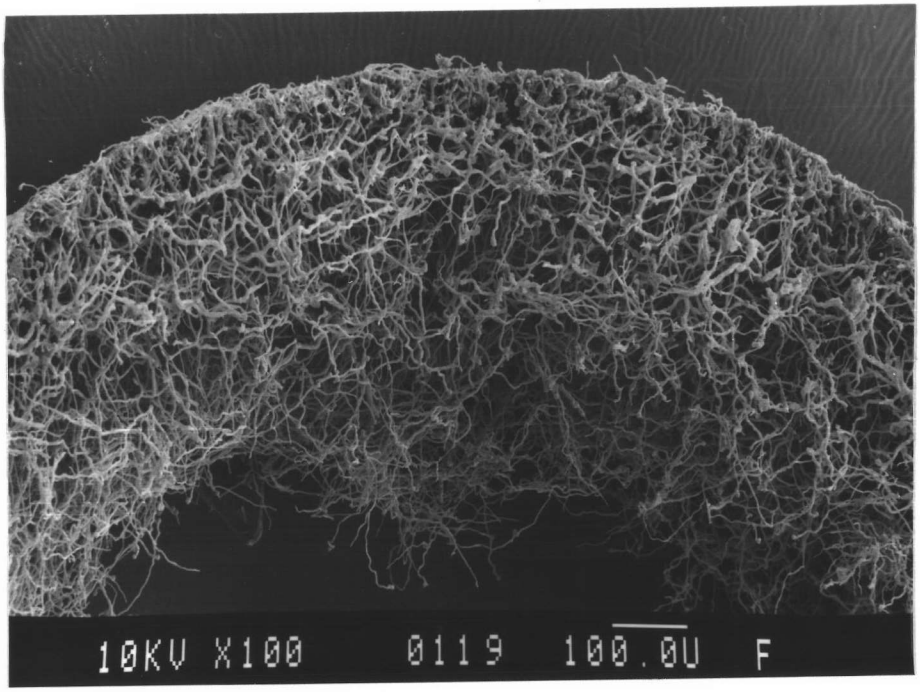
รูปที่ 30 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของเม็ดเจลสายใยตริงผ่าครึ่งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเม็ดเจลสปอร์ตริงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตริงงอกนาน 66 ชั่วโมง โดยมองจากด้านบน ขยาย 330 เท่า



รูปที่ 31 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของแว่นเม็ดเจลสายใยตริงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเม็ดเจลสปอร์ตริงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตริงงอกนาน 66 ชั่วโมง ขยาย 1000 เท่า



รูปที่ 32 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของแว่นเม็ดเจลสายใยตริงที่ได้จากการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงสูตรที่ 2 ในการผลิตครั้งแรกและอาหารสูตรดังกล่าว แต่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในการผลิตกรดซ้ำครั้งต่อไปอีก 5 ครั้ง รวมเวลา 138 ชั่วโมง ขยาย 430 เท่า



รูปที่ 33 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของเม็ดเจลสายใยตรึงที่ได้จากการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงสูตรที่ 2 ในการผลิตครั้งแรก และอาหารสูตรดังกล่าวแต่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ในการผลิตซ้ำครั้งต่อไป รวมเวลา 138 ชั่วโมง ขยาย 1000 เท่า

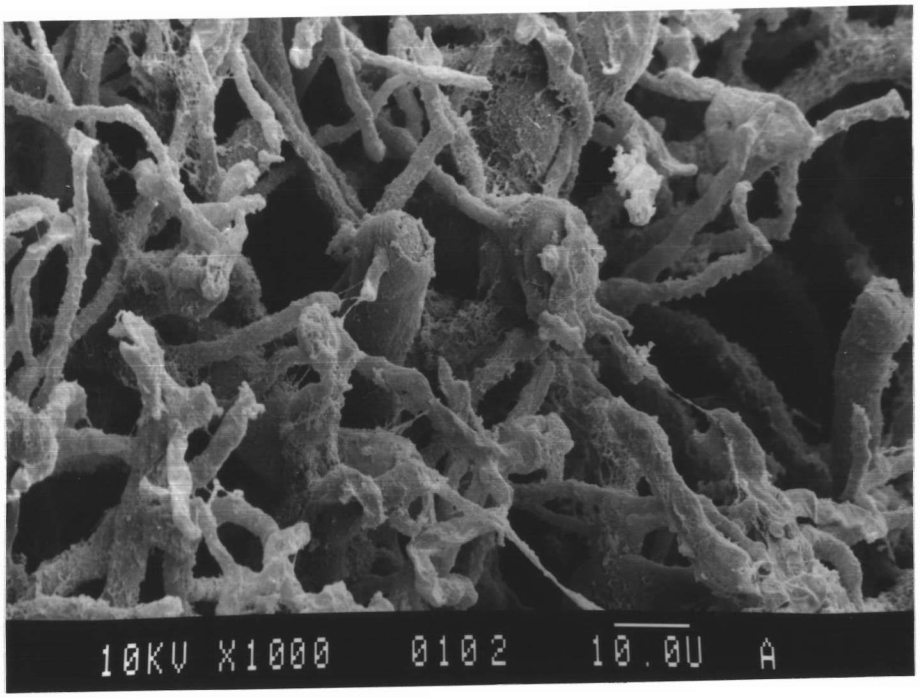
เมื่อตรวจสอบความหนาแน่นของสายใยตริงพบว่ามีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น เมื่อนำเม็ดเจลสายใยตริงผลิตกรดกลูโคนิคเป็นเวลานานขึ้น โดยเม็ดเจลสายใยตริงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตริงงอก (ภาคผนวก ก) มีความหนาแน่นของสายใยตริงน้อยกว่าเม็ดเจลสายใยตริงที่ได้นำไปผลิตกรดกลูโคนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) และเม็ดเจลสายใยตริงที่ได้จากการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำจนครบ 6 ครั้งเล็กน้อย (รูปที่ 34 35 36)

10. ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการงอกของเม็ดเจลสปอร์ตริง ที่เก็บไว้ที่เวลาต่าง ๆ กัน ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงให้สปอร์ตริงงอก และประสิทธิภาพของสายใยตริงที่ได้ในการผลิตกรดกลูโคนิค

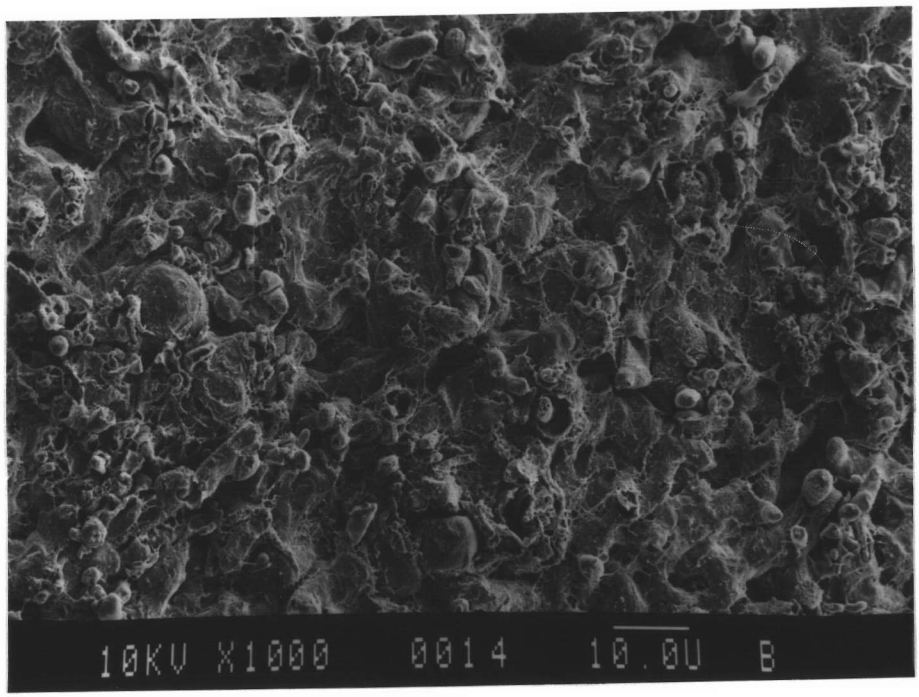
เมื่อเก็บเม็ดเจลสปอร์ตริงของ *Aspergillus* sp.G153 ไว้ที่ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1 3 5 และ 7 วัน เพาะเม็ดเจลสปอร์ตริงให้งอก พบว่าเม็ดเจลสปอร์ตริงที่เก็บไว้ในเวลาต่าง ๆ กันทุกเวลาสามารถงอกได้ในเวลา 66 ชั่วโมง เมื่อนำสายใยตริงที่ได้มาผลิตกรดกลูโคนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) พบว่าเมื่อเก็บเม็ดเจลสปอร์ตริงไว้เป็นเวลา 0 1 3 5 และ 7 วัน ให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุดและการใช้น้ำตาลใกล้เคียงกันคือ 248.0 247.7 248.3 248.1 และ 247.8 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และน้ำตาลหมดในวันที่ได้ผลผลิตกรดสูงสุด (รูปที่ 37)

11. ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตกรดกลูโคนิคของสายใยตริงที่เก็บไว้ที่เวลาต่าง ๆ กัน

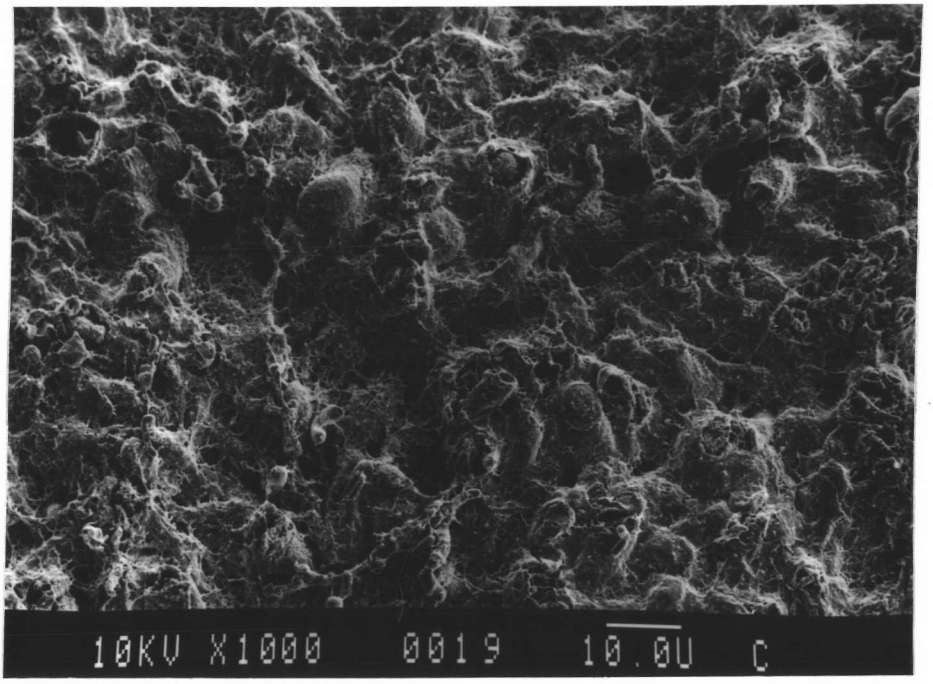
เมื่อเก็บเม็ดเจลสายใยตริงของ *Aspergillus* sp.G153 ไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0 1 3 5 และ 7 วัน แล้วนำสายใยตริงมาผลิตกรดกลูโคนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง สูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก) พบว่าสายใยตริงที่เก็บไว้เป็นเวลา 0 1 3 และ 5 วัน ให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุดใกล้เคียงกันคือ 248.2 248.7 245.0 และ 247.1 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการผลิต แต่เมื่อเก็บสายใยตริงไว้เป็นเวลานาน 7 วันให้ผลผลิตกรดในแต่ละวันช้ากว่า และปริมาณกรดสูงสุดก็ต่ำกว่า คือ 218.0 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการผลิต สำหรับการใช้น้ำตาล พบว่า



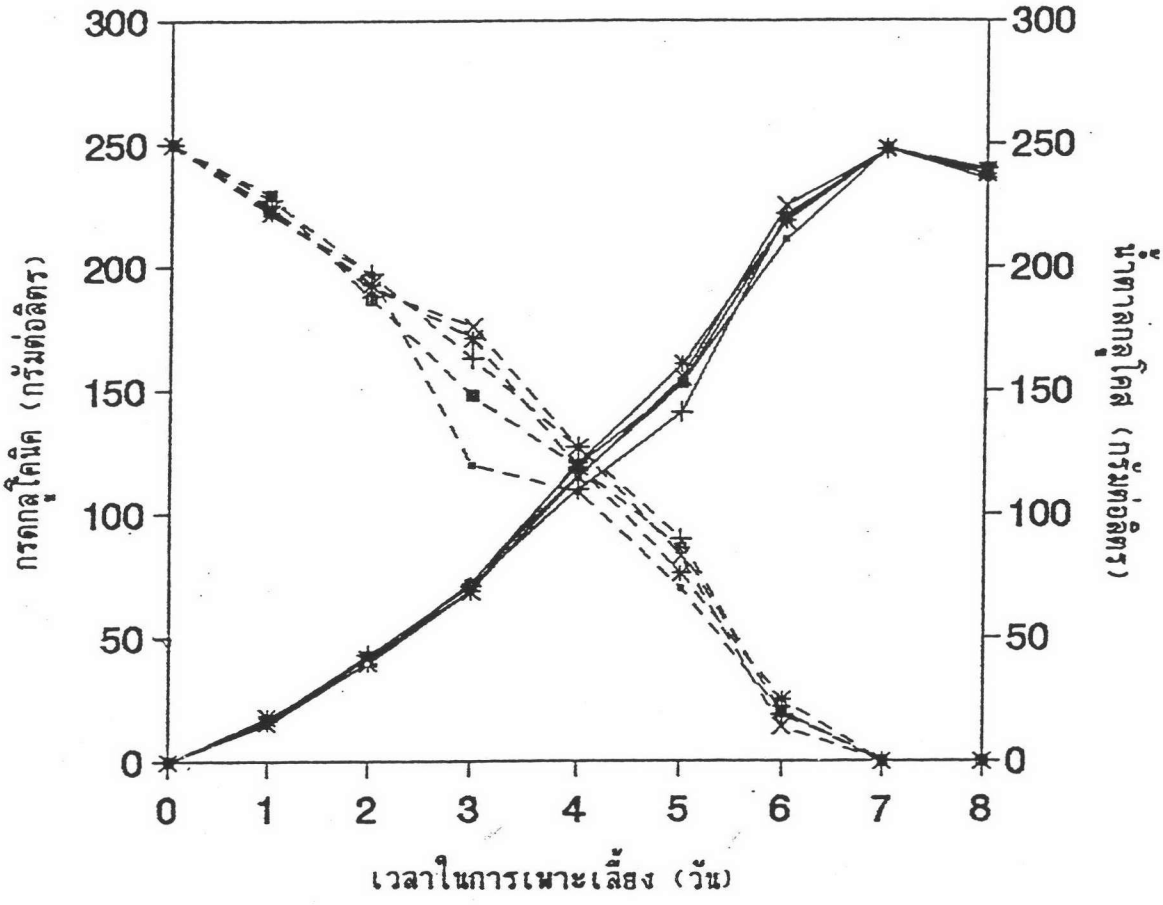
รูปที่ 34 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงความหนาแน่นของสายใยตริงที่เจริญอยู่บริเวณผิวของเม็ดเจลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเม็ดเจลสปอร์ตริงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเนื่อการทำให้สปอร์ตริงงอกนาน 66 ชั่วโมง ขยาย 10000 เท่า



รูปที่ 35 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงความหนาแน่นของสายใยตริงที่เจริญอยู่บริเวณผิวของเม็ดเจลที่ได้จากการผลิตกรดกลูโคนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงสูตรที่ 2 1 ครั้ง ขยาย 10000 เท่า



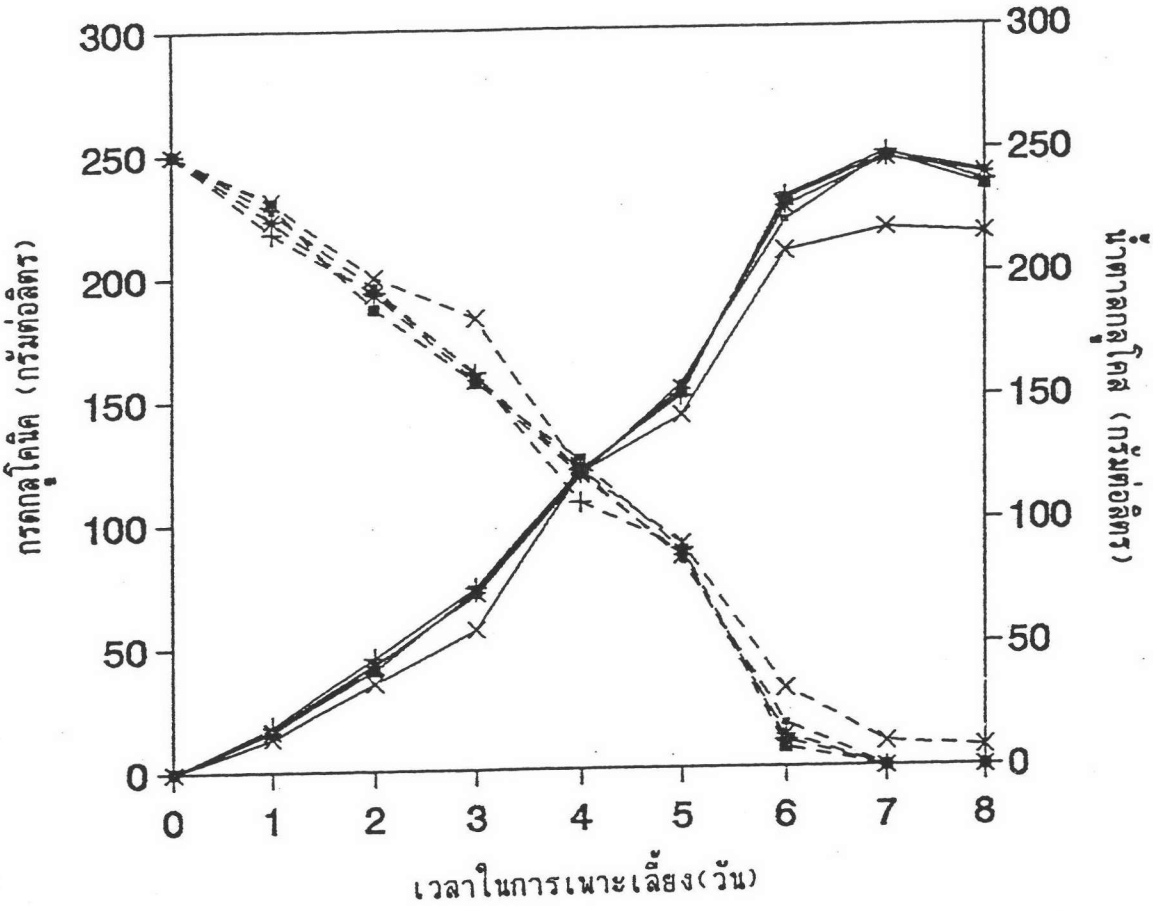
รูปที่ 36 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงความหนาแน่นของสายใยตริงที่เจริญอยู่บริเวณผิวของเม็ดเจลที่ได้จากการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริงสูตรที่ 2 ในการผลิตครั้งแรก และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดังกล่าวแต่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในการใช้ซ้ำอีก 5 ครั้ง ขยาย 10000 เท่า



รูปที่ 37 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตริง *Aspergillus* sp. G153 เมื่อเก็บเม็ดเจลสปอร์ตริงไว้ที่ 6 องศาเซลเซียสเป็นเวลาต่าง ๆ กันก่อนนำมาทำให้สปอร์ตริงงอก เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค
--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ
—•— หมายถึง เก็บไว้ 0 วัน
—+— หมายถึง เก็บไว้ 1 วัน
—*— หมายถึง เก็บไว้ 3 วัน
—■— หมายถึง เก็บไว้ 5 วัน
—×— หมายถึง เก็บไว้ 7 วัน

การใช้น้ำตาลของเม็ดเจลสายใยตริงที่เก็บไว้เป็นเวลา 0 1 3 และ 5 วัน เป็นไปอย่างรวดเร็วใกล้เคียงกันตั้งแต่วันแรกของการผลิตจนหมดในวันที่ได้ผลผลิตกรดสูงสุด ส่วนการใช้น้ำตาลในแต่ละวันของเม็ดเจลสายใยตริงที่เก็บไว้เป็นเวลา 7 วันช้ากว่า ดังจะเห็นได้ว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ยังคงมีน้ำตาล (รูปที่ 38)



รูปที่ 38 การผลิตกรดกลูโคนิคโดยเม็ดเจลสายใยตรึงที่เก็บไว้ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กันก่อนนำมาผลิตกรด เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

—— หมายถึง ปริมาณกรดกลูโคนิค
--- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ
—•— หมายถึง เก็บไว้ 0 วัน
—+— หมายถึง เก็บไว้ 1 วัน
—*— หมายถึง เก็บไว้ 3 วัน
—■— หมายถึง เก็บไว้ 5 วัน
—×— หมายถึง เก็บไว้ 7 วัน