บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการวิจัย

1. น้ำตาลทราย (refined cane sugar) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีอีกชนิดหนึ่งในการผลิตกรดกลูโคนิกโดยให้ผลผลิตสูงและมีน้ำตาลฟรักโทสในปริมาณมากเป็นผลผลิตร่วม

2. ในการผลิตกรดกลูโคนิกระดับขวดเขย่า พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสมนั้นสูงมากคือ 450 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสเท่ากับ 274.08 และ 194.05 กรัมต่อลิตร แต่ใช้เวลาในการผลิตนานมากคือ 19 วัน

3. อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลทรายโดยมีน้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วมในขวดเขย่าเท่ากับ 250:0.5 โดยให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสเท่ากับ 288.56 และ 179.39 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในวันที่ 19 เมื่อใช้น้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

4. เมื่อขยายส่วนการผลิตโดยผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าไม่สามารถใช้ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตรซึ่งเหมาะสมในระดับขวดเขย่าทำการผลิตได้ เนื่องจากเกิดตะกอนของแคลเซียมกลูโคเนตจำนวนมากในถังหมักซึ่งส่งผลรบกวนการผลิต

5. การผลิตในถังหมักใช้เวลาน้อยกว่าการผลิตในขวดเขย่ามาก โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตระดับถังหมักต่ำกว่าขวดเขย่าไม่มากนัก แต่เวลาที่ใช้ในการผลิตน้อยกว่ามาก กล่าวคือ ความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสมในการผลิตในถังหมักเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลผลิตกรดกลูโคนิก 186.4 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลฟรักโทส 107.95 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการผลิตเพียง 56 ชั่วโมง

6. ขนาดหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตระดับถังหมัก 5 ลิตรเท่ากับ 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)

7. ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะต่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยมีน้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วมเท่ากับ 6.0-6.5 ตลอดการทดลอง

น้ำตาลฟรักโทส มีค่าเท่ากับ 500 รอบต่อนาที และ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

9. เมื่อจัดภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตในถังหมัก สามารถลดระยะเวลาในการผลิตลงได้ และภาวะที่เหมาะสมในการผลิตระดับถังหมักคือ น้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร ขนาดหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้กรดกลูโคนิก 183.29 กรัมต่อลิตรและฟรักโทส 106.78 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาเพียง 46 ชั่วโมง

10. ผลการวิเคราะห์กรดอินทรีย์และน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง พบว่า *Aspergillus niger* G153 ผลิตกรดอินทรีย์เพียงชนิดเดียวคือ กรดกลูโคนิก และมีน้ำตาลเพียงชนิดเดียวคือน้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม

11. การแยกผลิตภัณฑ์ทั้งสองที่เกิดร่วมกันคือแคลเซียมกลูโคเนตและน้ำตาลฟรักโทสทำได้ง่าย โดยสามารถแยกผลผลิตที่ได้ออกจากกันได้โดยอาศัยสมบัติการตกผลึกในที่เย็นของแคลเซียมกลูโคเนตได้เป็นตะกอนสีขาว เกาะกันเป็นรูปร่างคล้ายดอกกะหล่ำ ขณะที่น้ำตาลฟรักโทสที่อยู่ในน้ำหมักไม่เกิดการตกผลึกยังคงอยู่ในรูปของของเหลว จึงแยกจากกันได้ง่ายมาก

12. จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า งานวิจัยนี้ได้ค้นพบว่า *Aspergillus niger* G153 เป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีสมบัติที่ดีเพิ่มขึ้นอีกประการหนึ่งคือ เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลผลิตกรดกลูโคนิกและน้ำตาลฟรักโทสในปริมาณมากทั้งสองชนิด ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดลอง พบว่าสามารถใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีอีกชนิดหนึ่งในการผลิตกรดกลูโคนิกโดยให้ผลผลิตสูงและมีน้ำตาลฟรักโทสเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองในปริมาณมาก ซึ่งยังไม่มีรายงานใดกล่าวถึงการผลิตกรดกลูโคนิกร่วมกับน้ำตาลฟรักโทสในปริมาณมากทั้งสองชนิด มีเพียงงานวิจัยของ Holstein และ Holsing (1962) ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตลีวูโรส (levulose) พบว่ามีกรดกลูโคนิกปนมาด้วย (อ้างถึงใน Casida, 1964) และในปี 1980 Muller และคณะได้ใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในสภาวะที่มีตัวเร่ง ซึ่งเป็นวิธีทางเคมีไม่ใช่วิธีการหมักโดยจุลินทรีย์ เปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิก แต่ฟรักโทสที่ผสมอยู่ด้วยยังคงรูปเดิมไม่

ได้ถูกเปลี่ยนเป็นกรด และ Novak และคณะ (1996) พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน มีการสร้างโอลิโกฟรุกโทไซด์ชนิดคีสโทสและนีสโทสเป็นผลผลิตร่วมกับกรดกลูโคนิกและในช่วงท้ายของการผลิตได้ฟรักโทสปนมาบ้าง ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้ที่พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้นำกลูโคสทั้งหมดไปใช้ผลิตกรดกลูโคนิก แต่เกือบไม่ใช้ฟรักโทสไปเพื่อผลิตกรดกลูโคนิกเลย จึงได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สองที่มีประโยชน์ในปริมาณมาก จึงเป็นรายงานฉบับแรกที่รายงานเกี่ยวกับภาวะในการผลิตกรดกลูโคนิกและน้ำตาลฟรักโทสร่วมกันโดยวิธีการหมักด้วยจุลินทรีย์และจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพสูงมาก การที่เหลือฟรักโทสมาก แสดงว่าจุลินทรีย์ใช้ฟรักโทสไปเพื่อการผลิตได้น้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับรติกร กัณฑะพงศ์ (2534) ที่ทดลองพบว่าฟรักโทสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยจุลินทรีย์สายพันธ์นี้ จึงนำแหล่งคาร์บอนนี้ไปใช้เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกได้น้อยมาก

การผลิตกรดกลูโคนิกเกิดขึ้นทันทีที่รามีการเติบโต เมื่อการเติบโตเพิ่มขึ้นการผลิตกรดก็เพิ่มเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีว่ากรดกลูโคนิกเป็นสารปฐมภูมิ (primary metabolite) นั่นคือกรดจะถูกสร้างไปพร้อมกับการเจริญของสายใย (Milsom และ Meers, 1985) ในการผลิตกรดกลูโคนิกระดับขวดเขย่าโดย *Aspergillus niger* G153 ใช้เวลาในการผลิตนานมากคือ 19 วัน โดยที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกในขวดเขย่า ให้การผลิตและการเติบโตที่เหมาะสม แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลทรายเป็น 550 กรัมต่อลิตร พบว่าการผลิตลดลงอย่างมากและการเติบโตของราก็ลดลงเช่นกัน และที่ความเข้มข้น 600 กรัมต่อลิตรไม่พบการผลิตและเติบโตของรา ซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นที่สูงมากของน้ำตาลทรายในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจทำให้จุลินทรีย์ต้องสูญเสียน้ำภายในออก ทำให้กระบวนการเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์หยุดชะงัก การเติบโตถูกยับยั้ง (Pelczar และคณะ, 1993) ซึ่งเป็นเหตุให้การเติบโตของ *A. niger* G153 ลดลงและผลิตกรดกลูโคนิกได้น้อยโดยประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก ($Y_{P/S}$) ที่ความเข้มข้น 550 กรัมต่อลิตร มีค่าเพียง 0.33 เท่านั้น ขณะที่ความเข้มข้น 450 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตสูงสุดมีประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก ($Y_{P/S}$) สูงสุดคือเท่ากับ 0.56 (ตารางที่ 10)

สำหรับการใช้น้ำตาลทรายของ *A. niger* G153 พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองยังคงพบน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ และน้ำตาลฟรักโทส ที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกันมาก แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลที่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อน่าจะเป็นน้ำตาลฟรักโทส เมื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะ

สูงพบว่ามีเพียงน้ำตาลฟรักโทสเท่านั้นที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลทรายของ *A. niger* G153 จะได้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม โดยปริมาณฟรักโทสที่เหลืออยู่ต่ำกว่าปริมาณที่ได้จากการแตกตัวของซูโครสเล็กน้อย โดยมีค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตน้ำตาลฟรักโทสไม่ถึงร้อยละ 50 แสดงว่าฟรักโทสเพียงบางส่วนถูกนำไปใช้เพื่อการเติบโตและการผลิตกรด ขณะที่ฟรักโทสเกือบทั้งหมดยังคงเหลือเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเนื่องจากกลูโคสทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกนำไปใช้ในการผลิตกรดและการเติบโต แสดงว่าจุลินทรีย์สายพันธ์นี้สามารถใช้น้ำตาลทรายได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดคือให้ผลิตภัณฑ์สูงมากทั้งสองชนิด

และในการทดลองพบว่าผลผลิตกรดกลูโคนิกที่ได้ในทุกความเข้มข้นน้ำตาลทรายที่แปรผัน ส่วนใหญ่มีปริมาณกรดกลูโคนิกที่ได้สูงกว่าปริมาณกรดสูงสุดที่ควรจะได้จากน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในน้ำตาลทราย ณ ความเข้มข้นนั้นๆ ขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรักโทสที่เหลือต่ำกว่าค่าที่ควรจะเป็น จึงมีความเป็นไปได้ว่ากรดกลูโคนิกส่วนหนึ่งน่าจะมาจากน้ำตาลฟรักโทส จากงานวิจัยของ รติกร กัณฑะพงศ์ (2534) พบว่า *A. niger* G153 สามารถใช้ฟรักโทสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดกลูโคนิกได้เล็กน้อยคือเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่ดี โดยสามารถผลิตกรดกลูโคนิกได้คิดเป็นปริมาณร้อยละ 25 เมื่อเทียบกับกลูโคส ซึ่งโดยปกติกลูโคสเป็นวัตถุดิบที่ดีและเหมาะที่สุดที่ใช้ผลิตกรดกลูโคนิก เนื่องจากกรดกลูโคนิกเกิดจากการเติมออกซิเจนให้กับโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส การที่ *A. niger* G153 สามารถนำฟรักโทสมาใช้ผลิตกรดกลูโคนิกได้อาจเนื่องมาจากฟรักโทสมีการเปลี่ยนรูปไปเป็นกลูโคส โดยที่น้ำตาลทั้งสองชนิดเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ประกอบด้วย C จำนวน 6 อะตอม H จำนวน 12 อะตอมและ O จำนวน 6 อะตอมเท่ากัน การเปลี่ยนรูปไปมาระหว่างกลูโคสและฟรักโทสนั้นอาจเกิดได้หลายวิธีเช่น น้ำตาลฟรักโทสอาจเกิดการเปลี่ยนรูปไปมาระหว่างน้ำตาลกลูโคส ฟรักโทส และแมนโนส หรือเปลี่ยนรูปจากฟรักโทสเป็นกลูโคสในลำไส้และตับ หรือเปลี่ยนรูปไปมาระหว่างกลูโคสกับฟรักโทส (กล้าณรงค์ ศรีรอด, 2531; Mahler และ Corder, 1971; Mayes, 1993) และน้ำตาลฟรักโทสบางส่วนจำนวนเล็กน้อยที่เปลี่ยนรูปไปเป็นกลูโคสก็จะถูกนำไปใช้ในการเติบโตและผลิตกรดกลูโคนิกได้ จึงส่งผลให้ปริมาณกรดกลูโคนิกที่ได้ทั้งหมดมีค่าสูงกว่าปริมาณกรดที่เกิดจากกลูโคสทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อคิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก พบว่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงที่มีค่าสูงกว่าร้อยละ 50 แสดงว่าปริมาณกรดกลูโคนิกที่ได้มีปริมาณสูงกว่าปริมาณกรดที่ผลิตจากกลูโคส และน่าจะมีการเปลี่ยนรูปของฟรักโทสเป็นกลูโคสและใช้ผลิต

กรดกลูโคนิก โดยที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตรมีค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดคือเท่ากับ 55.94 และผลิตกรดกลูโคนิกได้ 274.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณกรดที่ได้จากกลูโคส ขณะที่มีฟรักโทสเหลืออยู่ 194.05 กรัมต่อลิตรซึ่งน้อยกว่าปริมาณฟรักโทสทั้งหมดที่ควรจะเป็นคือเท่ากับ 225 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสเท่ากับ 43.12 การที่ฟรักโทสทั้งหมดไม่ถูกนำไปใช้เพื่อการเติบโตและผลิตกรดยังไม่ทราบปัจจัยที่แน่ชัด โดยมีข้อสันนิษฐานที่น่าจะเป็นไปได้บางประการคือ

- ฟรักโทสปริมาณเล็กน้อยจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสและนำไปใช้ได้น้อย ถ้ากลูโคสยังไม่หมด
- จุลินทรีย์สายพันธุ์นี้สามารถใช้แคลเซียมกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเติบโต (รติกร กัณฑะพงศ์, 2534) และอาจจะใช้ได้ง่ายกว่าฟรักโทส ทำให้จุลินทรีย์เลือกใช้แคลเซียมกลูโคเนตแทน ฟรักโทสจึงยังคงเหลืออยู่มากในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะเห็นได้จากการที่ปริมาณแคลเซียมกลูโคเนตลดลงภายหลังผลิตได้สูงสุดแล้ว (เป็นช่วงเวลาที่กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดแล้ว)
- ประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่เปลี่ยนฟรักโทสเป็นกลูโคสของจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้อาจทำงานได้ไม่ดีในภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิกก็ได้ จึงกลับเป็นผลดีที่ทำให้ได้ฟรักโทสซึ่งมีประโยชน์มากร่วมด้วยและแยกจากแคลเซียมกลูโคเนตได้ง่ายอีกด้วย

การที่การผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลทรายระดับขวดเขย่าใช้เวลาในการผลิตนานมากคือ 19 วัน เมื่อเทียบกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้เวลาเพียง 5 วัน (รติกร กัณฑะพงศ์, 2534) เพราะซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ต้องมีการสลายพันธะให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนจึงนำน้ำตาลไปใช้ได้ อีกทั้งปริมาณน้ำตาลทรายที่ใช้มีความเข้มข้นสูงมากทำให้ราต้องใช้เวลานานในการสลายพันธะ การสลายซูโครสจะได้กลูโคสและฟรักโทสอย่างละครึ่งหนึ่ง ดังนั้นที่ความเข้มข้นซูโครส 450 กรัมต่อลิตร เมื่อถูกสลายจะได้เป็นกลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 225 กรัมต่อลิตร และจากผลการทดลองพบว่ายังคงมีน้ำตาลฟรักโทสจำนวนมากเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อขณะที่ไม่พบน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่เลยแสดงว่ากลูโคสทั้งหมดถูกนำไปใช้ในการเติบโตและผลิตกรดกลูโคนิก ซึ่งจากการที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 450 กรัมต่อลิตรมีกลูโคสเท่ากับ 225 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่รายงานในงานวิจัยของ รติกร กัณฑะพงศ์ (2534) บาจรีย์ จันทราภานุกร (2536) และนิติพงษ์ จิระวรานันท์ (2539) ว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ที่เหมาะสมต่อการผลิต

กรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตโดย *Aspergillus niger* G153 ในระดับขวดเขย่าเท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร ถ้าเพิ่มความเข้มข้นมากกว่านี้ก็ไม่ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างคุ้มค่า ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันอีกขั้นหนึ่งว่าการใช้น้ำตาลทรายผลิตกรดกลูโคนิก ความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 2 เท่าของความเข้มข้นกลูโคสที่เหมาะสม จึงเท่ากับการใช้กลูโคสผลิตนั่นเอง แต่ใช้น้ำตาลทรายถูกกว่ามากและได้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วมในปริมาณมากเพิ่มขึ้นมาอีกด้วย อีกทั้งการแยกผลิตภัณฑ์ทั้งสองก็ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการแยกเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต และถึงแม้จะไม่ต้องการใช้ฟรักโทสที่ผลิตร่วมด้วยก็สามารถทิ้งไปเช่นเดียวกับการทิ้งของเหลวใสที่เหลือจากการตกตะกอนแยกแคลเซียมกลูโคเนตออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสนั่นเอง จึงเท่ากับผลิตกรดกลูโคนิกได้เท่ากับใช้กลูโคส แต่ใช้วัตถุดิบราคาถูกกว่าและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์เพิ่มมาอีกผลิตภัณฑ์หนึ่งอีกด้วย

แหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเติบโตของรา ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมจะช่วยให้ราเติบโตและผลิตกรดกลูโคนิกได้มาก ถ้าปริมาณไนโตรเจนมากหรือน้อยเกินไปก็จะส่งผลเสียต่อการผลิตคือทำให้ได้ผลผลิตไม่มากเท่าที่ควร (Milsom และ Meers, 1985) จึงทดลองแปรอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน พบว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมเท่ากับ 250:0.5 โดยให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสเท่ากับ 288.56 และ 169.39 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในวันที่ 19 เมื่อใช้น้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และอัตราส่วน 250:1.5 ให้ปริมาณกรดกลูโคนิกต่ำสุดคือเท่ากับ 204.31 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการเติบโตของ *A. niger* G153 พบว่าเมื่อปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น การเติบโตก็เพิ่มตามไปด้วย นั่นคือได้น้ำหนักสายใยแห้งเพิ่มขึ้น แต่ที่อัตราส่วน 250:1.5 กลับมีน้ำหนักสายใยแห้งต่ำสุด ทั้งที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงสุด และเมื่อวัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ วันสุดท้ายของการทดลอง พบว่าทุกอัตราส่วนยังมีแอมโมเนียมซัลเฟตเหลืออยู่โดยที่อัตราส่วน 250:0.25 250:0.5 250:1.0 และ 250:1.5 มีค่าเท่ากับ 0.1 0.50 1.36 และ3.19 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จะเห็นว่ายังคงมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเหลืออยู่ในทุกอัตราส่วน แต่การเติบโตในช่วงท้ายการทดลองของทุกอัตราส่วนกลับมีแนวโน้มคงที่หรือลดลง อาจเป็นเพราะกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด จึงต้องนำเอาฟรักโทสและแคลเซียมกลูโคเนตมาเป็นแหล่งคาร์บอน (รติกร กัณฑะพงศ์, 2534) ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลผลิตทั้งสองมีปริมาณลดลงในช่วงท้ายการทดลอง แต่การนำเอาฟรักโทสและแคลเซียมกลูโคเนตอาจยุ่งยากกว่าการใช้กลูโคส และสายใยส่วนใหญ่เริ่มเข้าสู่ช่วงท้ายของวงจรชีวิต (stationary phase และ death phase) ทำให้การเติบโต

ต่ำลงและมีแอมโมเนียมซัลเฟตบางส่วนเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้จะเห็นว่าอัตราส่วน 250:1.5 มีแอมโมเนียมซัลเฟตเหลือมาก การที่อัตราส่วนนี้รามีการเติบโตได้น้อยที่สุด ทั้งที่มีปริมาณไนโตรเจนมากที่สุดและปริมาณแหล่งคาร์บอนไม่แตกต่างจากค่าอัตราส่วนอื่นๆ อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่สูงมากทำให้เกิดแรงดันออสโมติกสูง จุลินทรีย์ต้องสูญเสียน้ำภายในเซลล์ ทำให้กระบวนการเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์หยุดชะงัก การเติบโตถูกยับยั้ง (Pelczar และคณะ, 1993) เป็นภาวะที่กดดันทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถมีกิจกรรมตามปกติได้ ทำให้ราเติบโตได้ไม่ดี จึงผลิตกรดกลูโคนิกได้น้อย โดยประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.42 เท่านั้น ขณะที่อัตราส่วนอื่นๆ มีค่า $Y_{P/S}$ อยู่ในช่วง 0.55-0.59 โดยเฉพาะอัตราส่วน 250:0.5 มีค่า $Y_{P/S}$ สูงสุดคือ 0.59 รองลงมาคืออัตราส่วน 250:1.0 และ 250:0.25 เท่ากับ 0.57 และ 0.55 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก ($Y_{P/X}$) พบว่า อัตราส่วน 250:0.5 มีค่าสูงสุดเช่นกันคือเท่ากับ 161.21 รองลงมาคืออัตราส่วน 250:0.25 และ 250:1.0 เท่ากับ 159.95 และ 130.87 ตามลำดับ แสดงว่าที่อัตราส่วน 250:0.5 เป็นอัตราส่วนที่สมดุลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนมากกว่าอัตราส่วนอื่นๆ คือมีปริมาณไนโตรเจนที่พอต่อการเติบโตของรา ทำให้รามีการเติบโตและมีประสิทธิภาพของเซลล์ในการผลิตกรดสูง ในส่วนการใช้น้ำตาลพบว่ายังคงมีน้ำตาลฟรักโทสจำนวนมากเหลืออยู่ ขณะที่ฟรักโทสเล็กน้อยบางส่วนถูกนำไปใช้เพื่อการเติบโตและผลิตกรดกลูโคนิก โดยที่อัตราส่วน 250:0.25 250:0.5 และ 250:1.0 มีค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกสูงกว่าร้อยละ 50 แสดงว่ามีการเปลี่ยนรูปของฟรักโทสเป็นกลูโคสและถูกผลิตเป็นกรดกลูโคนิกและพบว่าอัตราส่วน 250:0.5 มีร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดคือเท่ากับ 58.89 เท่ากับได้ปริมาณกรดกลูโคนิก 288.56 กรัมต่อลิตร ขณะที่มีฟรักโทสเหลืออยู่ 179.39 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสเท่ากับ 39.86 แสดงว่าจากปริมาณฟรักโทสทั้งหมด 225 กรัมต่อลิตรที่ได้จากการย่อยน้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตร ราสามารถใช้ฟรักโทสเพื่อการเติบโตและผลิตกรดกลูโคนิกคิดเป็นร้อยละ 20.27 ของปริมาณฟรักโทสทั้งหมดที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ฟรักโทสส่วนใหญ่ที่เหลืออยู่ในปริมาณมากจึงได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สองร่วมกับกรดกลูโคนิก

จะเห็นว่าการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลทราย มีอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 250:0.5 ขณะที่การผลิตกรดกลูโคนิกจากกลูโคสและแป้งไฮโดรไลเสสเป็นแหล่งคาร์บอน มีความต้องการไนโตรเจนในปริมาณที่สูงกว่าคือมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 250:4 (รติกร กัณฑะพงศ์, 2534; บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536) ดังนั้นการใช้น้ำตาล

ทรายเป็นแหล่งคาร์บอนนอกจากจะเป็นการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกแล้ว ยังลดปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นการประหยัดอีกทางหนึ่งด้วย

เมื่อขยายส่วนการผลิตสู่ถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตรซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตระดับขวดเขย่า พบว่าการผลิตกรดกลูโคนิกเกิดขึ้นเร็วมาก โดยในชั่วโมงที่ 8 ก็ให้ผลผลิตพอควรแล้วคือ 12.23 กรัมต่อลิตร แต่ที่ความเข้มข้นนี้ไม่สามารถทำการผลิตจนได้ผลผลิตกรดสูงสุด เนื่องจากเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตจำนวนมากในถังหมักรบกวนการผลิต โดยตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตที่เกิดขึ้นทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูงมาก ส่งผลให้การกวนและการให้อากาศเป็นไปอย่างไม่ทั่วถึง เมื่อลดความเข้มข้นน้ำตาลทรายเป็น 350 กรัมต่อลิตร ก็พบปัญหาเช่นเดียวกันคือมีตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตจำนวนมากรบกวนการผลิต และพบว่าทั้งสองความเข้มข้นนี้ยังคงมีน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสับสเตรทหลักในการผลิตกรดกลูโคนิกเหลืออยู่ จึงเป็นความเข้มข้นที่มากเกินไปใช้วัตถุดิบไม่หมดและการผลิตเป็นไปได้ไม่สมบูรณ์ แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตรพบว่าสามารถดำเนินการทดลองจนได้ปริมาณกรดสูงสุดคือ 186.4 กรัมต่อลิตรใช้เวลาเพียง 56 ชั่วโมง และให้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 107.95 กรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้นนี้แม้จะเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตเช่นเดียวกับความเข้มข้น 450 และ 350 กรัมต่อลิตร แต่ตะกอนที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อยกว่า การกวนและการให้อากาศก็ยังคงเป็นไปอย่างทั่วถึง อีกทั้งไม่มีน้ำตาลกลูโคสเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหตุที่การผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตระดับถังหมักใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทรายได้น้อยกว่าการผลิตระดับขวดเขย่า อาจเนื่องจากการผลิตกรดกลูโคนิกระดับขวดเขย่าใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อขวดเขย่าน้อย รวมทั้งมีการเขย่าที่รุนแรงทำให้การผสมระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นได้ แม้จะมีตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่การผลิตระดับถังหมักใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อถังหมักมากและการกวนโดยใบพัดในถังหมักก็มีความรุนแรงน้อยกว่าการเขย่าขวด ดังนั้นเมื่อเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตจำนวนมากขึ้นในถังหมัก ก็จะทำให้การกวนและให้อากาศเป็นไปอย่างไม่ทั่วถึง ใบพัดหมุนตามปกติไม่ได้ ซึ่งการที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่ใช้ในการผลิตระดับถังหมักต่ำกว่าความเข้มข้นที่เหมาะต่อการผลิตระดับขวดเขย่านั้นสอดคล้องกับการทดลองของบาจรีย์ จันทราภานุกร (2536) พบว่าแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยที่มีความเข้มข้นกลูโคส 250 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะต่อการผลิตกรดกลูโคนิกระดับขวดเขย่า ขณะที่การผลิตกรดในถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้น ความเข้มข้นกลูโคสที่เหมาะต่ำกว่าคือใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยที่มีความเข้มข้นกลูโคสเพียง 150-

200 กรัมต่อลิตรเท่านั้น และ นิติพงษ์ จิระวรานันท์ (2539) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกจากสายใยตรึง พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของกลูโคสในการผลิตกรดระดับขวดเขย่าคือ 250 กรัมต่อลิตร ขณะที่การผลิตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศทางด้านล่างใช้ความเข้มข้นกลูโคสได้เพียง 50 กรัมต่อลิตร โดยที่ทั้งสองการทดลองนี้ก็พบปัญหาว่าตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตจำนวนมากที่เกิดขึ้นรบกวนการผลิตเช่นกัน และ Kundu และ Das (1987) รายงานว่าความสามารถในการละลายน้ำของแคลเซียมกลูโคเนตมีประมาณ 4% และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นมากกว่า 15% จะทำให้แคลเซียมกลูโคเนตในปริมาณที่มากพอที่จะทำให้เกิดการตกตะกอนของเกลือชนิดนี้และมีผลยับยั้งการหมัก โดยที่การมีน้ำตาลฟรักโทสร่วมอยู่ด้วยไม่ได้ส่งผลเพิ่มความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการละลายน้ำของฟรักโทสเกิดขึ้นได้สูงและและความหนืดที่เกิดจากการละลายมีค่าต่ำเมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสและซูโครส (กล้าณงค์ ศรีรอด, 2531) ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่าสามารถใช้ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตรในการผลิตระดับถังหมัก 5 ลิตร ได้โดยที่ตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตที่เกิดขึ้นยังไม่มากพอที่จะส่งผลยับยั้งการผลิต และความเข้มข้นนี้ยังเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด โดยเมื่อเทียบกับความเข้มข้นน้ำตาลทราย 250 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกสูงกว่ามาก แต่ใช้เวลาในการผลิตให้ได้กรดสูงสุดมากกว่าเพียง 4 ชั่วโมง และมีค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสเท่ากับ 57.06 และ 35.98 ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 250 กรัมต่อลิตร มีค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสเท่ากับ 54.70 และ 40.84 ตามลำดับ จะเห็นว่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสของทั้งสองความเข้มข้นแตกต่างกันไม่มากนัก ดังนั้นความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร มากกว่าความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร เนื่องจากรายังคงมีประสิทธิภาพในการทำงานได้ดี และแม้จะใช้เวลาในการผลิตต่อรอบการผลิตนานกว่าเล็กน้อย แต่สามารถผลิตกรดกลูโคนิกได้ปริมาณที่สูงในหนึ่งรอบการผลิต จึงคุ้มค่ากว่าและในการใช้น้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตรเมื่อย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกจะได้กลูโคสและฟรักโทสอย่างละ 150 กรัมต่อลิตร แต่จากการทดลองพบว่าได้กรดกลูโคนิกเท่ากับ 186.40 กรัมต่อลิตรและฟรักโทส 107.95 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 56 แสดงว่ามีการนำฟรักโทสเพียงเล็กน้อยไปใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิก แต่ยังคงได้ผลิตภัณฑ์ทั้งสองในปริมาณมาก และเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นที่เหมาะสม) เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าได้

กรดกลูโคนิก 191.28 กรัมต่อลิตรในเวลา 24 ชั่วโมง (บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536) จะเห็นได้ว่าการใช้น้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลผลิตไล่เลี่ยกับการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร เนื่องจากจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้สามารถนำฟรักโทสบางส่วนมาใช้ผลิตกรดกลูโคนิกได้ แต่ฟรักโทสส่วนใหญ่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บเกี่ยวแยกจากกรดกลูโคนิกได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สอง ดังนั้นการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลทรายจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจมากอีกทางหนึ่ง โดยให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกไม่ต่างจากการใช้กลูโคสนั่นคือที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร เมื่อถูกสลายพันธะไกลโคซิดิกจะได้น้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร พบว่าผลผลิตกรดกลูโคนิกที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการใช้น้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ได้ฟรักโทสเพิ่มขึ้นมาปริมาณมาก เพราะฉะนั้นจะได้มูลค่าของผลผลิตสูงขึ้นมากทำให้ต้นทุนของผลิตภัณฑ์ทั้งสองต่ำลง จึงเหมาะสมที่จะผลิตในอุตสาหกรรม

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่าและถังหมัก ภายใต้ความเข้มข้นน้ำตาลทรายที่เหมาะสมของแต่ละระดับ นอกจากความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลทรายจะต่างกันแล้ว เวลาและน้ำหนักสายใยแห้งยังแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยการผลิตระดับถังหมักใช้เวลาสั้นกว่ามากและได้น้ำหนักสายใยแห้งที่สูงกว่า โดยได้ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 186.40 กรัมต่อลิตรจากน้ำตาลทรายตั้งต้น 300 กรัมต่อลิตร ในเวลาเพียง 56 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 3.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 3.68 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตระดับขวดเขย่าใช้เวลาถึง 456 ชั่วโมง (19 วัน) ได้ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 274.08 กรัมต่อลิตรจากน้ำตาลทรายตั้งต้น 450 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 0.60 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและได้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 2.09 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อคิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก พบว่าค่าที่ได้จากการผลิตในระดับถังหมักและขวดเขย่าไล่เลี่ยกันคือเท่ากับ 57.06 และ 55.94 ตามลำดับ เหตุที่การผลิตในถังหมักใช้เวลาสั้นกว่าขวดเขย่ามาก เนื่องมาจากการผลิตในถังหมักมีการกวนและการให้อากาศเป็นการเพิ่มออกซิเจนทำให้สารต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อและออกซิเจนแพร่กระจายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีและทั่วถึงกัน และยังทำให้การสัมผัสกันระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อ ออกซิเจน และราเกิดขึ้นได้ดี สำหรับ *A. niger* G153 แล้ว การได้รับออกซิเจนอย่างพอเพียง นอกจากจะส่งเสริมการเติบโตแล้วยังช่วยให้ผลิตกรดกลูโคนิกได้ดีอีกด้วย เนื่องจากการผลิตกรดกลูโคนิกเป็นกระบวนการออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคสโดยตรงไปเป็นกรดกลูโคนิก มีความต้องการออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ผลิตกรด เมื่อมีการ

กวนและให้อากาศจึงเป็นการเพิ่มออกซิเจนให้กับระบบ ทำให้ปริมาณออกซิเจนเติมได้อย่างเต็มที่สมบูรณ์เพียงพอต่อความต้องการของรา การผลิตกรดจึงเกิดขึ้นได้เร็วขึ้นและใช้เวลาในการผลิตลดลงอย่างมาก

จากการทดลองแปรขนาดหัวเชื้อ พบว่าเมื่อเพิ่มขนาดหัวเชื้อจะทำให้มีการเติบโตเร็วกว่าและมากกว่าขนาดหัวเชื้อที่ต่ำกว่า และยังผลิตกรดกลูโคนิกได้เร็วขึ้นอีกด้วย โดยที่ขนาดหัวเชื้อ 15% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 4.83 กรัมต่อลิตรและใช้เวลา 48 ชั่วโมงในการผลิตได้กรดกลูโคนิกสูงสุด แต่ปริมาณกรดที่ได้ต่ำกว่าปริมาณกรดที่ได้จากขนาดหัวเชื้ออื่นๆ ขณะที่ปริมาณฟรักโทสที่ได้ไล่เลี่ยกันและสามารถใช้ซูโครสและกลูโคสได้หมดในทุกขนาดหัวเชื้อ แสดงว่าปริมาณสายใยที่เพิ่มขึ้นไม่ได้เพิ่มการใช้ฟรักโทสเลย แต่กลับใช้กลูโคสไปในการเติบโตมากขึ้นทำให้ผลผลิตกรดลดลง ขณะที่ขนาดหัวเชื้อ 7 10 และ 12% ให้ปริมาณกรดกลูโคนิกไล่เลี่ยกัน โดยขนาดหัวเชื้อ 10% ให้กรดสูงสุดคือ 187.51 กรัมต่อลิตร โดยมีฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 112.54 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกสูงกว่าขนาดหัวเชื้อ 7 และ 12% คือเท่ากับ 3.61 กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง จัดได้ว่าขนาดหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) เป็นขนาดหัวเชื้อที่มีความสมดุลย์ระหว่างการเติบโตและการผลิตกรดมากที่สุด จึงเลือกใช้ขนาดหัวเชื้อนี้ในการผลิตกรดกลูโคนิกร่วมกับน้ำตาลฟรักโทสจากน้ำตาลทรายในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Blom และคณะ(1952) พบว่าปริมาณหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ของ *Aspergillus niger* NRRL3 เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิก เนื่องจากช่วยลดเวลาที่ใช้ในการผลิตและเกิดการหมักอย่างรวดเร็ว แต่บาจรีย์ จันทรานุกร (2536) ทดลองผลิตแคลเซียมกลูโคเนตในถังหมักที่มีการกวนและการให้อากาศโดย *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ พบว่าปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิกจากแป้งไฮโดรไลเสสในถังหมักขนาด 5 ลิตร เท่ากับ 7% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการทดลองนี้ใช้น้ำตาลทราย เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งต้องมีการสลายพันธะไกลโคซิดิกของซูโครสโดยเอนไซม์อินเวอร์เทสได้เป็นกลูโคสและฟรักโทสก่อนนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ผลิตกรดกลูโคนิก แต่การใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยจากรายงานของบาจรีย์ จันทรานุกร (2536) จุลินทรีย์สามารถนำกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยไปผลิตได้ทันที จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ใช้หัวเชื้อขนาดน้อยกว่าเล็กน้อย

เมื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสจากน้ำตาลทรายเป็น 2 ช่วงคือช่วงแรกเท่ากับ 4.5 5.5 และ 6.5 หลังจากนั้นปรับเท่ากับ 6.0-6.5 จนสิ้นสุดการทดลอง พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0-6.5 ตลอดการทดลองเป็นค่าที่การสลายโมเลกุลซูโครสเป็นกลูโคสและฟรักโทสดีและเร็วที่สุด โดยดูจากปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ลดลงอย่างรวดเร็วกว่า โดยเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกที่ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-6.5 ตลอดการทดลองมีการสลายของน้ำตาลทรายสูงสุด รองลงมาคือค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 และ 4.5 ตามลำดับ ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Rosenberg และคณะ (1992) ที่พบว่าการใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดกลูโคนิกต้องมีขั้นตอนย่อยน้ำตาลซูโครสเป็นกลูโคสและฟรักโทสก่อนจึงนำไปใช้ และเอนไซม์อินเวอร์เทสของ *Aspergillus niger* CCM8004 จะทำงานได้ดีเมื่อค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 สำหรับการจัดค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0-6.5 ตลอดการทดลองเหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลทรายโดย *A. niger* G153 สามารถผลิตกรดกลูโคนิกได้สูงสุด และมีอัตราการผลิตกรดสูงสุด ในขณะที่ใช้เวลาสั้นกว่าค่าความเป็นกรดด่างอื่นๆและได้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วมถึง 111.45 กรัมต่อลิตร แต่การทดลองควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 12 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 4.5 และ 5.5 กลับใช้เวลาในการผลิตนานกว่าและและการแตกโมเลกุลของซูโครสเป็นกลูโคสและฟรักโทสก็ช้ากว่าที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 ตลอดการทดลอง อาจเนื่องจากที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 รามีการเติบโตสูงกว่ามากทั้งใน 12 ชั่วโมงแรกของการผลิตและเมื่อสิ้นสุดการทดลองก็ให้น้ำหนักสายใยแห้งที่สูงกว่า และค่าน้ำหนักสายใยแห้งที่สูงกว่านี้เพียงพอและเหมาะสม ทำให้จำนวนสายใยที่ผลิตกรดมีมาก การผลิตกรดจึงเกิดขึ้นเร็วเวลาที่ใช้จึงน้อยและเกิดสมดุลย์ระหว่างการเติบโตและการผลิต

ในการวิเคราะห์น้ำตาลชนิดต่างๆด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกที่ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-6.5 ตลอดการทดลองมีการสลายพันธะไกลโคซิดิกของน้ำตาลซูโครสสูงสุดโดยชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณน้ำตาลซูโครสเหลืออยู่ 86.95 กรัมต่อลิตร ขณะที่เมื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 ใน 12 ชั่วโมงแรกมีการสลายพันธะไกลโคซิดิกรองลงมาโดยพบน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 98.31 กรัมต่อลิตร และที่การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 ใน 12 ชั่วโมงแรกพบว่าเหลือน้ำตาลซูโครส 166.54 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นการสลายพันธะไกลโคซิดิกต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่ค่าความเป็นกรดด่างอื่นๆ คิดเป็นร้อยละการใช้น้ำตาลซูโครสที่ชั่วโมงที่ 12 ของการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างใน 12

ชั่วโมงแรกเป็น 4.5 5.5 และ 6.0-6.5 เท่ากับ 44.99 67.23 และ 71.02 ตามลำดับ จะเห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-6.5 การใช้น้ำตาลทรายสูงมากที่สุด แตกต่างกับการใช้น้ำตาลทรายที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.5 อย่างชัดเจน แต่หลังจากชั่วโมงที่ 12 ให้เท่ากับ 6.0-6.5 ในทุกการทดลองด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตตลอดช่วงการผลิตที่เหลือ พบว่าในการทดลองควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 12 ชั่วโมงแรกไว้ที่ 4.5 เมื่อเปลี่ยนเป็นค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 มีการใช้ของน้ำตาลซูโครสเร็วขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ขณะที่ในการทดลองควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 12 ชั่วโมงแรกไว้ที่ 5.5 เมื่อเปลี่ยนเป็นค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 มีการแตกตัวของน้ำตาลซูโครสเร็วขึ้น และในทั้งสองการทดลองที่แปรผันค่าความเป็นกรดด่าง 12 ชั่วโมงแรกเป็น 4.5 และ 5.5 ใช้น้ำตาลซูโครสได้หมดในเวลาไล่เลี่ยกันคือประมาณชั่วโมงที่ 60-64 ส่วนการทดลองควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 6.0-6.5 ตลอดการทดลอง ใช้น้ำตาลซูโครสหมดประมาณชั่วโมงที่ 56-60 ซึ่งเร็วกว่าเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่า *A. niger* G153 ย่อยน้ำตาลทรายได้ดีที่ความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 การที่น้ำตาลทรายถูกย่อยได้เร็ว ทำให้การนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้เกิดขึ้นได้เร็วด้วย เวลาที่ใช้ในการผลิตจึงน้อยกว่าการทดลองที่ควบคุมความเป็นกรดด่างใน 12 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 4.5 และ 5.5 จากผลการทดลองแสดงว่า *A. niger* G153 สามารถย่อยน้ำตาลทรายและผลิตกรดกลูโคนิกโดยมีน้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วมได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0-6.5 ตลอดการทดลอง ซึ่งต่างกับการทดลองของ Rosenberg และคณะ (1992) ที่ทำการทดลองกับ *A. niger* CCM8004 ซึ่งต้องปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2 ช่วงคือ ช่วง 12 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 4.5 และปรับเป็น 5.5 จนสิ้นสุดการทดลองเพื่อให้เหมาะกับการย่อยน้ำตาลซูโครสและผลิตกรดกลูโคนิก การที่พบว่า *A. niger* G153 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถใช้น้ำตาลซูโครสและผลิตกรดได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเดียวกันคือ 6.0-6.5 ถือเป็นการค้นพบข้อดีและข้อได้เปรียบของราสายพันธุ์นี้ทำให้ไม่ต้องยุ่งยากในการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างด้วยชุดควบคุมที่ต้องใช้ทั้งตัวเครื่องควบคุมและตัวส่งสัญญาณ เพราะการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.0-6.5 ดังการทดลองนี้ทำได้โดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์ เพียงแต่ใส่แคลเซียมคาร์บอเนตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้นเอง

เนื่องจากการผลิตกรดกลูโคนิกเป็นกระบวนการออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคสโดยตรงต้องมีออกซิเจนซึ่งเป็นปัจจัยหลักในการผลิต ดังนั้นการกวนและการให้อากาศจะทำให้เพิ่มปริมาณและการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้การผลิตในถังหมักใช้เวลาสั้นกว่าการผลิตในขวดเขย่าอย่างมากดังกล่าวข้างต้น แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องหาค่าการกวนที่เหมาะสมโดยพบว่าที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 187.51 สูง

กว่าอัตราการกวน 550 และ 600 รอบต่อนาทีประมาณ 13 กรัมต่อลิตร แต่เวลาที่ใช้ในการผลิตให้ได้กรดสูงสุดมากกว่าเพียง 8 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกของอัตราการกวน 500 550 และ 600 รอบต่อนาทีเท่ากับ 3.61 3.89 และ3.96 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลทรายของทุกอัตราการกวน พบว่าเวลาที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกับน้ำตาลรีดิวส์คือเวลาที่ซูโครสหมดไม่แตกต่างกันมากนักในทุกอัตราการกวนคือประมาณชั่วโมงที่ 40-44 และปริมาณฟรักโทสที่ได้เป็นผลผลิตร่วมก็มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่า *A. niger* G153 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้ดีพอๆกันในช่วงอัตราการกวน 500-600 รอบต่อนาที และไม่มีผลส่งเสริมการใช้น้ำตาลฟรักโทส แต่เหตุที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีใช้เวลานานกว่า น่าจะเนื่องจากการกระจายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นได้ไม่ดีเท่ากับอัตราการกวน 550 และ 600 รอบต่อนาที เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อหนืดมาก จึงทำให้ใช้เวลาในการผลิตให้ได้ปริมาณกรดสูงสุดนานกว่า แต่ที่อัตราการกวน 550 และ 600 รอบต่อนาที แม้จะมีการผสมกันระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อกับออกซิเจนที่ดีแต่พบว่าการกวนเกิดขึ้นค่อนข้างรุนแรง ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อ สายใยบางส่วน และตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตกระเด็นไปติดบริเวณรอบๆภายในถังหมัก จึงทำให้ปริมาณกรดกลูโคนิกและน้ำหนักสายใยแห้งที่ได้ต่ำกว่าอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ขณะที่ในส่วนของประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก ($Y_{P/X}$) ไม่แตกต่างกันมากนักในทุกอัตราการกวน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าอัตราการกวนในช่วง 500-600 รอบต่อนาทีเป็นช่วงอัตราการกวนที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิก ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของบาจรีย์ จันทรานุกร (2536) ที่ทดลองผลิตแคลเซียมกลูโคเนตจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยในถังหมักที่มีการกวนและการให้อากาศโดย *A. niger* G153 สายพันธ์เดียวกันนี้ พบว่าเมื่อมีการเพิ่มอัตราการกวนจะให้ได้ผลผลิตกรดสูงขึ้นและใช้เวลาสั้นลง และพบว่าอัตราการกวนที่เหมาะสมใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้คือ 500 รอบต่อนาทีเช่นกัน และเพื่อเป็นการใช้วัตถุดิบได้อย่างคุ้มค่าที่สุดและรักษาอายุการใช้งานของถังหมัก จึงเลือกใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีสำหรับการทดลองต่อไป

จากการทดลองแปรผันอัตราการให้อากาศพบว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.5 และ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้ผลผลิตกรดใกล้เคียงกัน ขณะที่อัตราการให้อากาศ 1.0 และ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีให้ผลผลิตที่ต่ำกว่าและใช้เวลามากกว่า เมื่อคิดเป็นอัตราการผลิตกรดกลูโคนิก ได้ว่าที่อัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีมีค่าสูงสุดคือเท่ากับ 3.98 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาคืออัตราการให้อากาศ 1.5 2.5 และ 1.0 ลิตรต่อลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีเท่ากับ 3.81 3.71 และ 3.40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ในส่วนการใช้น้ำตาล พบว่าเวลาที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกับน้ำตาลรีดิวส์ไม่แตกต่างกันมากนักในทุกอัตราการให้อากาศคือประมาณชั่วโมงที่ 40-44 และปริมาณฟรักโทสที่ได้เป็นผลผลิตร่วมก็มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่า *A. niger* G153 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้ดีพอๆกัน แต่ที่อัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีให้ ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดในเวลาที่น้อยที่สุด อาจเป็นเพราะที่ภาวะนี้มีความสมดุลระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อ สายใยราและปริมาณออกซิเจนมากที่สุด โดยพบว่าที่อัตราการให้อากาศนี้ให้น้ำหนักสายใยแห้งสูงสุดด้วยคือเท่ากับ 4.54 กรัมต่อลิตร ขณะที่อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีกลับมีการเติบโตและผลิตกรดกลูโคนิกได้ต่ำกว่าเล็กน้อย ทั้งที่มีปริมาณออกซิเจนมากกว่า แสดงให้เห็นว่าปริมาณอากาศที่มากเกินกว่าที่ราสามารถนำไปใช้ได้ทัน ไม่ได้ช่วยในการเติบโตหรือผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสเลยหากแต่เป็นการสูญเสียพลังงานไปโดยเปล่าประโยชน์ ขณะที่ปริมาณออกซิเจนที่น้อยกว่าความต้องการก็ส่งผลให้การเติบโตช้ากว่าและเวลาที่ใช้ผลิตกรดเพิ่มขึ้น จะเห็นได้ว่าปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตกรดมาก ถ้าให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอจะทำให้กระบวนการออกซิเดชั่นเกิดขึ้นได้ดีและเร็ว การผลิตกรดกลูโคนิกก็จะดีและเร็วตามไปด้วย ดังนั้นอัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีจึงเหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดย *A. niger* G153 มากที่สุด

การเลือกใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกเป็นวิธีที่สำคัญวิธีหนึ่งที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตลงได้อย่างมาก ซึ่งในการทดลองนี้ใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดกลูโคนิกโดย *A. niger* G153 พบว่าได้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูง อีกทั้งได้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองในปริมาณมากด้วย โดยน้ำตาลฟรักโทสเป็นน้ำตาลอีกชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในกระบวนการผลิตอาหารและเครื่องดื่มต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ขนมปัง แยม เยลลี่ พุดดิ้ง ไอสครีม ชอกโกเลต โยเกิร์ต น้ำผลไม้ นมและผลิตภัณฑ์นม (Ward, 1967; Hyvonen และ Koivistoinen, 1982) และยังเป็นที่ต้องการของตลาด น้ำตาลทรายที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นผลผลิตจากเกษตรอุตสาหกรรมที่หาได้ง่ายและมีราคาถูก สามารถนำน้ำตาลมาใช้ในการผลิตได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านการย่อยสลายเหมือนการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากราสามารถย่อยน้ำตาลได้เอง จึงเป็นการลดค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ลงได้

ในการใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลิตภัณฑ์สองชนิดคือกรดกลูโคนิก

และฟรักโทสในปริมาณสูงโดยผลิตภัณฑ์ทั้งสองสามารถแยกจากกันได้ง่าย เพราะว่ากรดกลูโคนิกสามารถตกตะกอนออกมาในรูปเกลือแคลเซียมกลูโคเนตได้ ส่วนฟรักโทสที่อยู่ในส่วนน้ำก็คาดว่าสามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีเพียงน้ำตาลทรายและแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำประปา นอกจากนี้การใช้น้ำตาลทรายสามารถนำมาใช้ได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการย่อยและยังไม่ต้องปรับเปลี่ยนภาวะในเรื่องค่าความเป็นกรดด่าง ทำให้ง่ายต่อการนำมาใช้เช่นเดียวกับการใช้กลูโคส แต่ได้ผลิตภัณฑ์สองชนิดโดยที่ฟรักโทสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองก็มีคุณค่าและราคา เป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง จึงกล่าวได้ว่างานวิจัยนี้เป็นการวิจัยที่ชี้แนวทางเลือกสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกร่วมกับฟรักโทส ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในแง่การผลิตหรือปัจจัยที่มีผลรวมทั้งภาวะที่เหมาะสมในการผลิตที่ให้ผลผลิตทั้งสองในปริมาณมากมาก่อน อันเป็นการเพิ่มคุณค่าวัตถุดิบที่ได้จากเกษตรอุตสาหกรรมของไทยอีกทางหนึ่งด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. น่าจะมีการทดลองใช้สายใยเดิมซ้ำของ *A. niger* G153 ในการเพาะเลี้ยงระดับถังหมัก ทำให้ราสามารถผลิตกรดได้ทันที ซึ่งจะช่วยลดเวลาในการผลิต ขณะที่วัตถุดิบที่เติมลงไปก็จะถูกนำไปใช้ในการผลิตกรดโดยไม่ถูกแบ่งมาใช้เพื่อการเติบโตรวมทั้งอาจไม่ต้องเติมไนโตรเจนเพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย
2. น่าจะทดลองใช้วัตถุดิบจากการคั้นน้ำจากอ้อยแล้วเข้ากระบวนการผลิตเลยโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำน้ำตาลทราย
3. ศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดให้ได้ปริมาณมาก และไม่ปนเปื้อนซึ่งกันและกัน
4. ควรขยายส่วนการผลิตต่อไป เพื่อนำไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม