การผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดย *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153

นางสาวจินตนา ไกรวัฒนพงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2536

ISBN 974-583-276-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018943

GLUCONIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus* sp. STRAIN G 153: SODIUM GLUCONATE FORMATION

Miss. Jintana Kraiwattanapong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillments of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-276-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดย *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153

โดย นางสาวจินตนา ไกรวัฒนพงศ์

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตศิลิน สีหนนทน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จินตนา ไกรวัฒนพงศ์ : การผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดย *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 (GLUCONIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus* sp. STRAIN G 153 : SODIUM GLUCONATE FORMATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.กรรณิกา จันทรลาด, 107 หน้า. ISBN 974-583-276-6

การตรวจปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตในรูปโซเดียมกลูโคเนต ใช้วิธีการดูดซับโซเดียมอิออนออกจากโซเดียมกลูโคเนต ด้วยแอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี ผลการทดลอง พบว่า แอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี 9 มิลลิลิตร ที่บรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซ็นติเมตร เวลาในการดูดซับ 30 นาที เป็นวิธีการ ปริมาณ และเวลาที่เหมาะสม ต่อการดูดซับโซเดียมอิออนออกจากโซเดียมกลูโคเนตมาตรฐาน 100 มิลลิกรัม

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต คือน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 30% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคือ 5.5-6.5 สามารถใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 30% เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสบริสุทธิ์ได้ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตร/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ/นาที อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อะดีคานอลเป็นสารกำจัดฟองที่เหมาะสม อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมโดยน้ำประปาไม่เติมธาตุใด ๆ ให้ผลผลิตกรดใกล้เคียงกับการใช้น้ำปลอดประจุที่มีการเติมธาตุครบสูตร

การผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้สายใยซ้ำ พบว่า การกรองใช้เฉพาะสายใยจากอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม 15 มิลลิลิตร เป็นวิธีการและปริมาณที่เหมาะสม สามารถผลิตกรดกลูโคนิค 4 ครั้ง ติดต่อกันด้วยสายใยซ้ำ ทั้งในขวดเขย่า และในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยผลผลิตกรดกลูโคนิคไม่ลดลง แต่ลดระยะเวลาในการผลิตลง และสามารถเก็บสายใยที่กรองเพื่อใช้ซ้ำไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยยังคงมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดกลูโคนิคสูง

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต จินตนา ไกรวัฒนพงศ์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [illegible]

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C326078 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD: GLUCONIC ACID / *Aspergillus* sp. G 153 / SODIUM GLUCONATE
JINTANA KRAIWATTANAPONG : GLUCONIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus* sp. STRAIN G 153 : SODIUM GLUCONATE FORMATION. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. KANNIKA CHANTARASA-ARD, 107 pp. ISBN 974-583-276-6

Amount of gluconic acid in form of sodium gluconate was quantitated by the use of amberlite IR 120 P. In practical, sodium gluconate was pass through glass column with diameter of 1 centimeter filled with 9 millileters of amberlite by loading capacity of 100 milligrams.

The optimum concentration of carbon source and pH for gluconic acid production in form of sodium gluconate by *Aspergillus* sp. strain G 153 are 30% glucose (w/v) with pH in the range of 5.5-6.5 while starch hydrolysate equivalent to 30% glucose could also be used in place of free glucose. The optimum conditions for gluconic production in a 5 liter fermenter are : 1.5 liter volume of aeration per volume of medium per minute with agitation speed of 600 rpm. Adecanol was found to be suitable antifoam for the present fermentation. In addition, the substitution of tap water for deionized water supplemented with trace metals in cultivation medium also gave a comparable yield.

For the reuse purpose, it was found that the filtered mycelia from 15 milliliters of fermentation liquor is appropriate for 50 milliliters of production medium. Moreover, after 4 successive cycles of cultivation in both shake flask and 5 liter fermenter the resulted yield showed no reduction in comparison to the first cycle while a reduction of production time was observed. The filtered mycelia could retained their activities after storing at 6°C for 3 days.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต เจินตนา ไกรวัฒนพงศ์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [illegible]

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ประธานกรรมการ และคณะกรรมการทุกท่าน ที่กรุณาตรวจสอบ และแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนสำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย)จำกัด ที่กรุณาให้เป็ง ไฮโดรไลเสส มาใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจน เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้องทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ตลอดมาจนบรรลุจุดมุ่งหมายในการทำวิจัยนี้

ท้ายสุดนี้ ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมา จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 15

3. ผลการวิจัย 26

4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย 87

เอกสารอ้างอิง 100

ภาคผนวก 105

ประวัติผู้เขียน 107

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยจุลินทรีย์..... 8

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. การเกิดกรดกลูโคนิคจากน้ำตาลกลูโคส 1
2. สูตรเคมีของโซเดียมกลูโคเนต 1
3. ขั้นตอนการเกิดกรดกลูโคนิค 5
4. ความสัมพันธ์ของกรดกลูโคนิคกับสารต่าง ๆ ในจุลินทรีย์ 6
5. ปริมาณกรดกลูโคนิคที่ตรวจได้ เมื่อใช้แอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี 12 มิลลิลิตร ดูดซับโซเดียมออออน 40
6. ปริมาณกรดกลูโคนิคที่ตรวจได้ เมื่อแปรผันปริมาณแอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี ต่าง ๆกัน ในการดูดซับโซเดียมออออน 41
7. ปริมาณกรดกลูโคนิคที่ตรวจได้ จากการใช้วิธีการที่แตกต่างกัน ในการดูดซับโซเดียมออออน 42
8. กรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโต ของ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 43
9. กรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโต ของ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 44
10. กรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโต ของ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 35 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 45
11. เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิค เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสแตกต่างกัน เป็นแหล่งคาร์บอน 46
12. ผลการควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 4.5-5.5 ต่อการผลิตกรดกลูโคนิค 47
13. ผลการควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 5.5-6.5 ต่อการผลิตกรดกลูโคนิค 48

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

14. ผลการควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 6.5-7.5 ต่อการผลิตกรดกลูโคนิค 49
15. เปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิค เมื่อแปรผันความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆกัน 3 ช่วง 50
16. ผลผลิตกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโต ของ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 เมื่อใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 30 % เป็นแหล่งคาร์บอน 51
17. เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิค เมื่อใช้กลูโคสบริสุทธิ์ และแป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 30 % เป็นแหล่งคาร์บอน 52
18. ปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการให้อากาศ 1 ลิตร/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ/นาที..... 53
19. ปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตร/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ/นาที... 54
20. ปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการให้อากาศ 1.75 ลิตร/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ/นาที.. 55
21. เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศต่าง ๆ กัน..... 56
22. ปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที..... 57
23. ปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาที..... 58
24. ปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวนเท่ากับ 700 รอบต่อนาที..... 59
25. เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิค ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อแปรผันอัตราการกวนต่าง ๆ กัน..... 60

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

26. ผลการใช้อะซีตานอลเป็นสารกำจัดฟอง ต่อการผลิตกรดกลูโคนิค ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 61

27. ผลการใช้น้ำมันถั่วเหลือง 100 % เป็นสารกำจัดฟอง ต่อการผลิตกรดกลูโคนิค ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 62

28. ผลการใช้น้ำมันหมู เป็นสารกำจัดฟอง ต่อการผลิตกรดกลูโคนิค ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 63

29. เปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิค จาก *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้สารกำจัดฟองต่างกัน 3 ชนิด 64

30. ผลผลิตกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโต ของ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 65

31. ผลผลิตกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโต ของ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้น้ำปลอดประจุที่มีการเติมแร่ธาตุครบสูตร 66

32. เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตจาก *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้น้ำปลอดประจุที่มีการเติมธาตุต่าง ๆ กับการใช้น้ำประปาที่ไม่เติมธาตุใด ๆในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 67

33. เปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิค จาก *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้สภาวะที่เหมาะสม 68

34. ผลการใช้สายใยซ้ำชนิดไม่ได้กรองสายใยต่อการผลิตกรดกลูโคนิค การใช้น้ำตาล และการเติบโตของ *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 69

35. ผลการใช้สายใยซ้ำชนิดกรองใช้เฉพาะสายใยต่อการผลิตกรดกลูโคนิค การใช้น้ำตาล และการเติบโตของ *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 70

36. เปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิค เมื่อใช้สายใยซ้ำ 2 ชนิด ใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 30 % เป็นแหล่งคาร์บอน 71

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

37. ปริมาณกรดกลูโคนิค เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 โดยใช้เชื้อซ้ำชนิดที่กรองสายใยจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 10 % 72
38. ปริมาณกรดกลูโคนิค เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 โดยใช้เชื้อซ้ำชนิดที่กรองสายใยจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 15 % 73
39. ปริมาณกรดกลูโคนิค เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 โดยใช้เชื้อซ้ำชนิดที่กรองสายใยจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 20 % 74
40. ผลการใช้สายใยซ้ำชนิดใช้เฉพาะสายใย จากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 15 % ต่อการผลิตกรดกลูโคนิค 4 ครั้ง ติดต่อกัน ในระดับขวดเขย่า..... 75
41. เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิค จากเชื้อ *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 เมื่อใช้สายใยซ้ำ เพาะเลี้ยง 4 ครั้งติดต่อกัน..... 76
42. เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคส ในระหว่างการผลิตกรดกลูโคนิค โดยใช้สายใย *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 ซ้ำ เพาะเลี้ยง 4 ครั้ง ติดต่อกัน..... 77
43. เปรียบเทียบการเติบโต ในระหว่างการผลิตกรดกลูโคนิค โดยใช้สายใย *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 ซ้ำ เพาะเลี้ยง 4 ครั้ง ติดต่อกัน..... 78
44. ผลการใช้สายใยซ้ำ ต่อการผลิตกรดกลูโคนิค เมื่อเพาะเลี้ยง 4 ครั้งติดต่อกัน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 79
45. เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิค จากเชื้อ *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 เมื่อใช้สายใยซ้ำ เพาะเลี้ยง 4 ครั้งติดต่อกัน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 80
46. เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการผลิตกรดกลูโคนิค โดยใช้สายใยของ *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 ซ้ำ เพาะเลี้ยง 4 ครั้ง ติดต่อกัน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 81
47. เปรียบเทียบการเติบโตในระหว่างการผลิตกรดกลูโคนิค โดยใช้สายใยของ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 ซ้ำ เพาะเลี้ยง 4 ครั้งติดต่อกัน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 82

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

48. เปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิค จากการใช้สายใยของ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 ซ้ำ เพาะเลี้ยง 4 ครั้งติดต่อกัน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมทั้งในระดับขวดเขย่า และในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 83

49. ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคสและน้ำหนักแห้งของสายใยของ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำ หลังจากเก็บสายใยไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส..... 85

50. HPLC โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ที่สร้างโดย *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 86