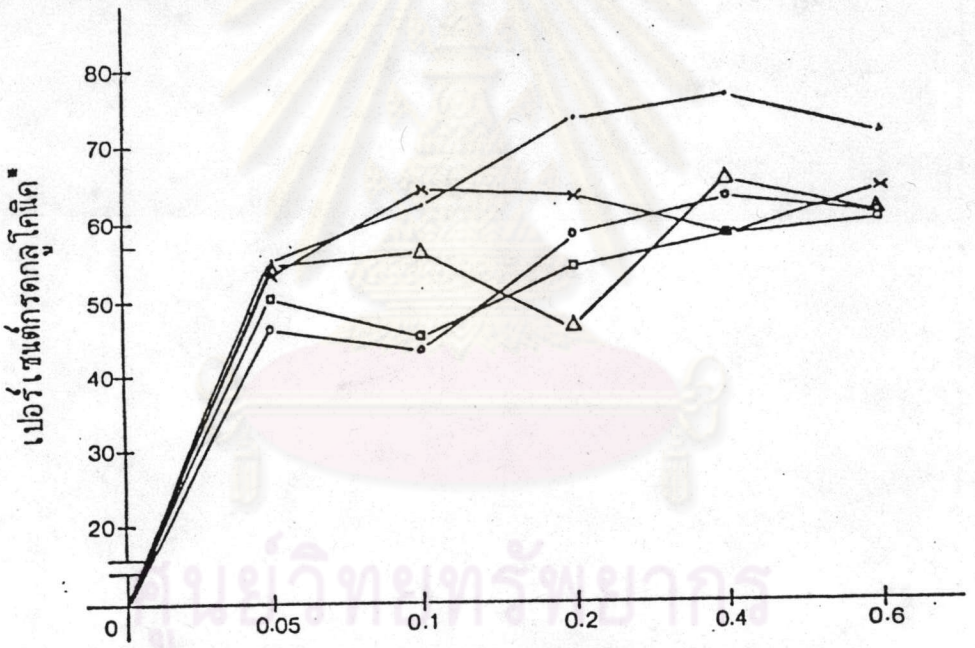
บทที่ 3

ผลการวิจัย

<u>ผลการหาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตกรดสูง</u>

เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Aspergillus</u> sp. สายพันธุ์ G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 โดยแปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ดังแสดงในวิธีการทดลองข้อ 8.1 พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟต 0.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ผลผลิตกรดสูงที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 6



* คิดจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น

** คิดเป็นน้ำหนักต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

รูปที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตโดย <u>Aspergillus</u> sp. สายพันธุ์ G153 เมื่อแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน

.——. หมายถึง แอมโมเนียมซัลเฟต o——o หมายถึง ยูเรีย

△——△ หมายถึง โซเดียมไนเตรต ×——× หมายถึง ผงสกัดยีสต์

▫——▫ หมายถึง แอมโมเนียมไนเตรต

จากรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณตั้งแต่ 0.05-0.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เพิ่มขึ้น และให้ผลผลิตกรดสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ผลผลิตกรดสูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆที่ใช้ ผงสกัดยีสต์ให้ผลผลิตกรดสูงรองลงมาและมีปริมาณที่เหมาะสมอยู่ที่ 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่ผลผลิตที่ได้นั้นก็ยังคงต่ำกว่าของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) อยู่ถึงเกือบ 10%

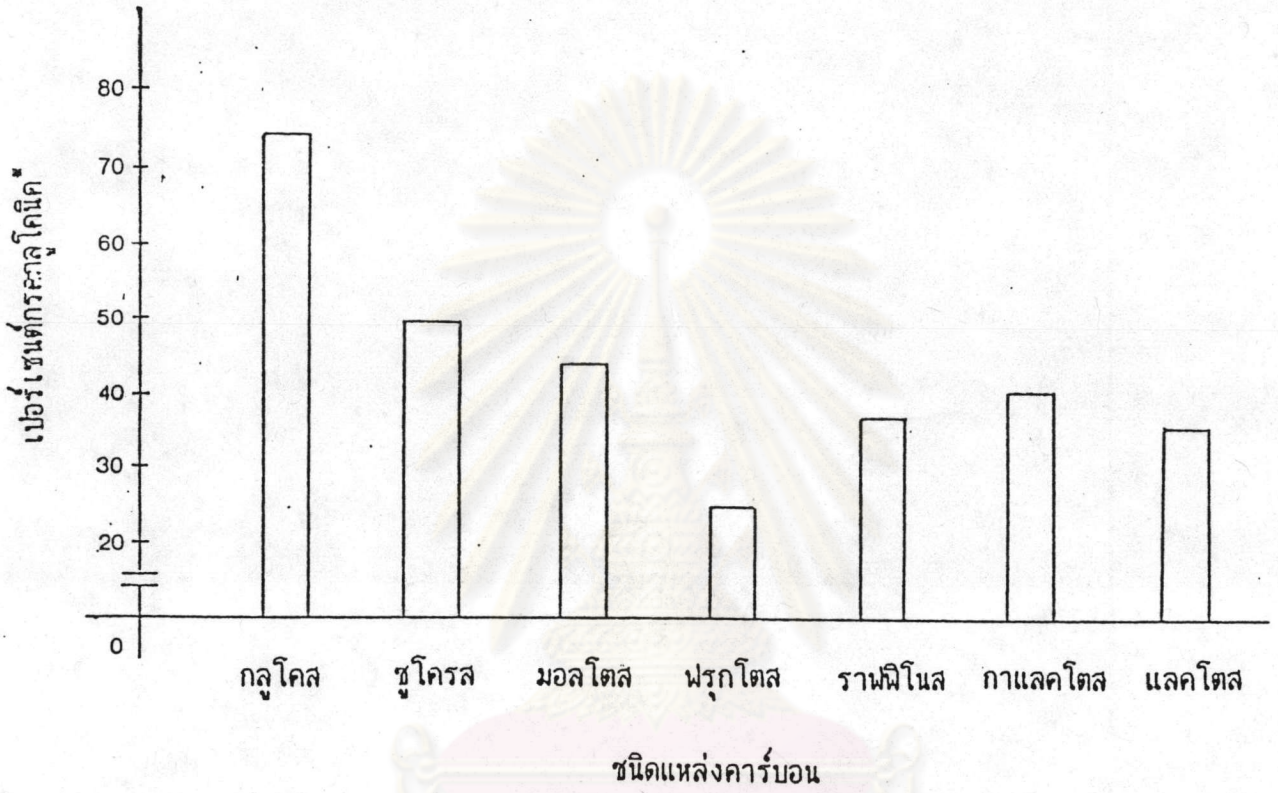
ส่วนแหล่งไนโตรเจนอีก 3 ชนิด คือ แอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย และโซเดียมไนเตรต ให้ผลผลิตกรดค่อนข้างต่ำ ดังนั้นแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด และจะใช้ปริมาณนี้ในการทดลองต่อไป

ผลของชนิดแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตกรดกลูโคนิค

เมื่อเพาะเลี้ยง Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนทั้งสิ้น 7 ชนิด ตามวิธีการทดลองในข้อ 8.2 พบว่า น้ำตาลกลูโคส ซูโครสและมอลโตส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 7 และพบว่า แหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ น้ำตาลกลูโคส ให้กรดกลูโคนิคประมาณ 74% คิดจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น น้ำตาลซูโครสและมอลโตสให้ผลผลิตกรดดังกล่าวในอันดับรองลงมา คือ 50 และ 45% คิดจากปริมาณน้ำตาลตั้งต้น ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองหาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจะใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครสและมอลโตส เป็นแหล่งคาร์บอน

ผลการเปรียบเทียบปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิค

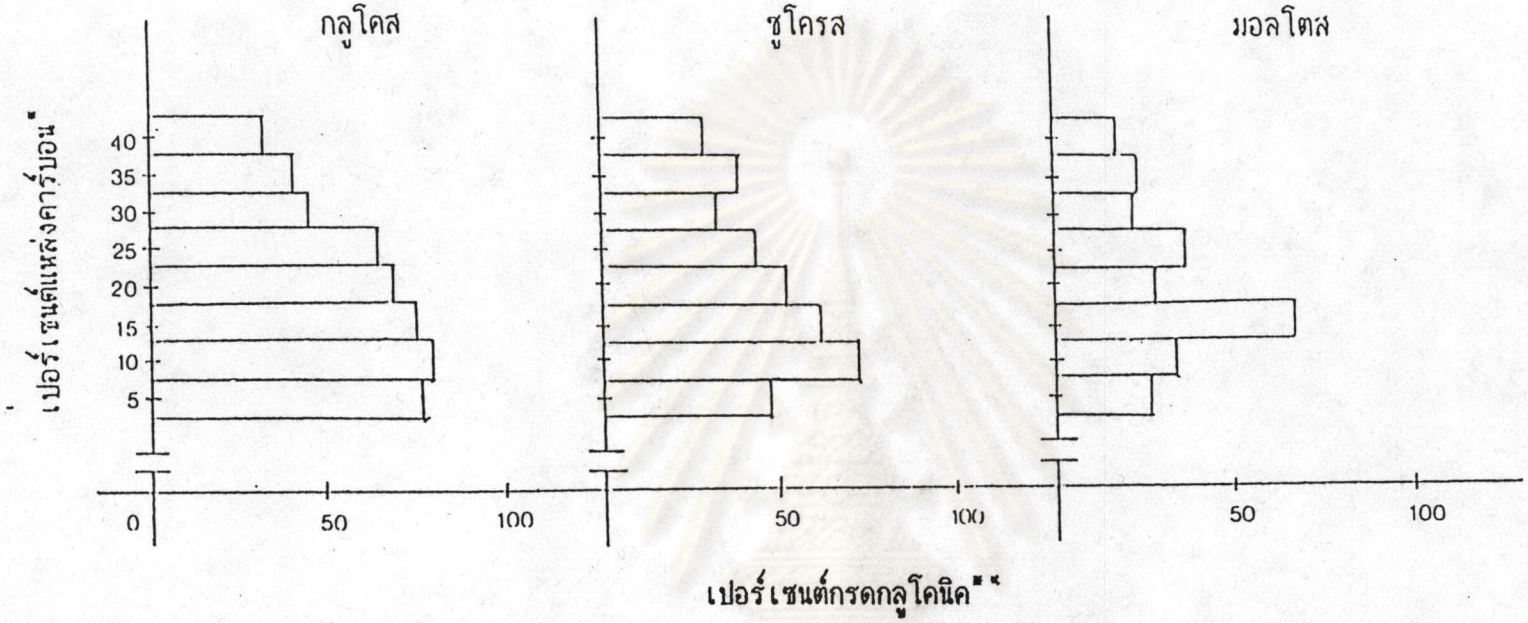
เมื่อแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและมอลโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 เป็น 5 10 15 20 25 30 35 และ 40% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วตรวจหาปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิค พบว่า ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดมีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิค ดังแสดงในรูปที่ 8 โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นเรื่อยๆ ปริมาณการผลิตกรดก็จะเพิ่มขึ้นด้วยจนถึงจุดๆหนึ่งแล้วจึงลดลง น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นเป็น 25% เหมาะสมที่สุดสำหรับเชื้อรา Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 ใน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

* คิดจากปริมาณน้ำตาลตั้งต้นที่ใช้

รูปที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคโดยเชื้อรา Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 7 ชนิด ที่ความเข้มข้น 25%(น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน



* คิดเป็นน้ำหนักต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

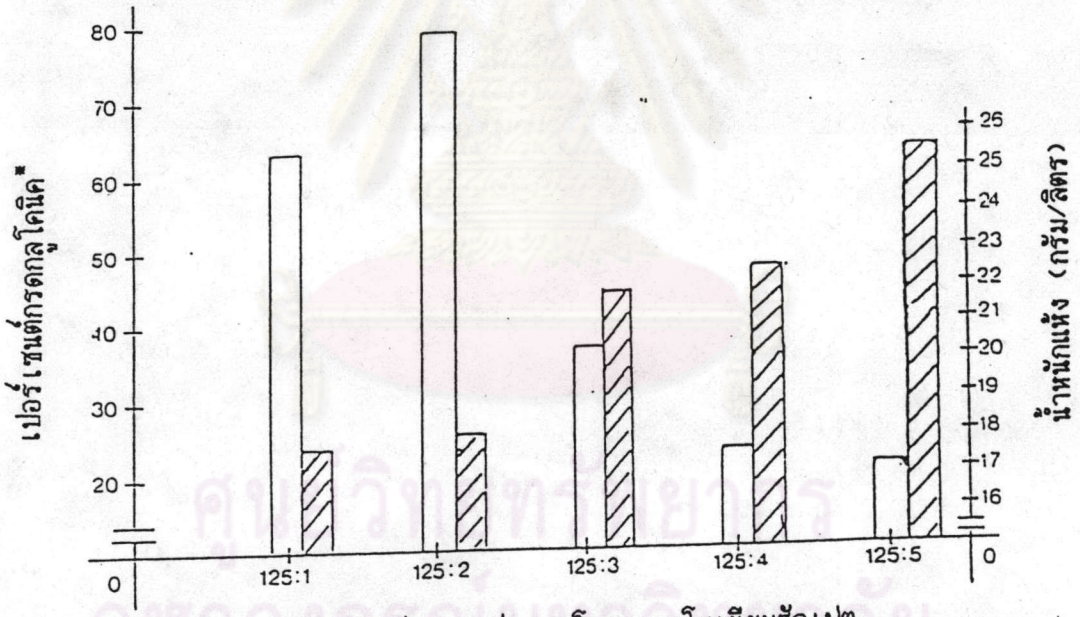
** คิดจากปริมาณกลูโคสตั้งต้นที่ใช้

รูปที่ 8. ปริมาณกรดกลูโคนิคจากเชื้อรา Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส ซูโครสและมอลโตส เป็น 5 10 15 20 25 30 35 และ 40% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน

การผลิตกรดกลูโคนิคคือให้ผลผลิตกรดสูงถึง 74.08 %. เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ส่วนซูโครสที่ความเข้มข้น 35% ให้ผลผลิตกรดสูงสุด 42.97 % เมื่อเทียบกับน้ำตาลซูโครสที่ใช้ ในขณะที่น้ำตาลมอลโตสที่ความเข้มข้น 15% ให้ผลผลิตกรดดังกล่าวสูงสุด 86.13 % เมื่อเทียบกับน้ำตาลมอลโตสที่ใช้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าน้ำตาล 2 ชนิดหลังนี้ให้ผลผลิตต่ำกว่าน้ำตาลกลูโคส จึงเลือกใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

<u>ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจน</u>

เมื่อแปรผันอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลกลูโคสต่อแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆกันแล้ว พบว่าปริมาณการผลิตกรดก็แตกต่างกันไปด้วย โดยที่อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแหล่งอาหารทั้ง 2 นั้นคือ 125:2 ซึ่งให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงสุดถึง 79% เมื่อคิดจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น ดังแสดงในรูปที่ 9



* คิดจากปริมาณกลูโคสตั้งต้นที่ใช้

รูปที่ 9 เปรียบเทียบการผลิตกรดกลูโคนิคและการเติบโตของ <u>Aspergillus</u> sp. สายพันธุ์ G153 เมื่อแปรผันอัตราส่วนระหว่างกลูโคสต่อแอมโมเนียมซัลเฟต เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน

□ หมายถึง เปอร์เซนต์กรดกลูโคนิค ▨ หมายถึง น้ำหนักแห้ง

รูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่า ถ้าอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจนไม่เหมาะสมมีค่าสูงหรือต่ำไป ก็จะทำให้จุลินทรีย์ผลิตกรดกลูโคนิคได้น้อยกว่าอัตราส่วนที่พอเหมาะ ดังจะเห็นได้ว่า เมื่ออัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจนเป็น 125:1 125:3 125:4 และ 125:5 จะให้ผลผลิตกรดเพียง 63.36 37.28 23.32 และ 21.60% ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าเมื่ออัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจนเป็น 125:2 โดยให้ผลผลิตสูงถึง 79.00 % ซึ่งต่างจากการเติบโตที่การเติบโตจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่ออัตราระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจนมีค่าน้อยลง นั่นคือ มีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนสูงขึ้น ดังจะเห็นได้ว่าน้ำหนักแห้งของสายใยเพิ่มขึ้นจาก 17.75 กรัมต่อลิตรเป็น 25.50 กรัมต่อลิตร เมื่อคิดจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นเมื่ออัตราส่วนเปลี่ยนจาก 125:1 เป็น 125:5 ดังนั้นเลือกอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลกลูโคสต่อแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 125:2 ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิค

1. ผลการเตรียมหัวเชื้อ

1.1. ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการสร้างสปอร์ของ *Aspergillus sp.* สายพันธุ์ G153

ได้ทำการเปรียบเทียบการสร้างสปอร์ของเชื้อราดังกล่าวเพื่อใช้ทำหัวเชื้อบนอาหารแข็ง 3 ชนิดคือ อาหารแข็งโปเตโตเดกซ์โตรส อาหารแข็งที่มีสูตรเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 และอาหารแข็งสูตรที่ 3 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30+2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดให้ความหนาแน่นของสปอร์อยู่ในช่วง $1.5-5.0 \times 10^{9}$ สปอร์มิลลิลิตรซึ่งมากเพียงพอที่จะนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 3

i 10313248

ตารางที่ 3 จำนวนสปอร์ของ Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน

ชนิดของอาหารวุ้นเอียง	จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร
อาหารแข็งโปเตโตเดกซ์โตรส	2.27×10^9
อาหารแข็งสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2	4.77×10^9
อาหารแข็งสูตรที่ 3	1.52×10^9

เนื่องจากอาหารแข็งโปเตโตเดกซ์โตรสเตรียมง่ายและราคาถูกกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารดังกล่าวสำหรับการผลิตสปอร์ในการทดลองต่อไป

1.2. ผลของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการงอกของสปอร์ของ Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153

เมื่อเปรียบเทียบการงอกของสปอร์ของเชื้อราดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ชนิดคือ อาหารเหลวโปเตโตเดกซ์โตรส อาหารเหลวสูตรที่ 2 และอาหารเหลวสูตรที่ 4 พบว่าอาหารเหลวโปเตโตเดกซ์โตรสและอาหารเหลวสูตรที่4 ทำให้สปอร์ของ Aspergillus sp.สายพันธุ์G153 งอกได้ครบ 100% ในเวลาที่ใกล้เคียงกัน คือ ชั่วโมงที่ 8 และ 9 ตามลำดับ ซึ่งเร็วกว่าอาหารเหลวสูตรที่ 2 3 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบเวลาในการงอกของสปอร์ของรา Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 3 ชนิด

เวลาที่ตรวจสอบ (ชั่วโมง)	เปอร์เซนต์การงอกของสปอร์		
	อาหารสูตรที่ 2	อาหารโปเตโตเดกซ์โตรส	อาหารสูตรที่ 4
3	0	0	0
6	13.0	55.0	9.6
7	63.6	96.0	77.7
8	81.8	100.0	95.0
9	92.0	-	100.0
10	98.0	-	-
11	100.0	-	-

- หมายถึง ไม่ได้ตรวจผลเนื่องจากงอกครบ 100% แล้ว

ใช้สปอร์ที่งอกแล้วในอาหารทั้ง 3 ชนิดในการทดลองต่อไป

1.3. ผลการใช้สปอร์ที่งอกแล้วในอาหารเหลวต่างชนิดกันเป็นหัวเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค

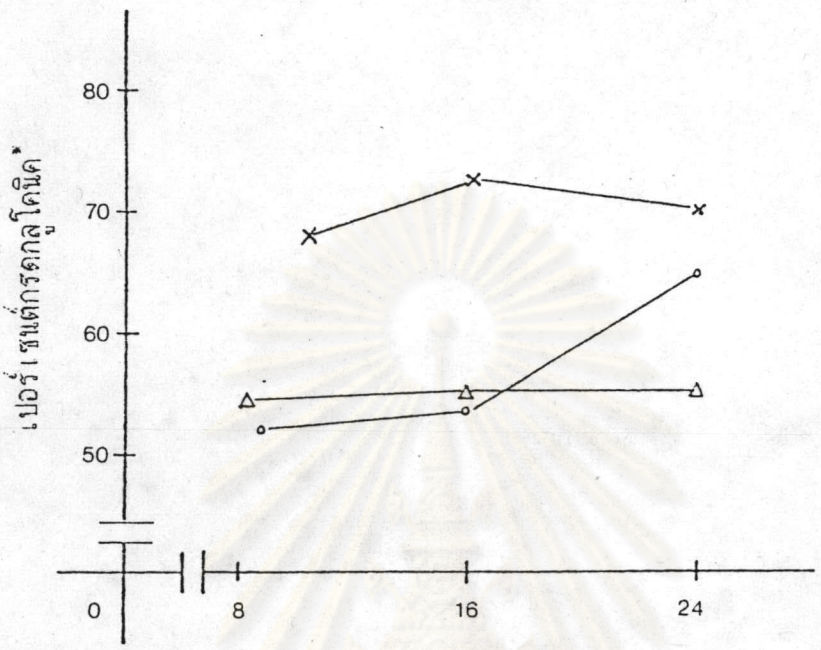
เมื่อนำสปอร์ที่งอกแล้วในอาหารเหลว 3 ชนิด คือ อาหารเหลวโปเตโตเดกซ์โตรส อาหารเหลวสูตรที่ 2 และอาหารเหลวสูตรที่ 4 มาเป็นหัวเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้เวลาในการเตรียมหัวเชื้อชนิดนี้ต่างกัน 3 ช่วงเวลาคือ

ช่วงที่ 1 ชั่วโมงที่สปอร์งอกครบ 100% ในอาหารเหลวแต่ละชนิด

ช่วงที่ 2 ชั่วโมงที่ 16 หลังจากเริ่มเพาะสปอร์

ช่วงที่ 3 ชั่วโมงที่ 24 หลังจากเริ่มเพาะสปอร์

ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 10



* คิดจากปริมาณกลูโคสตั้งต้นที่ใช้

รูปที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตโดย Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 เมื่อใช้หัวเชื้อชนิดสปอร์ที่งอกแล้วจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดและ 3 ช่วงเวลา เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน

x——x หมายถึง หัวเชื้อที่เตรียมในอาหารสูตรที่ 2

△——△ หมายถึง หัวเชื้อที่เตรียมในอาหารเหลวโปเตโตเดกซ์โตรส

○——○ หมายถึง หัวเชื้อที่เตรียมในอาหารสูตรที่ 4

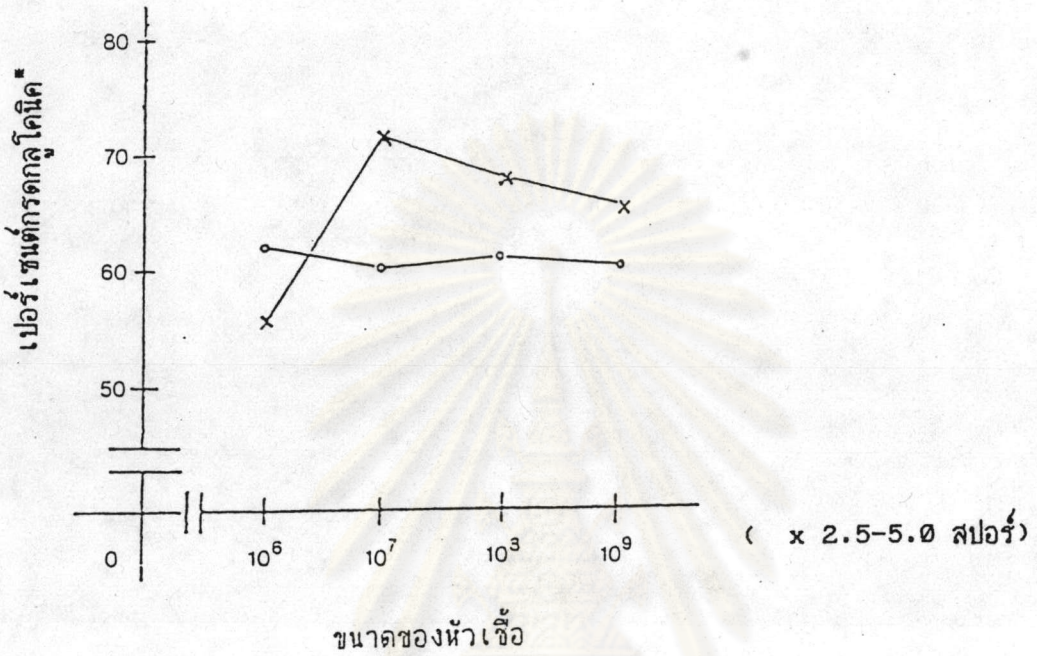
พบว่าสปอร์ที่เพาะให้งอกนาน 16 ชั่วโมงในอาหารเหลวสูตรที่ 2 เป็นหัวเชื้อที่ให้ผลผลิตกรดสูงกว่าสปอร์ที่งอกแล้วในอาหารอีก 2 สูตร หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ที่เพาะให้งอกนาน 24 ชั่วโมงในอาหารเหลวสูตรที่2 ผลผลิตเริ่มลดลง หัวเชื้อจากอาหารเหลวโปเตโตเดกซ์โตรสผลผลิตคงที่ ส่วนหัวเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงจากอาหารเหลวสูตรที่ 4 ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 66.08 % เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ แต่ต่ำกว่าผลผลิตจากหัวเชื้ออายุ 16 ชั่วโมงจากอาหารเหลวสูตรที่ 2 นอกจากนี้ยังพบว่าสายใยที่งอกจากสปอร์ที่ใช้เวลาเพาะนาน 24 ชั่วโมงนั้นยาวมาก ทำให้การปรับปริมาณหัวเชื้อเพื่อให้มีขนาดสปอร์ที่งอกแล้วเท่าๆกันยาก อีกประการหนึ่งเมื่อคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในแง่พลังงานและการประหยัดเวลา หัวเชื้อที่เพาะให้สปอร์งอกนาน 16 ชั่วโมงในอาหารเหลวสูตรที่ 2 เป็นหัวเชื้อที่ดีที่สุด จึงเลือกใช้ในการทดลองต่อๆไป

1.4. ผลการหาชนิดและขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิค

เมื่อแปรผันขนาดของหัวเชื้อทั้ง 2 ชนิด คือ ชนิดสปอร์แขวนลอยและชนิดสปอร์ที่งอกแล้วจากอาหารเหลวสูตรที่ 2 เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเป็น $2.5\text{-}5.0\times10^{6}$ $2.5\text{-}5.0\times10^{7}$ $2.5\text{-}5.0\times10^{8}$ และ $2.5\text{-}5.0\times10^{9}$ สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด (สูตรที่ 2) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อนาน 5 วันที่อุณหภูมิห้อง พบว่าหัวเชื้อชนิดสปอร์ที่งอกแล้วดังกล่าวข้างต้นขนาด $2.5\text{-}5.0\times10^{7}$ สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงที่สุด คือ 72.48 %เมื่อเทียบกับหัวเชื้อชนิดและขนาดอื่นที่ใช้ในการทดลองนี้ ดังแสดงในรูปที่ 11

ดังนั้นในการทดลองต่อ ๆ ไป เลือกใช้หัวเชื้อชนิดสปอร์ที่งอกแล้วจากอาหารเหลวสูตรที่ 2 เป็นเวลา 16 ชั่วโมงในการผลิตกรดกลูโคนิค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



* คิดจากปริมาณกลูโคสตั้งต้นที่ใช้

รูปที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุดเมื่อแปรผันชนิดและขนาดของหัวเชื้อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) นาน 5 วัน

o——o หมายถึง สปอร์แขวนลอย

x——x หมายถึง สปอร์งอกแล้ว 16 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

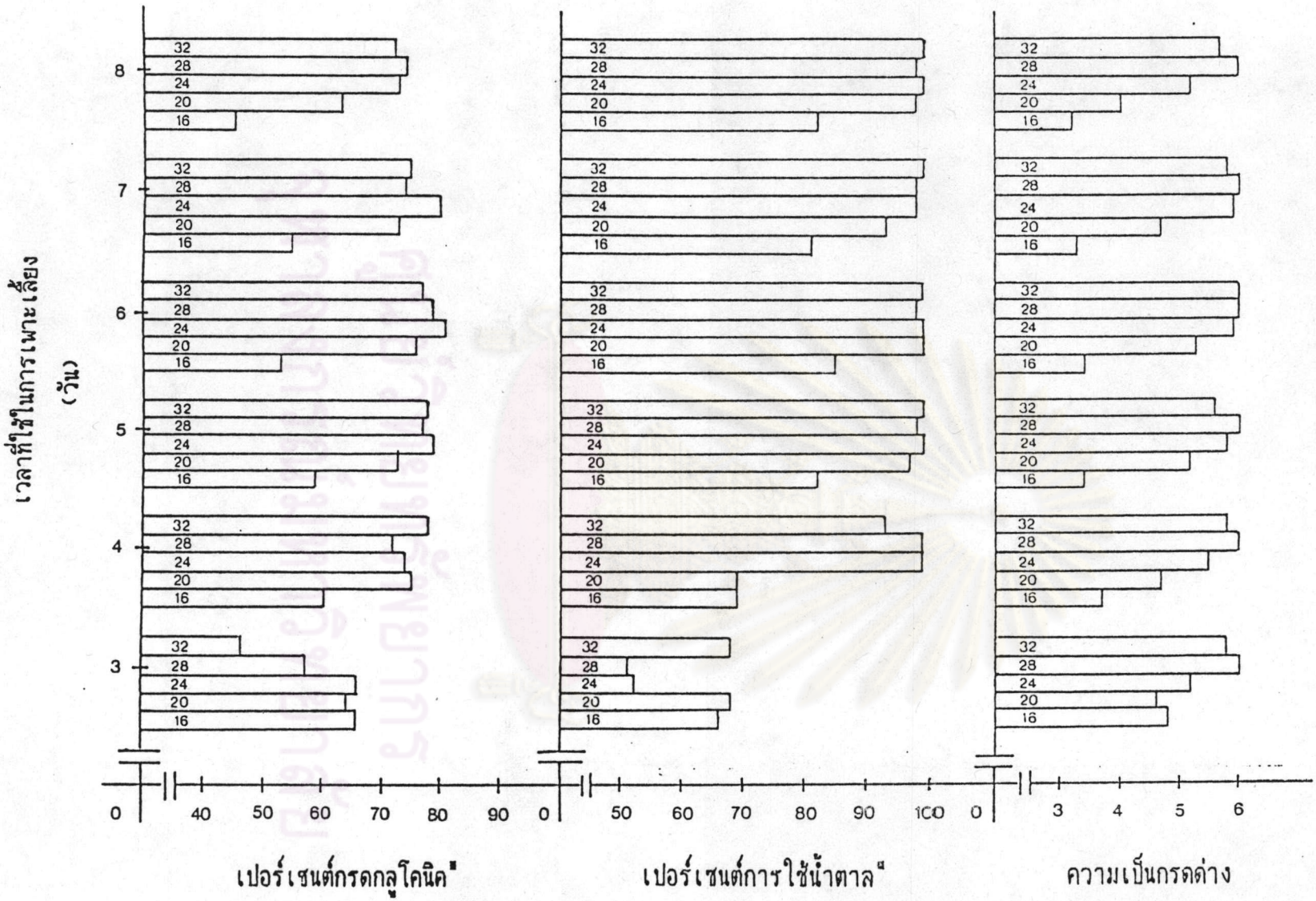
2. ผลการหาปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิค

เมื่อทราบถึงชนิดและขนาดของหัวเชื้อที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงแล้ว จึงทดลองหาปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อรักษาสภาพความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะต่อการผลิตกรดชนิดดังกล่าวและสิ้นเปลืองน้อยที่สุด โดยแปรผันปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตออกเป็น 16 20 24 28 และ 32% (น้ำหนักต่อน้ำหนักของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้) ผลการทดลองในรูปที่ 12 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดคือ 24% ให้กรดสูงถึง 81.00% เมื่อคิดจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตกรดกลูโคนิคตั้งแต่วันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อเป็นต้นไป พบว่าปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ 24 28 และ 32% (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำตาลกลูโคสที่ใช้) ให้ผลผลิตกรดสูงและไม่ต่างกันมากนัก แต่ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ต่ำกว่า 24% (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น) ให้ผลผลิตกรดต่ำอย่างเห็นได้ชัดซึ่งสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 12 พบว่า เมื่อมีแคลเซียมคาร์บอเนตน้อยค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะต่ำ เช่น ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ 16% (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น) ค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่วันที่ 4 เป็นต้นไป มีค่าต่ำกว่า 4 นั่นคือมีความเป็นกรดมากในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งหมายความว่าปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใส่ลงไปไม่เพียงพอ

เมื่อพิจารณาถึงการใช้น้ำตาล พบว่าเมื่อมีการใช้น้ำตาลกลูโคสสูงมากจะให้ปริมาณกรดสูงและมีการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตสูงด้วย เพราะเมื่อน้ำตาลถูกเปลี่ยนเป็นกรดได้มากก็ต้องใช้แคลเซียมคาร์บอเนตจำนวนมาก เพื่อไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดอันจะมีผลต่อกิจกรรมและการเติบโตของจุลินทรีย์

ดังนั้น เลือกปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ 24% (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำตาลกลูโคสที่ใช้) เพื่อใช้ในการทดลองต่อๆไป



16 20 24 28และ32 หมายถึง เปอร์เซนต์แคลเซียมคาร์บอเนต(น้ำหนักต่อน้ำหนักกลูโคส)

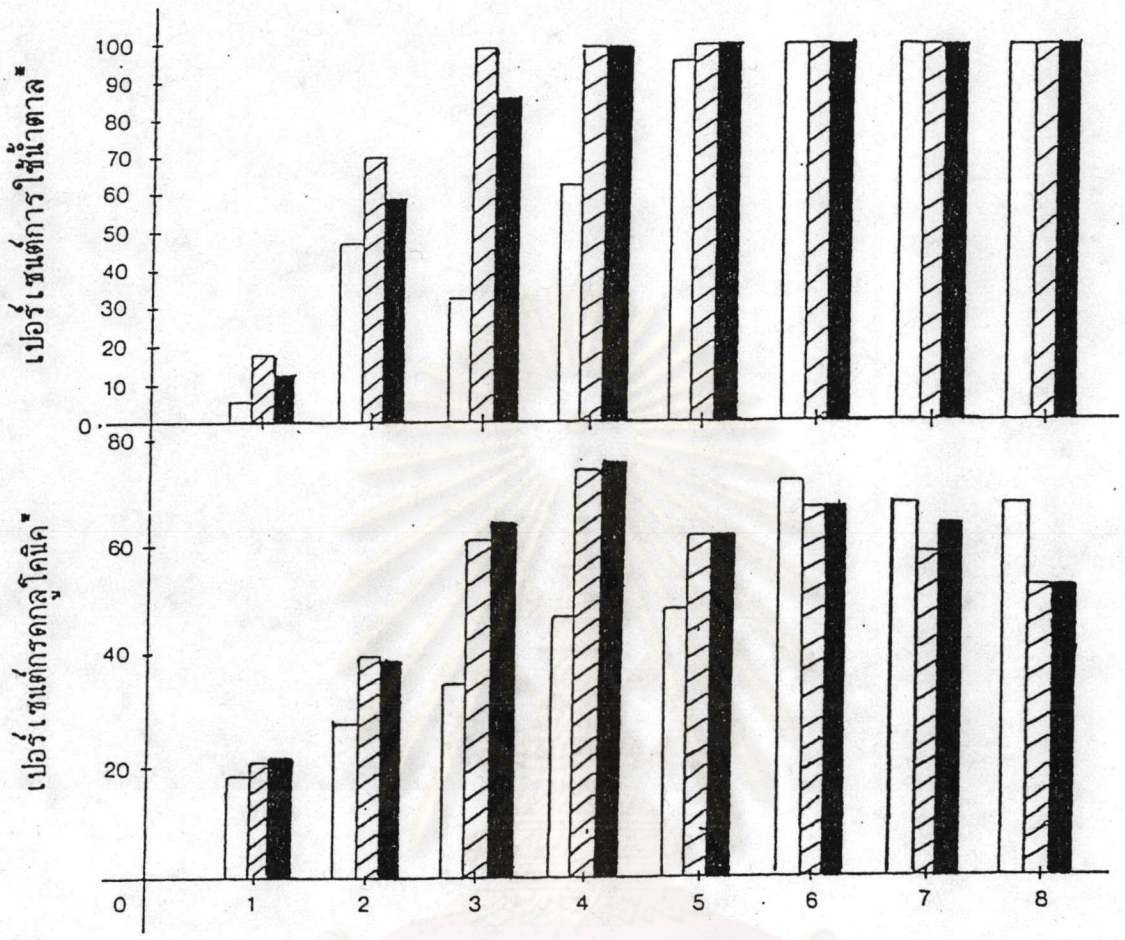
รูปที่ 12 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิค การใช้น้ำตาลและความเป็นกรดด่างเมื่อแปรผันปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 8 วัน

3. <u>ผลของชนิดของขวดทดลองและความเร็วรอบของเครื่องเขย่าต่อการผลิตกรดกลูโคนิค</u>

เมื่อทำการทดลองผลิตกรดกลูโคนิค โดยใช้ภาชนะบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3 แบบคือ ขวดแก้วทรงกรวย ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบและขวดแก้วทรงกรวยที่ใส่ขดลวดอยู่ภายใน ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเชื้อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน พบว่าขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบและขวดแก้วทรงกรวยที่ใส่ขดลวดอยู่ภายในจะให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงสุดในวันที่ 4 ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันคือ 75.52% และ 76.72%(น้ำหนักต่อน้ำหนักกลูโคสตั้งต้น) ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณกรดดังกล่าวที่ได้จากขวดแก้วทรงกรวยธรรมดาในวันที่6 คือ 72.56% ซึ่งจะเห็นได้ว่าขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบและขวดแก้วทรงกรวยที่ใส่ขดลวดอยู่ภายในให้ผลผลิตกรดเร็วกว่าขวดแก้วทรงกรวยธรรมดาถึง 2 วันดังแสดงในรูปที่ 13 เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ในภาชนะทั้ง 3 แบบซึ่งแสดงไว้ในรูปที่13 เช่นกันก็สอดคล้องกับปริมาณการผลิตกรด คือจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบและขวดแก้วทรงกรวยที่ใส่ขดลวดอยู่ภายใน ใช้น้ำตาลเกือบหมดในวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด ในขณะที่การใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ในขวดแก้วทรงกรวยธรรมดานั้นช้ากว่า 2 วันเช่นเดียวกันกับการผลิตกรด แสดงให้เห็นว่าชนิดของภาชนะที่ใช้มีผลต่อการผลิตกรด กล่าวคือภาชนะที่ได้รับการออกแบบให้อากาศสามารถเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มาก (ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบและขวดแก้วทรงกรวยที่ใส่ขดลวดอยู่ภายใน) ทำให้มีการเติมออกซิเจนให้กับน้ำตาลกลูโคสมากขึ้นจึงทำให้มีผลผลิตกรดสูงและเร็วตามไปด้วย

ตามที่ได้กล่าวมาแล้วว่า ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบและขวดแก้วทรงกรวยที่ใส่ขดลวดอยู่ภายในนั้นให้ผลผลิตกรดได้ใกล้เคียงกันและในวันเดียวกัน แต่เนื่องจากเมื่อใกล้สิ้นสุดการทดลองสายใยของเชื้อราที่ใช้ในการทดลองนี้ในขวดแก้วทรงกรวยที่ใส่ขดลวดอยู่ภายในนั้นจะเกาะอยู่กับขดลวดทำให้การตรวจสอบการเติบโตทำได้ลำบาก ดังนั้นการเปรียบเทียบผลผลิตกรดเมื่อความเร็วของเครื่องเขย่าต่างๆกัน จึงเลือกใช้ภาชนะ 2 ชนิดคือ ขวดแก้วทรงกรวยธรรมดาและขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบ

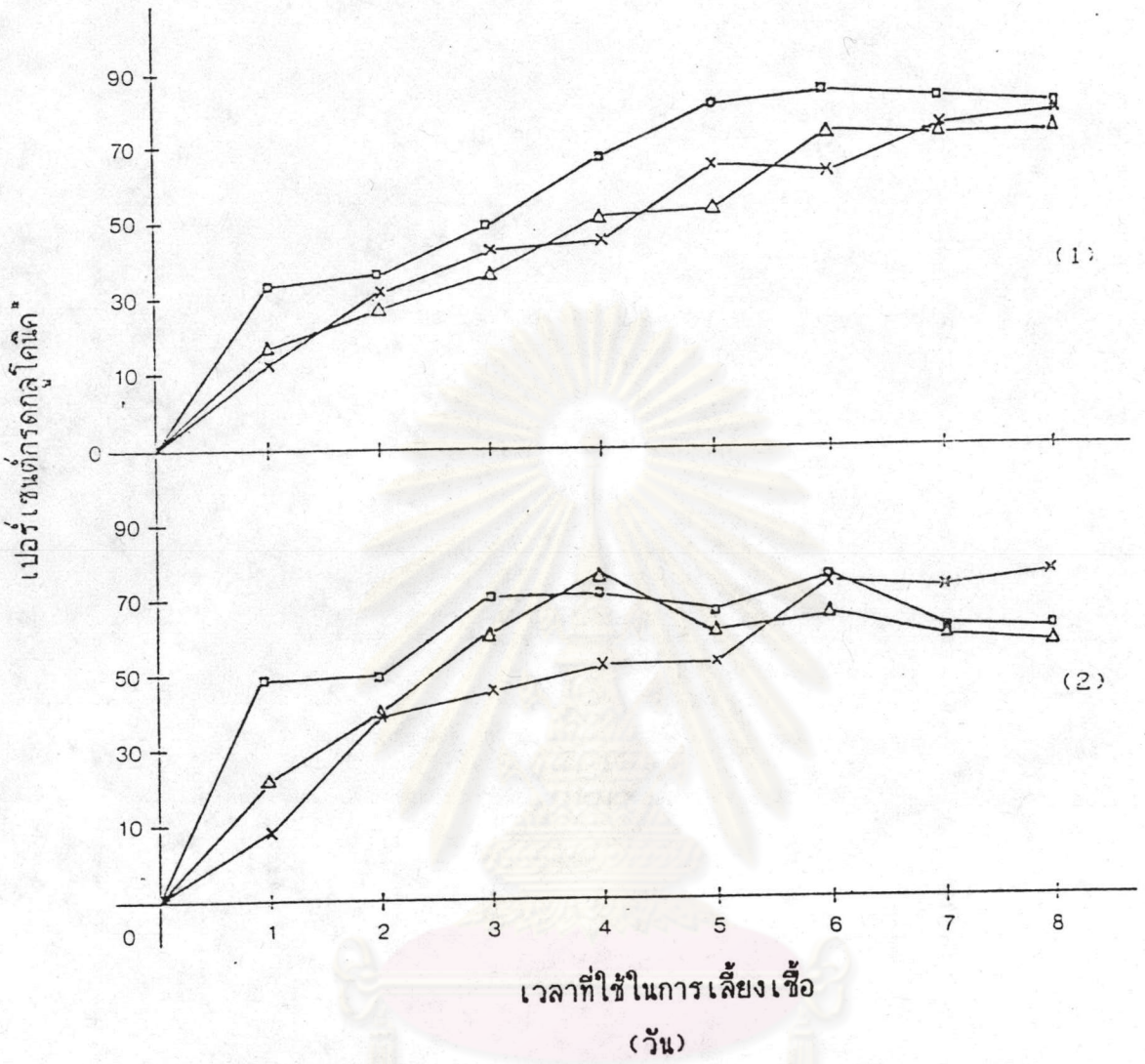
เมื่อใช้ภาชนะ 2 แบบ คือ ขวดแก้วทรงกรวยธรรมดา และ ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบ แล้วแปรผันความเร็วของเครื่องเขย่าเป็น 100 200 และ 300 รอบต่อนาที พบว่า ปริมาณกรดกลูโคนิคที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นก็จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเร็วของเครื่องเขย่า โดยเฉพาะในช่วงวันแรก ๆ ก่อนที่จะได้กรดปริมาณสูงสุด ดัง



* คิดจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น

รูปที่ 13 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคและการใช้น้ำตาลกลูโคส เมื่อใช้ภาชนะบรรจุต่างชนิดกัน 3 แบบ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 8 วัน

□ หมายถึง ขวดแก้วทรงกรวย
▨ หมายถึง ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบ
■ หมายถึง ขวดแก้วทรงกรวยที่ใส่ขดลวดอยู่ภายใน



* คิดจากปริมาณกลูโคสตั้งต้นที่ใช้

รูปที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคเมื่อแปรผันความเร็วของเครื่องเขย่า 3 ความเร็วคือ 100 200 และ 300 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 8 วัน

(1) หมายถึง ขวดแก้วทรงกรวยธรรมดา

(2) หมายถึง ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบ

×——× หมายถึง ความเร็ว 100 รอบต่อนาที

△——△ หมายถึง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

▫——▫ หมายถึง ความเร็ว 300 รอบต่อนาที

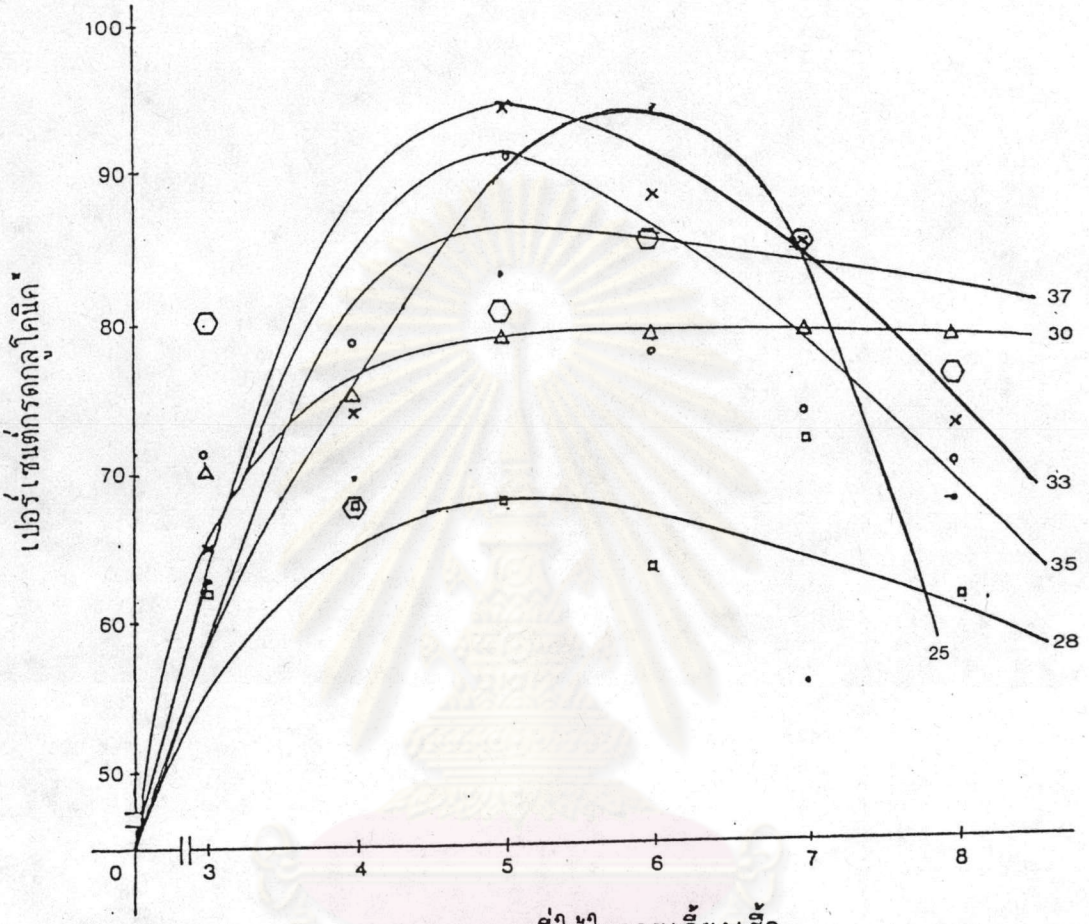
แสดงในรูปที่ 14 ในกรณีของขวดแก้วทรงกรวยธรรมดา (รูปที่ 14(1)) เมื่อเพิ่มความเร็วของเครื่องเขย่าปริมาณก็เพิ่มไปด้วย แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรด พบว่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้ปริมาณกรดสูงมากขึ้นเรื่อยๆจนสูงสุดที่ 81.60% (น้ำหนักต่อน้ำหนักกลูโคสที่ใช้)ในวันที่6 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนที่ความเร็ว 100 และ 200 รอบต่อนาทีให้ปริมาณต่ำกว่า

ส่วนผลการทดลองในรูปที่ 14(2) ซึ่งใช้ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบ แสดงให้เห็นว่าที่ความเร็วของเครื่องเขย่าเท่ากับ 200 และ 300 รอบต่อนาทีให้ปริมาณสูงกว่า 100 รอบต่อนาที และเมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 4 วัน ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ให้ปริมาณสูงถึง 75.52%(น้ำหนักต่อน้ำหนักกลูโคสที่ใช้)ในขณะที่ปริมาณกรดกลูโคนิคที่ได้จากขวดแก้วทรงกรวยธรรมดาในวันเดียวกันได้เพียง 48% ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบถึงข้อได้เปรียบในแง่ของการประหยัดพลังงาน ระยะเวลาในการผลิตและปริมาณผลผลิตระหว่างการใช้ขวดแก้วทั้ง 2 แบบเมื่อเขย่าที่ความเร็วต่างๆกันดังที่ทำการทดลอง พบว่าการใช้ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบและใช้ความเร็วของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาทีเหมาะสมที่จะเลือกใช้ในการทดลองต่อไป

4. <u>ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดย Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153</u>

เมื่อแปรผันอุณหภูมิเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค 6 อุณหภูมิคือ 25 28 30 33 35 และ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดปริมาณการผลิตกรดทุกวันจนครบ 8 วัน พบว่า อุณหภูมิที่ให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูง คือ 25 และ 33 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดเท่ากับ 94.16% และ 94.08% ในวันที่ 6 และ 5 ของการเลี้ยงเชื้อตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 15 ที่อุณหภูมิเกินกว่า 33 องศาเซลเซียสคือ 35 และ 37 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดได้สูงรองลงมาคือ 91.20% และ 87.60% ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน ซึ่งจะเห็นได้ว่า <u>Aspergillus</u> sp.สายพันธุ์ G153 เป็นจุลินทรีย์ที่มีข้อได้เปรียบที่สามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้มากเมื่อเลี้ยงเชื้อในอุณหภูมิค่อนข้างสูง

เมื่อพิจารณาถึงการประหยัดพลังงานที่จะต้องใช้ในการปรับอุณหภูมิให้ได้ตามต้องการแล้ว ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องของประเทศไทยมีความเหมาะสมที่สุด ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิดังกล่าวนี้เพื่อใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิคในการทดลองต่อๆไป



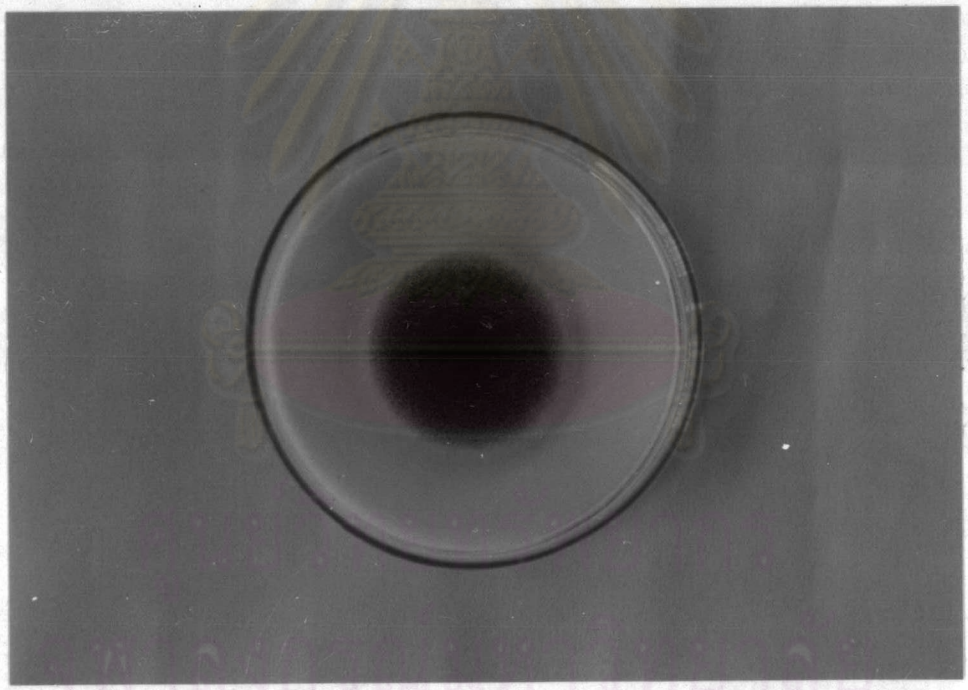
รูปที่ 15 ผลการเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิค เมื่อแปรผันอุณหภูมิในระหว่างการเลี้ยงเชื้อต่างๆกัน เลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 วัน

- • หมายถึง 25 องศาเซลเซียส
- ▫ หมายถึง 28 องศาเซลเซียส
- △ หมายถึง 30 องศาเซลเซียส
- × หมายถึง 33 องศาเซลเซียส
- ◦ หมายถึง 35 องศาเซลเซียส
- ⬡ หมายถึง 37 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ผลการตรวจการเติบโตของ Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 เมื่อมีแคลเซียมกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอน

หลังจากเลี้ยงเชื้อ Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 บนอาหารแข็งสูตรที่ 2 แต่ใช้แคลเซียมกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวแทนน้ำตาลกลูโคสแล้วตรวจดูการเติบโตทุกวันโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี พบว่า Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 สามารถเติบโตโดยใช้แคลเซียมกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ช้ากว่าการเติบโตเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งโปเตโตเดกซ์โตรส ดังแสดงในตารางที่5 และรูปที่ 16



รูปที่ 16 การเติบโตของ Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153 เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งสูตรที่ 2 แต่ใช้แคลเซียมกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส

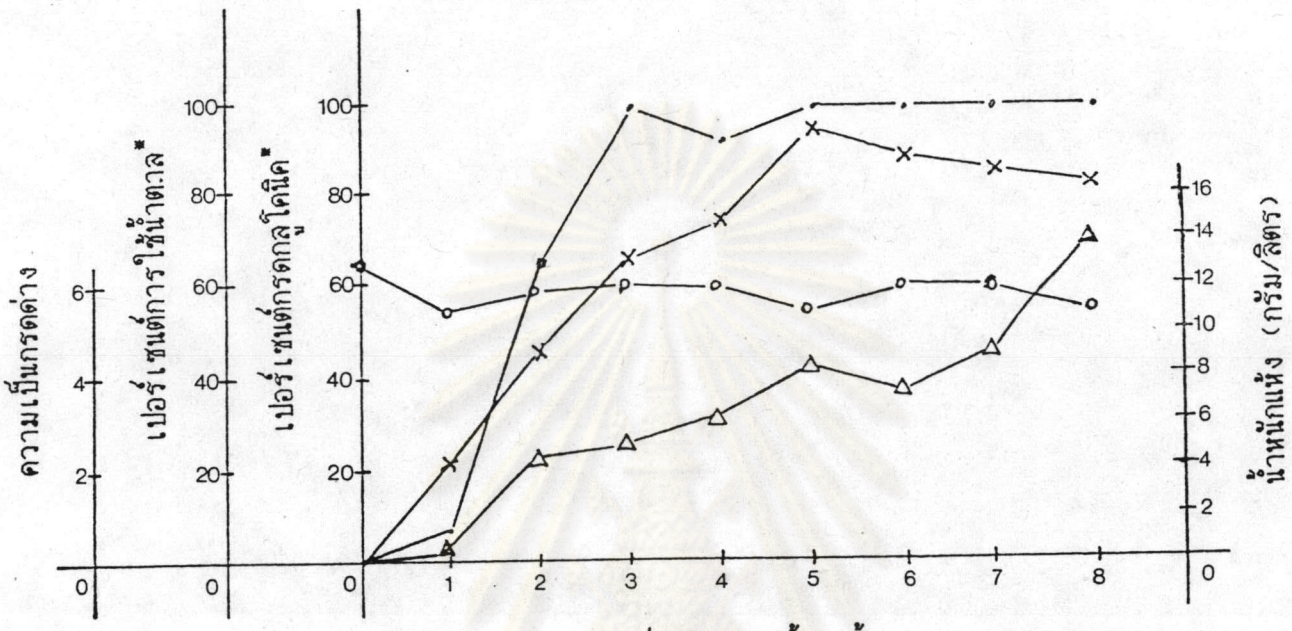
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการเติบโตโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G153 บนอาหารแข็ง 2 ชนิด

เวลาเลี้ยงเชื้อ (วัน)	ความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	
	อาหารแข็งโปเตโตเดกซ์โตรส	อาหารแข็งสูตรที่ 2 ที่ใช้แคลเซียมกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอน
1	0.3	0
2	1.2	0.1
3	2.8	0.1
4	4.6	0.3
5	6.2	0.7
6	9.4	1.2
7	9.5	2.5

6. ผลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพภายในขวดทดลองในระหว่างการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค

เมื่อได้ผลการทดลองเกี่ยวกับสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแล้ว จึงได้นำมาตรวจความเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 8 วัน แสดงผลการทดลองไว้ในรูปที่ 17

จากรูปที่17จะได้ว่าการเปลี่ยนแปลงในขวดทดลองที่ใช้สภาวะต่างๆที่กล่าวมาในวิธีการทดลองข้อ 11 นั้น กรดจะถูกสร้างขึ้นควบคู่ไปกับการใช้น้ำตาลและการเติบโตโดยในวันที่มีปริมาณกรดสูงสุดก็จะเป็นวันที่มีการใช้น้ำตาลสูงสุดเช่นเดียวกัน ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 5-6 ตลอดการทดลอง นั่นคือแคลเซียมคาร์บอเนตที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณ 24% (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำตาลกลูโคสที่ใช้) นั้นเพียงพอ การเติบโตเพิ่มสูงขึ้นตามวันเวลาของการเลี้ยงเชื้อ แต่หลังจาก 7 วันไป น้ำหนักแห้งของสายใยเพิ่มขึ้นมากในขณะที่น้ำตาลกลูโคสถูกใช้ไปเกือบ 100%



* คิดจากปริมาณกลูโคสตั้งต้นที่ใช้

รูปที่ 17 ปริมาณกรดกลูโคนิค การใช้น้ำตาล ความเป็นกรดด่าง และการเติบโตของ Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะต่างๆที่เหมาะสมที่สุดต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค

x——x หมายถึง กรดกลูโคนิค

·——· หมายถึง การใช้น้ำตาล

o——o หมายถึง ค่าความเป็นกรดด่าง

△——△ หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

แล้วและปริมาณกรดก็ลดลงทันทีอย่างเห็นได้ชัด การที่น้ำหนักสายใยเพิ่มขึ้นเป็นเพราะราที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้แคลเซียมกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเติบโตต่อไปได้

ผลการใช้น้ำตาลจากการหมักข้าวเพื่อทดแทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์

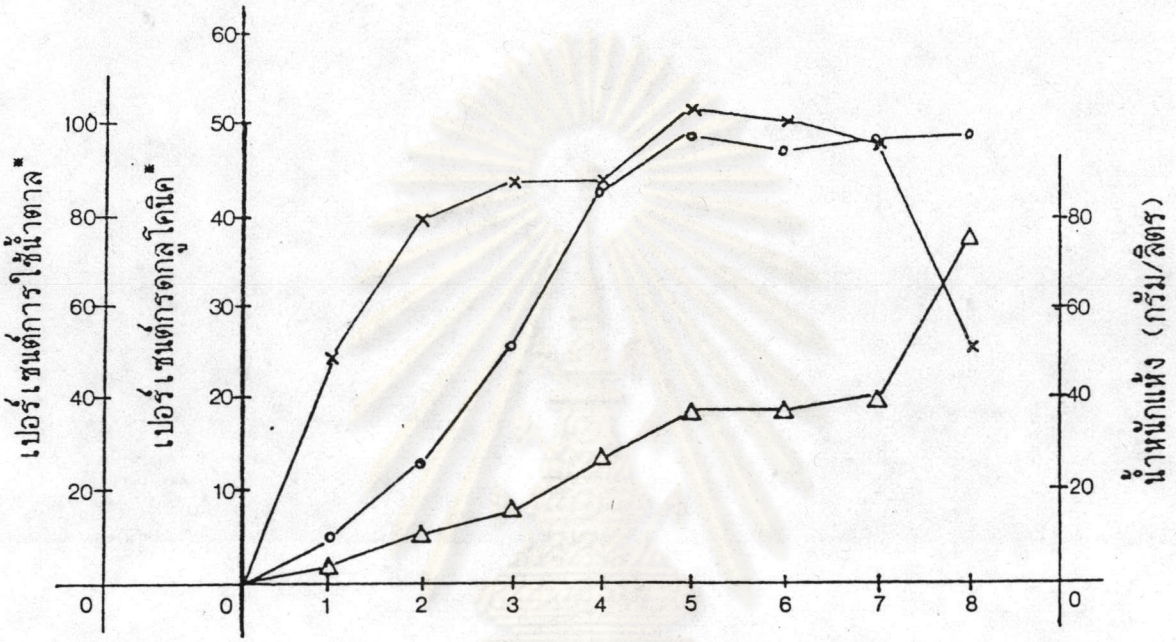
1. ผลการเตรียมน้ำตาลจากการหมักข้าว

เมื่อวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สกัดออกมาจากข้าวเหนียวซึ่งหมักด้วย Rhizopus sp. นาน 48-52 ชั่วโมง ด้วยวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 6.3 พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสถึง 14.20 กรัมต่อน้ำที่ใช้สกัด 100 มิลลิลิตรซึ่งเป็นปริมาณที่สูงมากสามารถใช้น้ำสกัดนี้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ได้

2. ผลจากการใช้น้ำตาลจากการหมักข้าวเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 ในน้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวดังกล่าวข้างต้นเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสูตรที่ 2 โดยจัดให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการหมักข้าวเท่ากับน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ที่เคยใช้ คือ 25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 33 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดดังกล่าวได้ดังแสดงในรูปที่ 18

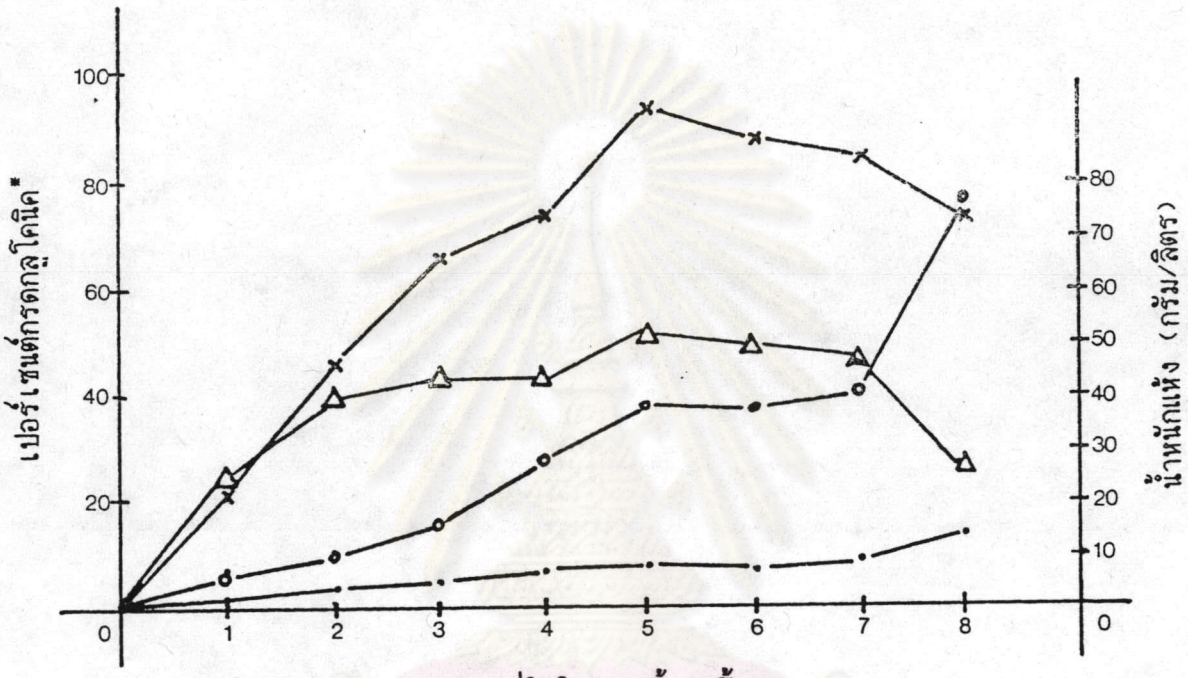
จากรูปที่ 18 จะเห็นว่า น้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวโดยเชื้อ Rhizopus sp. ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคได้ แต่ให้ปริมาณต่ำคือให้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 52.72% (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำตาลกลูโคสที่ใช้) เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ปริมาณกรดสูงสุดที่ได้จากน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์คือ 94.08% (น้ำหนักต่อน้ำหนักกลูโคสที่ใช้) ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ จะเห็นได้ว่าการใช้น้ำตาลจากการหมักข้าวให้ปริมาณกรดกลูโคนิคต่ำกว่าถึง 41.36% ดังแสดงในรูปที่ 19 เมื่อพิจารณาถึงการเติบโตระหว่างการผลิตกรดจากน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว พบว่าการเติบโตระหว่างการผลิตกรดดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลจากการหมักข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนมีมากกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเติบโตในวันที่ 7 ที่สูงกว่าถึง 5 เท่า



* คิดจากปริมาณกลูโคสตั้งต้นที่ใช้

รูปที่ 18 ปริมาณกรดกลูโคนิค การใช้น้ำตาล และการเติบโตของ Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลจากการหมักข้าว โดยใช้สภาวะต่างๆที่ได้จากการทดลอง

×——× หมายถึง กรดกลูโคนิค
○——○ หมายถึง การใช้น้ำตาล
△——△ หมายถึง การเติบโต



* คิดจากปริมาณกลูโคสตั้งต้นที่ใช้

รูปที่ 19 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคและน้ำหนักแห้งที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 2 ชนิด เลี้ยงเชื้อที่ 33 องศาเซลเซียส นาน 8 วัน

×——× หมายถึง กรดกลูโคนิคที่ได้จากน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์

△——△ หมายถึง กรดกลูโคนิคที่ได้จากน้ำตาลจากการหมักข้าว

•——• หมายถึง น้ำหนักแห้งที่ได้จากน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์

○——○ หมายถึง น้ำหนักแห้งที่ได้จากน้ำตาลจากการหมักข้าว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซึ่งจะเห็นได้ว่า สามารถใช้น้ำตาลจากการหมักข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคด้วยรา Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 แต่ให้ปริมาณกรดต่ำกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย