บทที่ 3

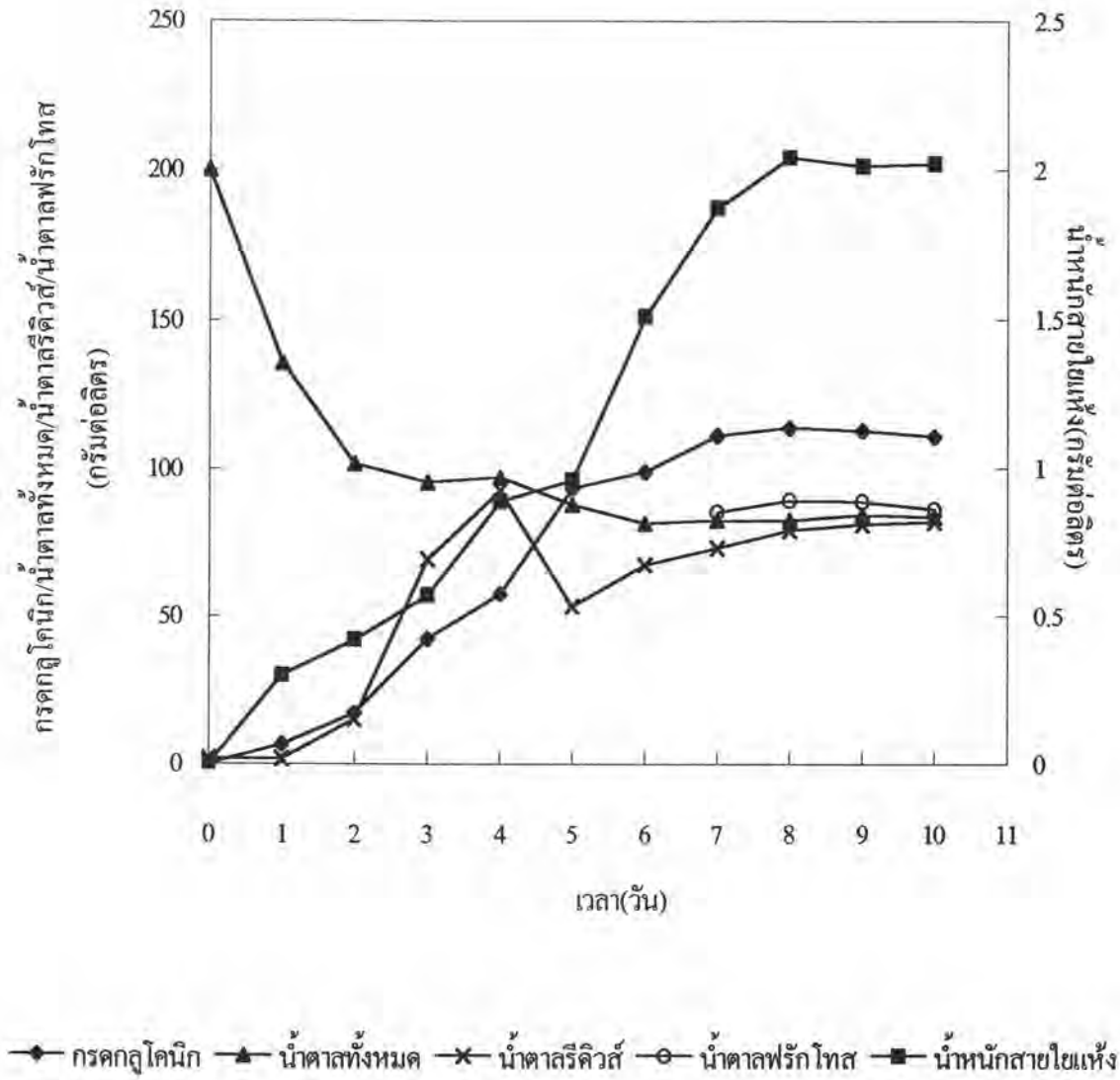
ผลการวิจัย

1. การหาปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกโดยมี น้ำตาลฟรักโตสเป็นผลผลิตร่วมจากน้ำตาลทรายในระดับขวดเขย่า

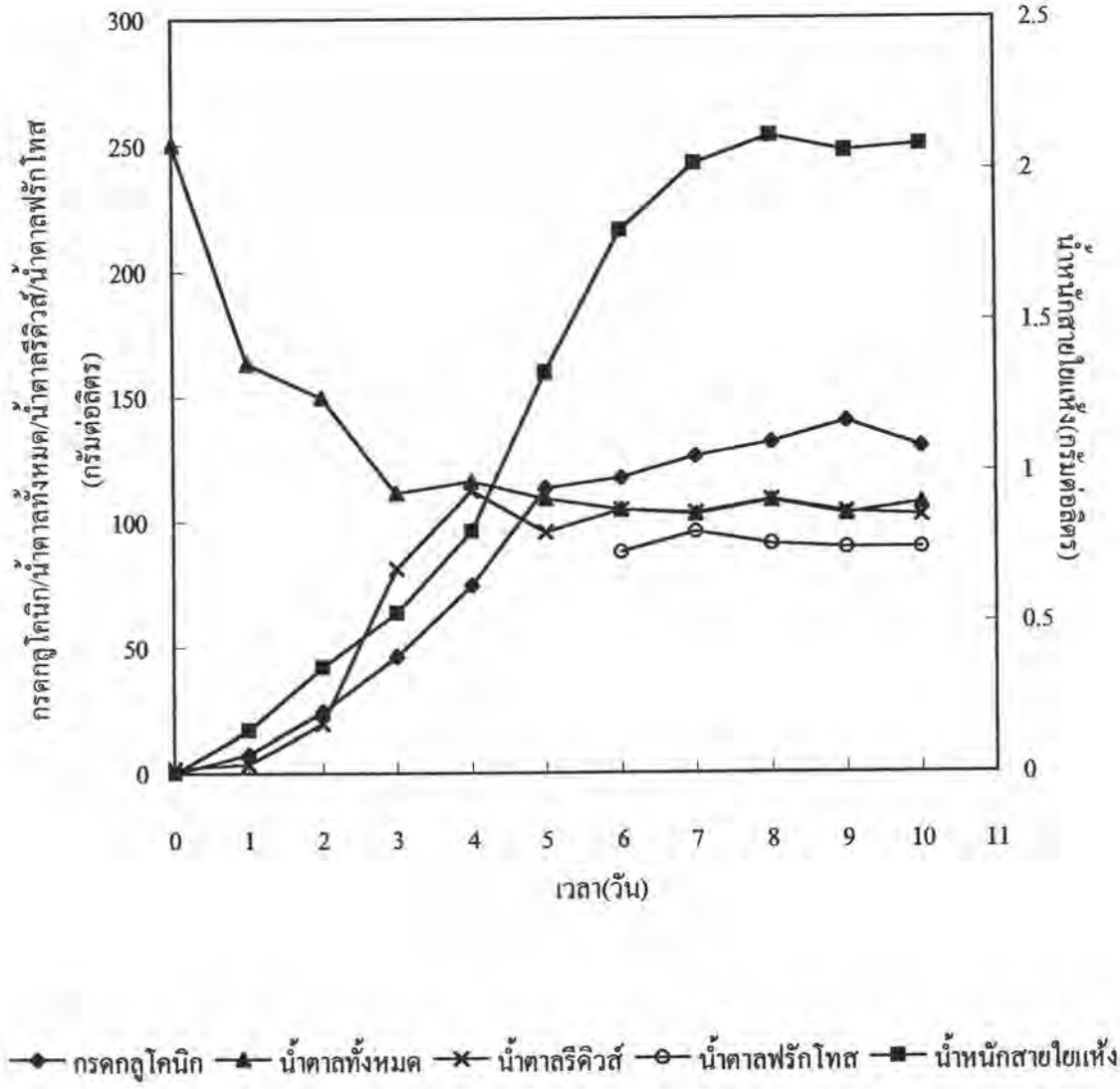
1.1 ผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลทรายในอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยทั่วไปแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิกได้แก่ น้ำตาลกลูโคส แต่ก็ได้มีการนำเอาวัตถุดิบอื่นๆที่มีราคาถูกกว่ามาใช้ทดแทน เช่น แป้งที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์อะมายเลส (บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536; Ziffer และคณะ, 1969; Su และคณะ, 1977; Kundu และ Das, 1982; Vassilev และคณะ, 1993) น้ำตาลซูโครส (Rosenberg และคณะ, 1992; Novak และคณะ, 1996) และน้ำตาลชนิดต่างๆ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้น้ำตาลทราย (refined cane sugar) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ ทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 4 คือ

ถ่ายหัวเชื้อของ *Aspergillus niger* G153 ที่เตรียมตามวิธีการทดลองข้อ 3 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก (ภาคผนวก ก.3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลทรายเป็น 200 250 300 350 400 450 500 550 และ 600 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 โดยแคลเซียมคาร์บอเนต ผลการทดลองพบว่า *Aspergillus niger* G153 สามารถใช้น้ำตาลทรายเพื่อการเจริญและผลิตกรดกลูโคนิก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลทรายขึ้นแต่ไม่เกิน 450 กรัมต่อลิตรจะได้ผลผลิตกรดเพิ่มขึ้นแต่ใช้เวลาในการผลิตนานขึ้น โดยที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 200 กรัมต่อลิตร *A. niger* G153 ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดในวันที่ 8 ของการทดลองเท่ากับ 113.67 กรัมต่อลิตรและได้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 89.09 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 5) และที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 250 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดในวันที่ 9 ของการทดลองเท่ากับ 139.62 กรัมต่อลิตรและให้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 110.74 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 6) ขณะที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร จะให้กรดกลูโคนิกสูงสุดในวันที่ 13 ของการทดลองเท่ากับ 176.54 กรัมต่อลิตรและให้

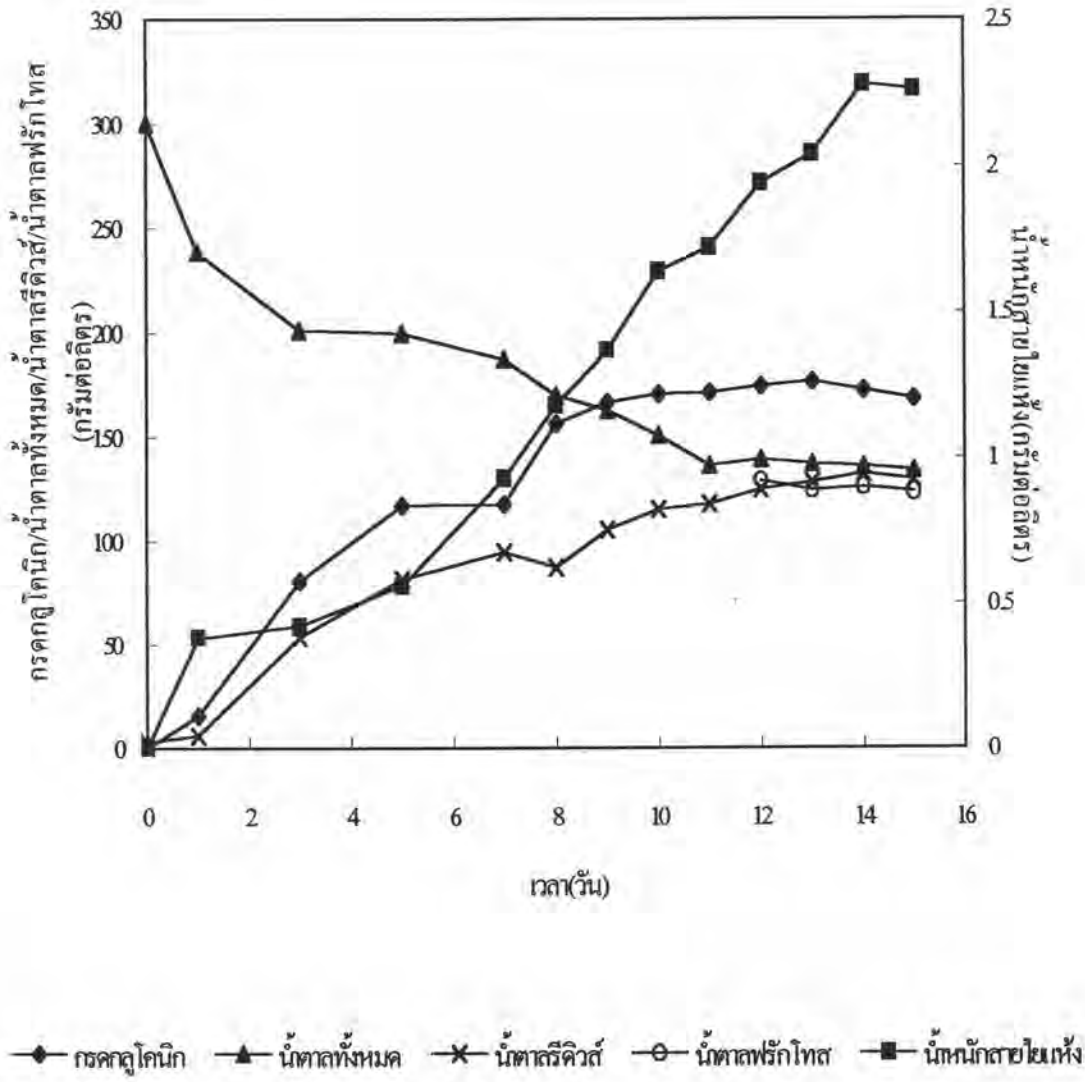


รูปที่ 5 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

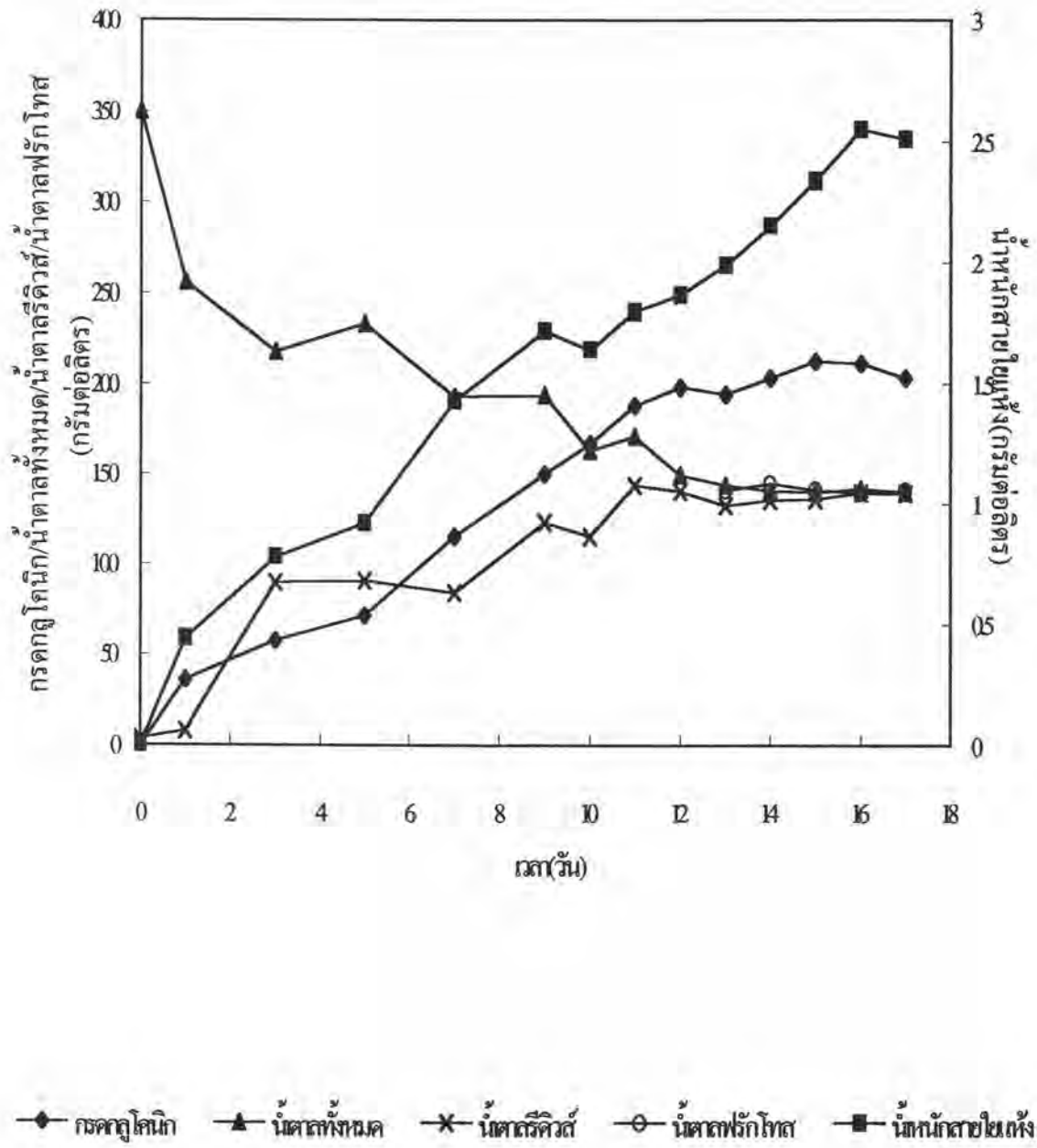


รูปที่ 6 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

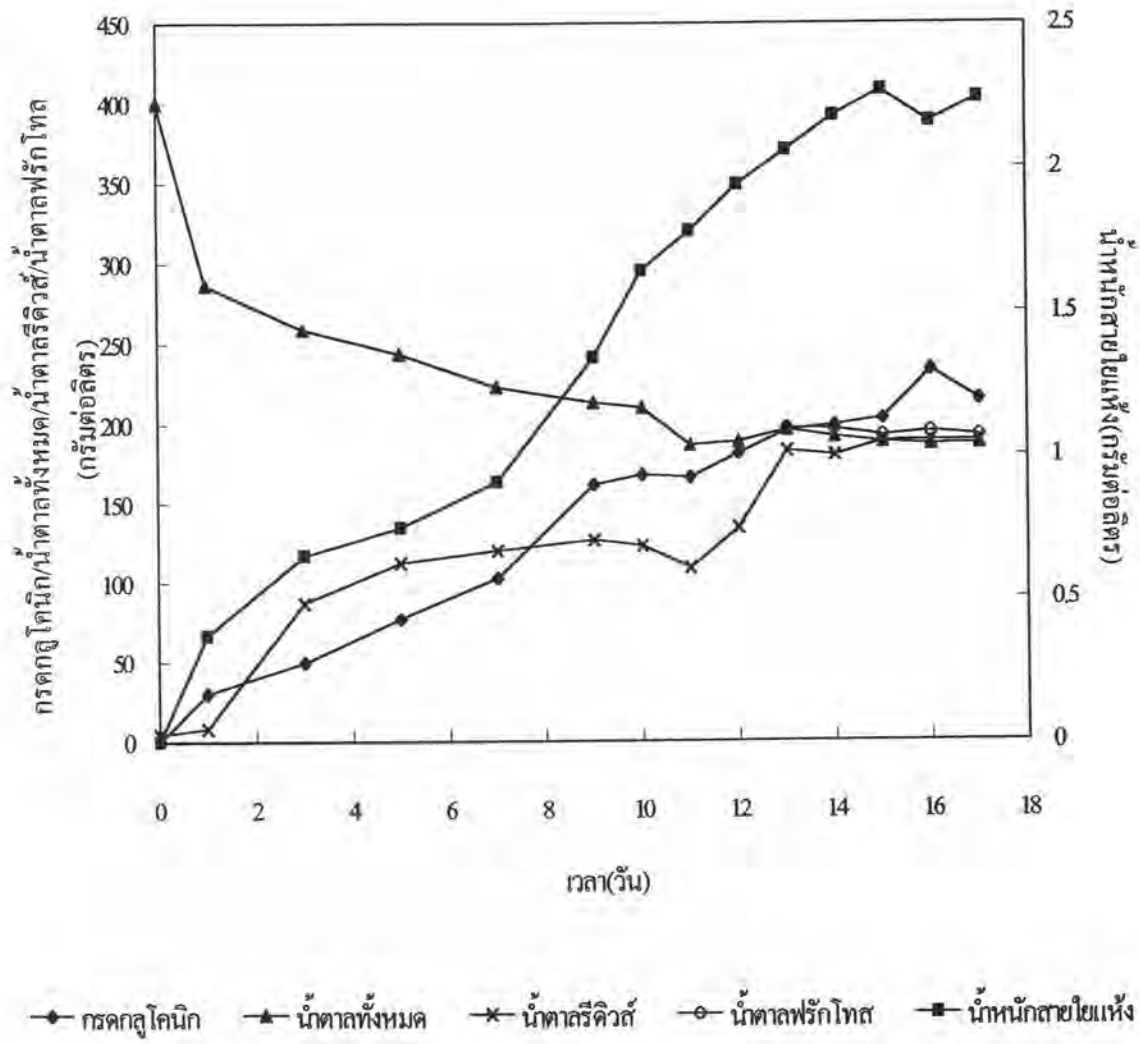
น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 124.17 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 7) ส่วนความเข้มข้นน้ำตาลทราย 350 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดในวันที่ 15 ของการทดลองเท่ากับ 212.72 กรัมต่อลิตรและให้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 141.33 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 8) เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลทรายเพิ่มเป็น 400 กรัมต่อลิตรได้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดในวันที่ 16 ของการทดลองเท่ากับ 233.62 กรัมต่อลิตรและให้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 184.76 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 9) และที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เท่ากับ 450 กรัมต่อลิตร *A. niger* G153 ผลิตกรดกลูโคนิกได้สูงกว่าความเข้มข้นอื่นๆคือได้กรดกลูโคนิกสูงสุดในวันที่ 19 ของการทดลองเท่ากับ 274.08 กรัมต่อลิตรและให้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 194.05 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 10) แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลทรายเพิ่มเป็น 500 กรัมต่อลิตร *A. niger* G153 ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดในวันที่ 19 ของการทดลองได้เพียง 226.11 กรัมต่อลิตร และให้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 244.9 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 11) เช่นเดียวกันที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 550 กรัมต่อลิตร (เริ่มเก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ในวันที่ 11) ได้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดในวันที่ 18 ของการทดลองเท่ากับ 199.27 กรัมต่อลิตรและให้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 267.27 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 12) และที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย 600 กรัมต่อลิตร *Aspergillus niger* G153 ไม่เจริญและไม่พบการผลิตกรดกลูโคนิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ไม่แสดงข้อมูล) คิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกและน้ำตาลฟรักโทสที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตรมีค่าเท่ากับร้อยละ 52.20 และ 44.54 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตรมีค่าเท่ากับร้อยละ 51.29 และ 44.30 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตรมีค่าเท่ากับร้อยละ 54.04 และ 41.39 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 350 กรัมต่อลิตรมีค่าเท่ากับร้อยละ 55.82 และ 40.38 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 400 กรัมต่อลิตรมีค่าเท่ากับร้อยละ 53.64 และ 46.19 ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 450 กรัมต่อลิตรซึ่งให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดมีค่าเท่ากับร้อยละ 55.94 และ 43.12 ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้น 500 กรัมต่อลิตรมีค่าเท่ากับร้อยละ 41.53 และ 48.98 ตามลำดับ และความเข้มข้น 550 กรัมต่อลิตรมีค่าเท่ากับร้อยละ 33.27 และ 48.59 ตามลำดับ (รูปที่ 13) และจากรูปที่ 13 จะเห็นว่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกที่ความเข้มข้นช่วงที่ใช้น้ำตาลทราย 200-450 กรัมต่อลิตรแตกต่างกันไม่มากนัก แต่เมื่อเพิ่มน้ำตาลทรายเป็น 500 และ 550 กรัมต่อลิตร ผลผลิตกรดลดลงชัดเจน ส่วนน้ำตาลฟรักโทสของทุกความเข้มข้นแตกต่างกันไม่มากนัก อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าทุกๆการทดลองให้ปริมาณกรดกลูโคนิกและน้ำตาลฟรักโทสในปริมาณมากทั้งสองชนิด



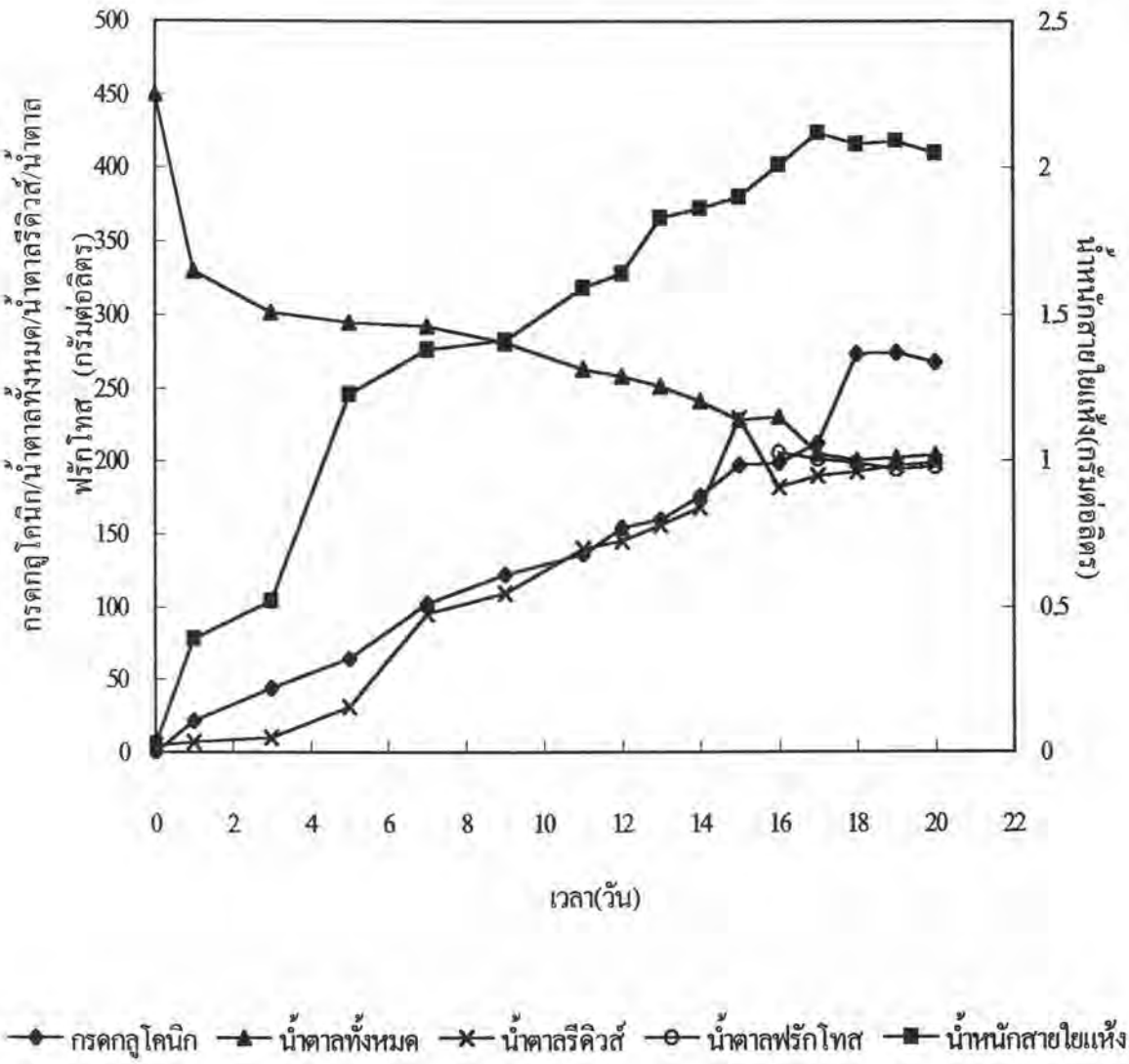
รูปที่ 7 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส



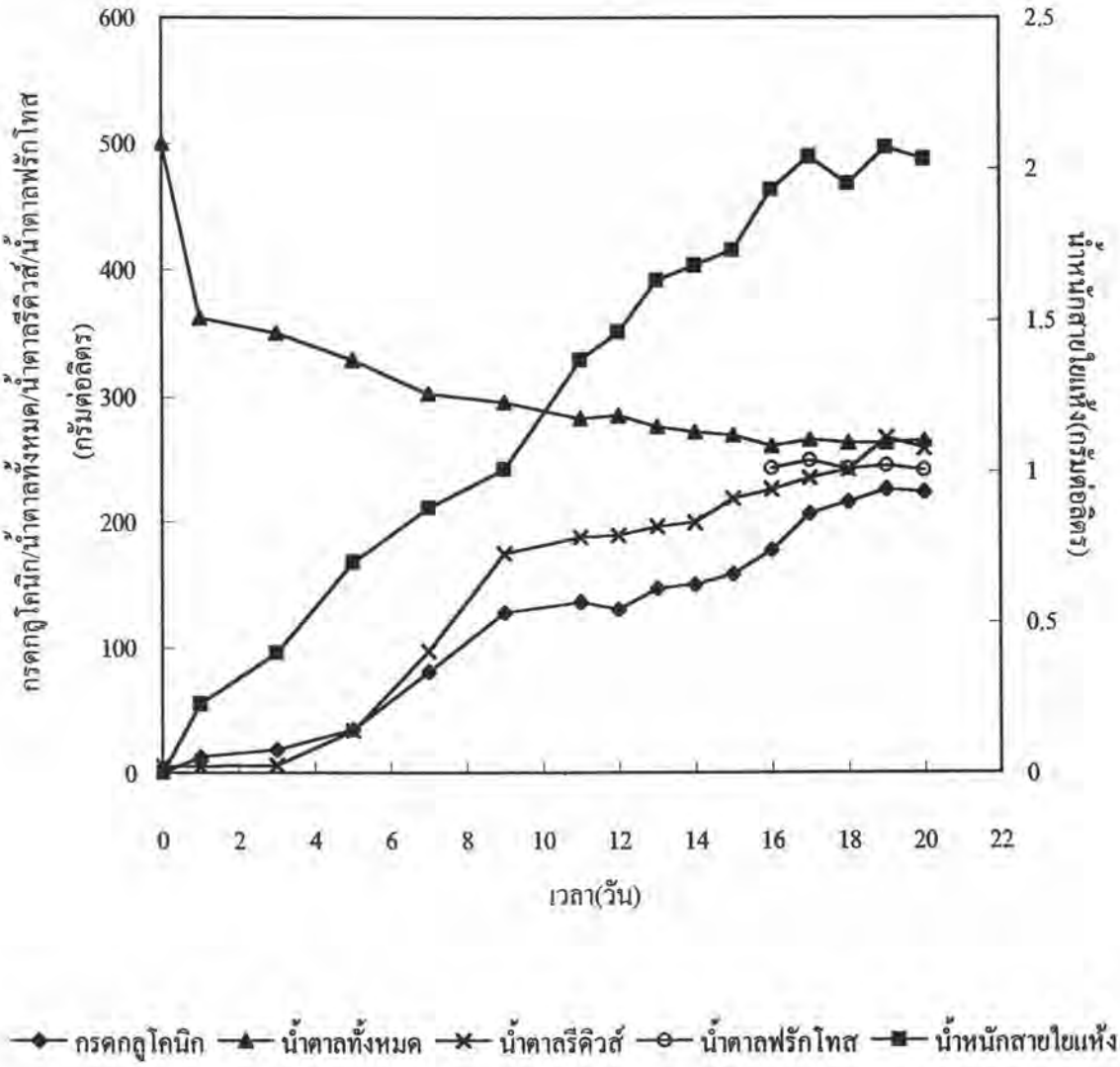
รูปที่ 8 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทราย เท่ากับ 350 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส



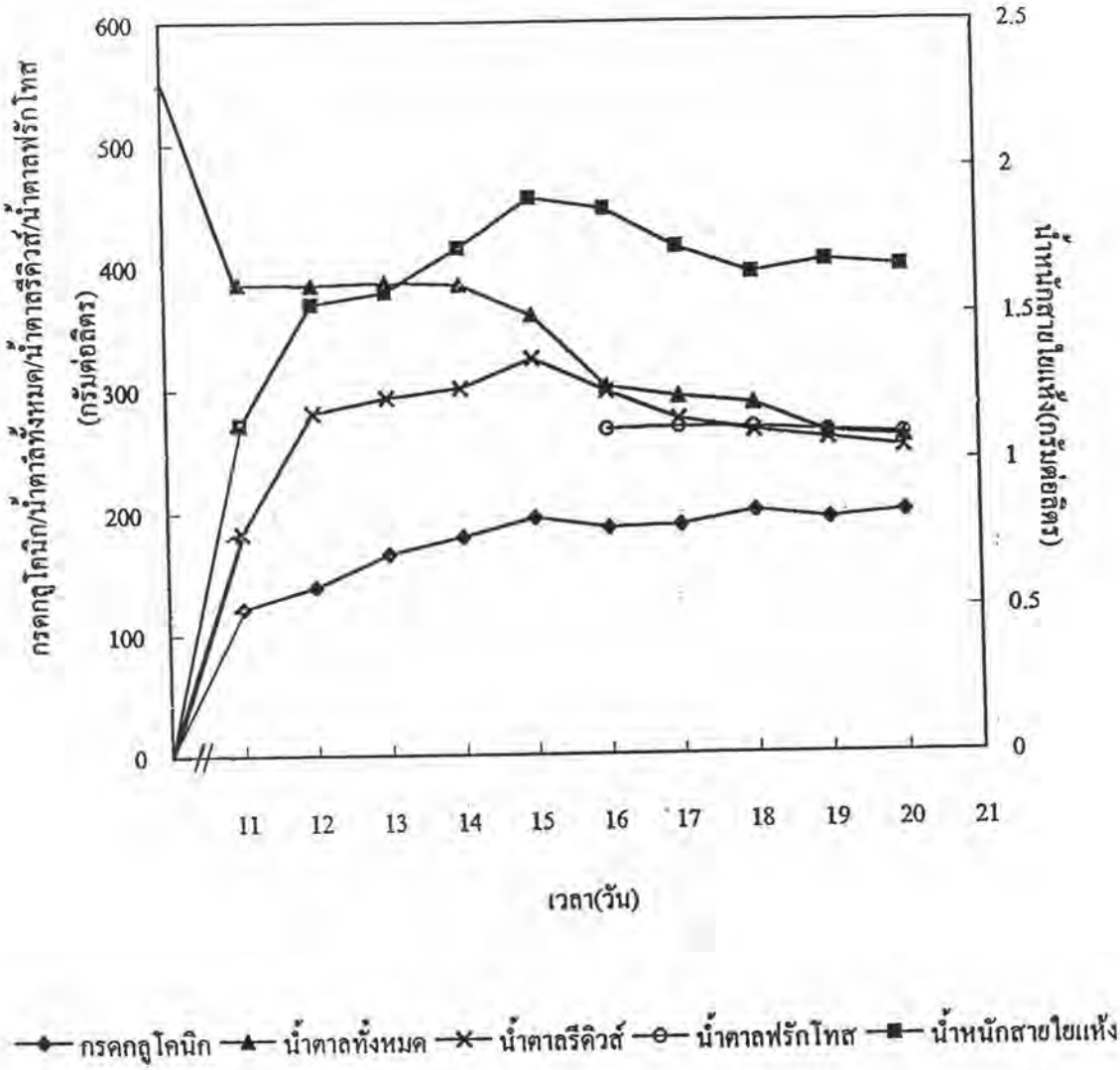
รูปที่ 9 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส



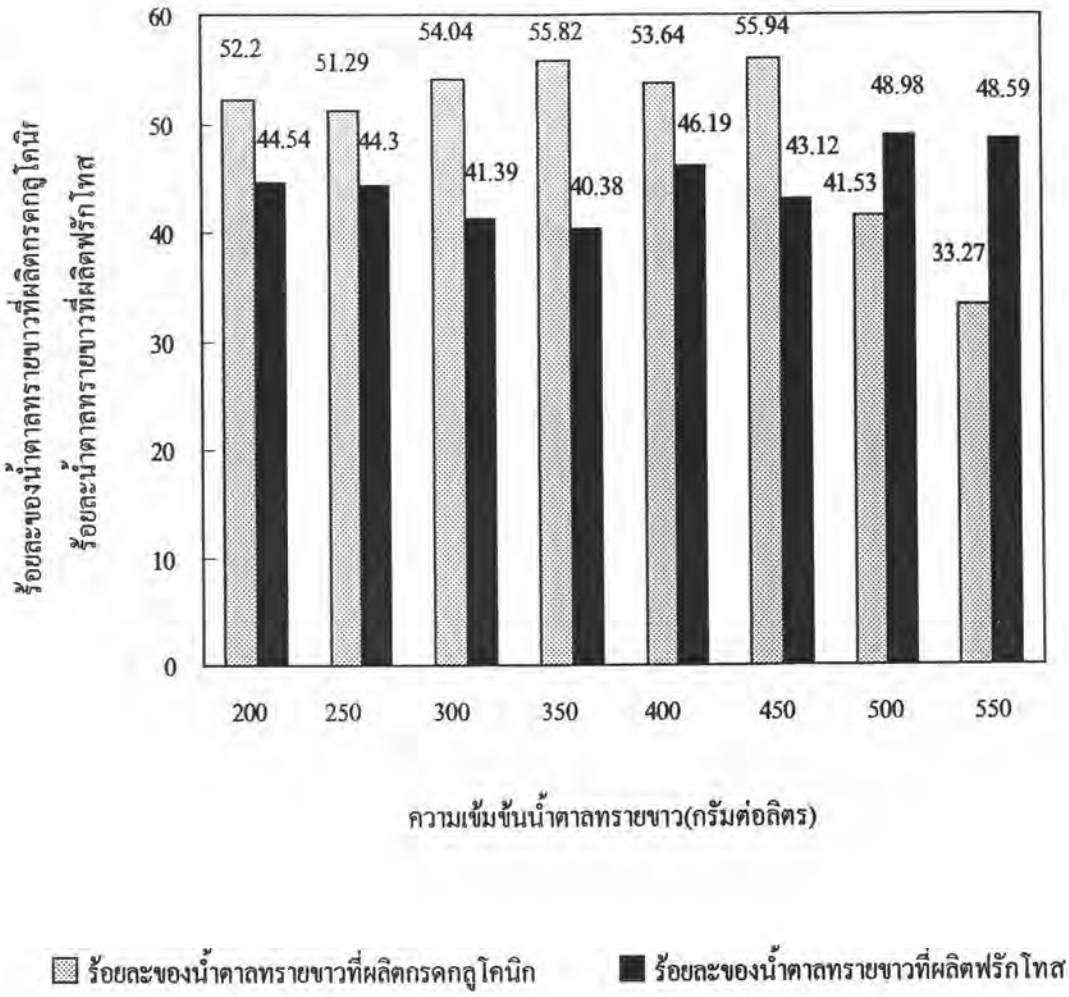
รูปที่ 10 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 450 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 11 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 500 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 12 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 550 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 13 เปรียบเทียบร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกและร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตน้ำตาลฟรักโทส ณ วันที่ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด เมื่อแปรผันความเข้มข้น น้ำตาลทรายในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

และจะเห็นได้ว่า *A. niger* G153 ใช้วัตถุดิบ (น้ำตาลทราย) ไปเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงมาก

สำหรับการเติบโต พบว่าในทุกความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่ใช้มีการเติบโตไปในทางเดียวกับการผลิตกรดคือเมื่อมีการเติบโตก็มีการผลิตกรด และเมื่อการเติบโตเพิ่มขึ้น การผลิตกรดก็จะเพิ่มขึ้นด้วย จากการเติบโตของสายใยที่เป็นไปในทางเดียวกับการผลิตกรดกลูโคนิก สอดคล้องกับทฤษฎีว่ากรดกลูโคนิกเป็นสารปฐมภูมิ (primary metabolite) นั่นคือกรดจะถูกสร้างไปพร้อมกับการเจริญของเซลล์ และในส่วนน้ำตาลฟรักโทสที่วัดเป็นระยะๆด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าปริมาณฟรักโทสจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามการเติบโตของสายใย แสดงว่าน้ำตาลฟรักโทสส่วนใหญ่ไม่ได้ถูกใช้ไปในการเติบโต และค่าน้ำหนักสายใยแห้งที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลทรายมีค่าดังนี้ ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 350 กรัมต่อลิตร ณ วันที่ได้ผลผลิตกรดสูงสุดให้น้ำหนักสายใยแห้งสูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆแต่ไม่ต่างกันนักคือเท่ากับ 2.34 กรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 550 กรัมต่อลิตร ณ วันที่ได้ผลผลิตกรดสูงสุดจะให้น้ำหนักสายใยแห้งต่ำสุดคือ 1.64 กรัมต่อลิตร ขณะที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 600 กรัมต่อลิตร ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์เลย (ไม่แสดงข้อมูล) ส่วนที่ความเข้มข้นอื่นๆ ณ วันที่ได้ผลผลิตกรดสูงสุดให้การเติบโตอยู่ในช่วง 2.04-2.16 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 10ก) แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 550 กรัมต่อลิตรขึ้นไป เป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไปทำให้การเติบโตไม่ดีจนถึงเติบโตไม่ได้

สำหรับการใช้แหล่งคาร์บอน (น้ำตาลทราย) ของ *Aspergillus niger* G253 พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในวันแรกของทุกการทดลองลดลงอย่างรวดเร็วและลดลงไปเรื่อยจนกระทั่งในช่วงท้ายการทดลองปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วัดได้เริ่มคงที่และใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ โดยการลดลงของน้ำตาลทั้งหมดที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายสูงจะใช้เวลานานกว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายต่ำ แต่มีลักษณะความชันของเส้นกราฟเหมือนกันคือมีความชันในช่วงแรกสูงและความชันจะต่ำลงเรื่อยๆ จนได้ค่าคงที่ในช่วงท้ายการทดลอง (รูปที่ 5-12) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเติบโตและการผลิตกรด โดยพบว่าช่วงแรกปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็ว การเติบโตและการผลิตกรดกลูโคนิกก็เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน และเมื่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างช้าๆและเริ่มคงที่ จะเห็นว่าการเติบโตและการผลิตกรดเกิดขึ้นช้าลงและมีแนวโน้มคงที่เช่นกัน สำหรับน้ำตาลรีดิวส์พบว่าในช่วงแรกมีปริมาณน้อย ทั้งที่น้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วอาจเนื่องมาจากน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้ถูกนำไปใช้เพื่อการเติบโตและการผลิตกรดอย่างรวดเร็ว แต่

ตารางที่ 10ก อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก ประสิทธิภาพของสายใยในการใช้สับสเตรต และประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก เมื่อแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลทราย

ความเข้มข้นน้ำตาลทราย (ก/ล)	ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุด (ก/ล) *	วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก (ก/ล/ว) *	น้ำหนักสายใยแห้ง*	$Y_{P/S}$ *	$Y_{P/X}$ *
200	113.67	8	14.21	2.04	0.52	55.72
250	139.62	9	15.51	2.06	0.51	67.78
300	176.54	13	13.38	2.04	0.54	86.54
350	212.72	15	14.18	2.34	0.56	90.90
400	233.62	16	14.60	2.16	0.54	108.16
450	274.08	19	14.42	2.09	0.56	131.14
500	226.11	19	11.90	2.07	0.42	109.23
550	199.27	18	11.07	1.64	0.33	121.51

ตารางที่ 10ข ประสิทธิภาพของสายใยการใช้สับสเตรตและในการผลิตน้ำตาลฟรักโทส เมื่อแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลทราย

ความเข้มข้นน้ำตาลทราย(ก/ล)	ปริมาณฟรักโทส (ก/ล)*	วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	$Y_{P/S}$ *	$Y_{P/X}$ *
200	89.09	8	0.44	43.67
250	110.74	9	0.44	53.76
300	124.17	13	0.41	60.87
350	141.33	15	0.40	60.40
400	184.76	16	0.46	85.54
450	194.05	19	0.43	92.85
500	244.9	19	0.49	118.31
550	267.27	18	0.48	162.97

หมายเหตุ * = คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด

ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนเริ่มคงที่ในช่วงท้ายของการทดลองซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้ (รูปที่ 5-12) ส่วนการวัดปริมาณน้ำตาลฟรักโทส พบว่าไม่สามารถทำได้หากยังมีน้ำตาลซูโครสอยู่ในน้ำหมัก เนื่องจากในวิธีการวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองข้อ 10.3 มีการเติมกรดซัลฟูริกซึ่งสามารถสลายน้ำตาลซูโครสออกเป็นกลูโคสและฟรักโทส ทำให้ค่าน้ำตาลฟรักโทสอิสระในน้ำหมักคลาดเคลื่อน จึงเริ่มวัดน้ำตาลฟรักโทสอิสระได้ในช่วงที่น้ำตาลซูโครสหมด นั่นคือช่วงที่น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวส์มีค่าใกล้เคียงกัน พบว่าปริมาณน้ำตาลฟรักโทสที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวส์ (รูปที่ 5-12) จะเห็นว่าในการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งในรูปน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์และน้ำตาลฟรักโทสพบว่าในช่วง 3-4 วันสุดท้ายของการทดลองค่าที่ได้ใกล้เคียงกันมาก ดังเช่นที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตร ณ วันที่ให้ผลผลิตกรด กลูโคนิกสูงสุดมีค่าน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ และน้ำตาลฟรักโทสเท่ากับ 201.89 196.78 และ 194.05 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งจากค่าเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลที่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อน่าจะเป็นน้ำตาลฟรักโทส และเมื่อนำตัวอย่างบางช่วงเวลาไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงตามวิธีการทดลองข้อ 10.4 พบว่าก่อนการเพาะเลี้ยง *A. niger* G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกมีแหล่งคาร์บอนอยู่ในรูป น้ำตาลซูโครส และมีน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทสปนอยู่บ้างในปริมาณที่น้อยมาก เมื่อเริ่มทำการผลิตปริมาณน้ำตาลซูโครสจะลดลง ขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทสจะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเข้าช่วงท้ายการผลิตไม่พบน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ยกเว้นที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 500 และ 550 พบน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่เล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อ) แต่พบน้ำตาลฟรักโทสชนิดเดียวในปริมาณมาก โดยปริมาณฟรักโทสที่ได้จะค่อยเพิ่มขึ้นเรื่อย ขณะที่ปริมาณกลูโคสจะเพิ่มถึงค่าหนึ่งจากนั้นปริมาณจะลดลงจนไม่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงว่ารานำเอากลูโคสไปใช้ได้ดี ขณะที่นำฟรักโทสไปใช้ได้น้อยจึงเกิดการสะสมฟรักโทสที่ได้จากการย่อยซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อคิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตน้ำตาลฟรักโทสพบว่ามีค่าสูงกว่าร้อยละ 40 ในทุกความเข้มข้นแต่ไม่มีความเข้มข้นใดที่ให้ค่าร้อยละของการผลิตฟรักโทสเท่ากับ 50 (รูปที่ 13) แสดงว่าในการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลทรายของ *A. niger* G153 จะได้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วมในปริมาณมาก โดยมีการใช้น้ำตาลฟรักโทสได้เพียงบางส่วนเท่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตน้ำตาลฟรักโทสที่ทุกความเข้มข้น (รูปที่ 13) พบว่าค่าต่ำสุดและสูงสุดเท่ากับ 40.38 และ 48.98 ตามลำดับ ขณะที่ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกมีค่าต่ำสุดและสูงสุดเท่ากับ 33.27 และ 55.94 ตามลำดับ (รูปที่ 13)

และจากข้อมูลผลผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสในแต่ละความเข้มข้นน้ำตาลทรายที่ใช้ พบว่าส่วนใหญ่กรดกลูโคนิกที่ได้มีปริมาณสูงกว่าค่ากรดสูงสุดที่ควรจะผลิตได้จากน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในน้ำตาลทราย ณ ความเข้มข้นนั้นๆ ขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรักโทสที่ได้ต่ำกว่าค่าที่ควรจะเป็น (ตารางที่ 10 กและข) ดังนั้นกรดกลูโคนิกส่วนหนึ่งน่าจะมาจากน้ำตาลฟรักโทส เมื่อคิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกพบว่าร้อยละการผลิตที่มีค่าสูงกว่าร้อยละ 50 (รูปที่ 13) แสดงว่าปริมาณกรดกลูโคนิกที่ได้มีปริมาณสูงกว่าปริมาณกรดที่ผลิตจากกลูโคส โดยที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตรซึ่งให้ผลผลิตกรดสูงสุดมีค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดคือ 55.94 รองลงมาได้แก่ความเข้มข้น 350 300 400 200 และ 250 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 55.82 54.04 53.64 52.20 และ 51.29 ตามลำดับ (ยกเว้นความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 500 และ 550 กรัมต่อลิตรมีค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกต่ำกว่าร้อยละ 50 คือเท่ากับ 41.53 และ 33.27 ซึ่งที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 550 กรัมต่อลิตรมีค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกต่ำสุด) (รูปที่13) ขณะที่ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสมีค่าสูงกว่าร้อยละ 40 แต่ต่ำกว่าร้อยละ 50 ในทุกความเข้มข้นที่ทดลองโดยที่ความเข้มข้น 200-550 กรัมต่อลิตรมีค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 44.54 44.30 41.39 40.38 46.19 43.12 48.98 และ 48.59 ตามลำดับ (รูปที่ 13) ทั้งที่ในการย่อยซูโครสจะต้องได้ฟรักโทสออกมาเป็นครึ่งหนึ่งของซูโครส การที่ปริมาณน้ำตาลฟรักโทสที่ได้ต่ำกว่าร้อยละ 50 แสดงว่ามีการนำน้ำตาลฟรักโทสบางส่วนไปใช้เพื่อการเติบโตและ/หรือการผลิตกรดกลูโคนิก ซึ่งขณะเดียวกันปริมาณกรดกลูโคนิกที่ได้สูงกว่าปริมาณกรดที่ผลิตจากกลูโคส จึงเป็นไปได้ว่ามีการนำน้ำตาลฟรักโทสบางส่วนไปใช้ผลิตกรดกลูโคนิกด้วยแต่น้อยมาก

เนื่องจากที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงที่สุดคือ 274.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 55.94 และร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสเท่ากับ 43.12 (รูปที่ 13) ซึ่งเป็นค่าที่สูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ จึงนำน้ำหมักมาวิเคราะห์กรดกลูโคนิกโดยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบกรดอินทรีย์เพียงชนิดเดียวคือกรดกลูโคนิกและปริมาณกรดกลูโคนิกที่ได้ใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่ละลาย (Takao, 1965; Sasaki และ Takao, 1967 ซึ่งเป็นวิธีทางเคมี) โดยวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่ละลายให้ปริมาณกรดกลูโคนิกที่สูงกว่าวิธี HPLC ในช่วง 1.21-3.41 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างไม่มาก ดังแสดงในตารางที่

11 และ ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดนี้วิเคราะห์พบน้ำตาลฟรักโทส 194.05 กรัมต่อลิตรเป็นผลผลิตร่วม [ใช้วิธีของ Marshall และ Kooi (1957) ซึ่งเป็นวิธีทางเคมี] เมื่อนำน้ำหมักไปวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (รูปที่ 14) พบว่าในช่วงแรกน้ำตาลซูโครสจะลดลงอย่างรวดเร็วและถูกใช้จนหมดในวันที่ 16 ส่วนน้ำตาลกลูโคสนั้นในช่วงแรกตรวจไม่พบอาจเนื่องมาจากถูกนำไปใช้เพื่อการผลิตกรดและการเติบโตอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 4 จึงเริ่มพบน้ำตาลกลูโคสในน้ำหมัก และจะถูกใช้หมดในวันที่ 18 ขณะที่ตรวจไม่พบน้ำตาลฟรักโทสในช่วงแรกเช่นกัน โดยจะเริ่มพบน้ำตาลฟรักโทสประมาณวันที่ 5 และเพิ่มปริมาณไปเรื่อยๆจนคงที่ประมาณวันที่ 16 เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองยังคงมีน้ำตาลฟรักโทสในน้ำหมัก และยังพบว่า ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดเป็นต้นไปพบเพียงแต่น้ำตาลฟรักโทสในน้ำหมักเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่ตรวจโดยวิธีทางเคมี [วิธีของ Marshall และ Kooi (1957)] กับวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าปริมาณที่ได้โดยวิธีทางเคมีสูงกว่าวิธี HPLC ในช่วง 0.64-2.25 เปอร์เซนต์ ซึ่งแตกต่างไม่มากนัก นอกจากนี้ที่ความเข้มข้น 450 กรัมต่อลิตรนี้ยังเป็นค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทรายสูงที่สุดที่ให้ผลผลิตดี ดังนั้นความเข้มข้นน้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตร จึงเป็นค่าความเข้มข้นที่ *A. niger* G153 ใช้น้ำตาลทรายเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกร่วมกับน้ำตาลฟรักโทสระดับขวดเขย่าได้คุ้มค่าที่สุด จึงเลือกใช้น้ำตาลทรายที่ความเข้มข้น 450 กรัมต่อลิตรในการทดลองต่อไป

1.2 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

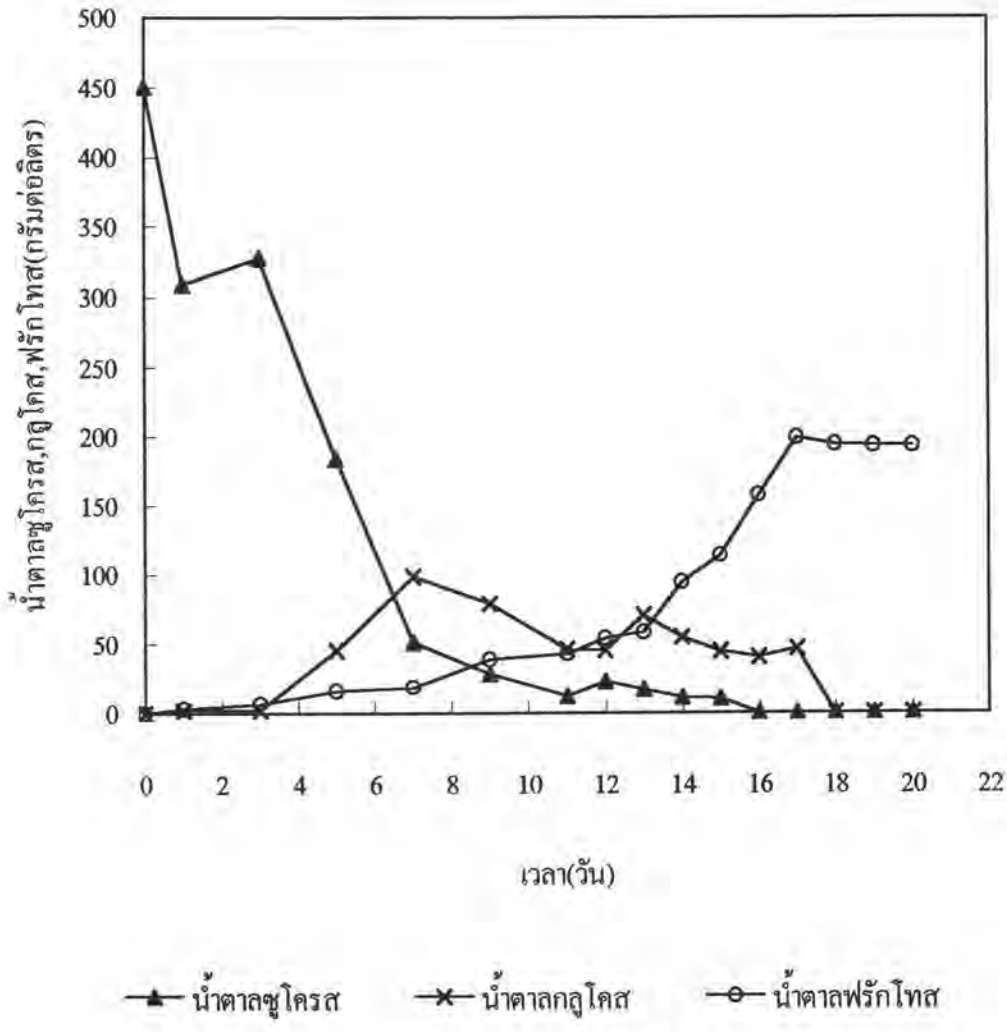
อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อนับเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตทำให้ใช้แหล่งคาร์บอนได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสม ทำให้เกิดสมดุลระหว่าการเติบโตและการผลิต และลดต้นทุน และจากการทดลองที่ 1.1 ทราบความเข้มข้นน้ำตาลทรายที่เหมาะสมคือ 450 กรัมต่อลิตร จึงทำการทดลองหาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยง *A. niger* G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆกันคือ 250:0.25 250:0.5 250:1.0 และ 250:1.5 โดยคงค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทรายไว้ที่ 450 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30$\pm$2 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอน

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิกและน้ำตาลฟรักโทส ที่วิเคราะห์โดยวิธีทางเคมี และวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงของน้ำหมัก เมื่อผลิตที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 450 กรัมต่อลิตร

วันที่ของการผลิต	กรดกลูโคนิก (ก/ล)			น้ำตาลฟรักโทส (ก/ล)		
	วิธีวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่ละลาย (Sasaki และ Takao, 1967) **	วิธี HPLC	ร้อยละของความแตกต่างเทียบกับวิธีทางเคมี	วิธีของ Marshall และ Kooi (1957) **	วิธี HPLC	ร้อยละของความแตกต่างเทียบกับวิธีทางเคมี
18	272.7	263.41	3.41	198.4	193.94	2.25
19*	274.08	270.75	1.21	194.05	192.81	0.64
20	267.13	261.28	2.19	195.78	192.78	1.53

หมายเหตุ * = วันที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด

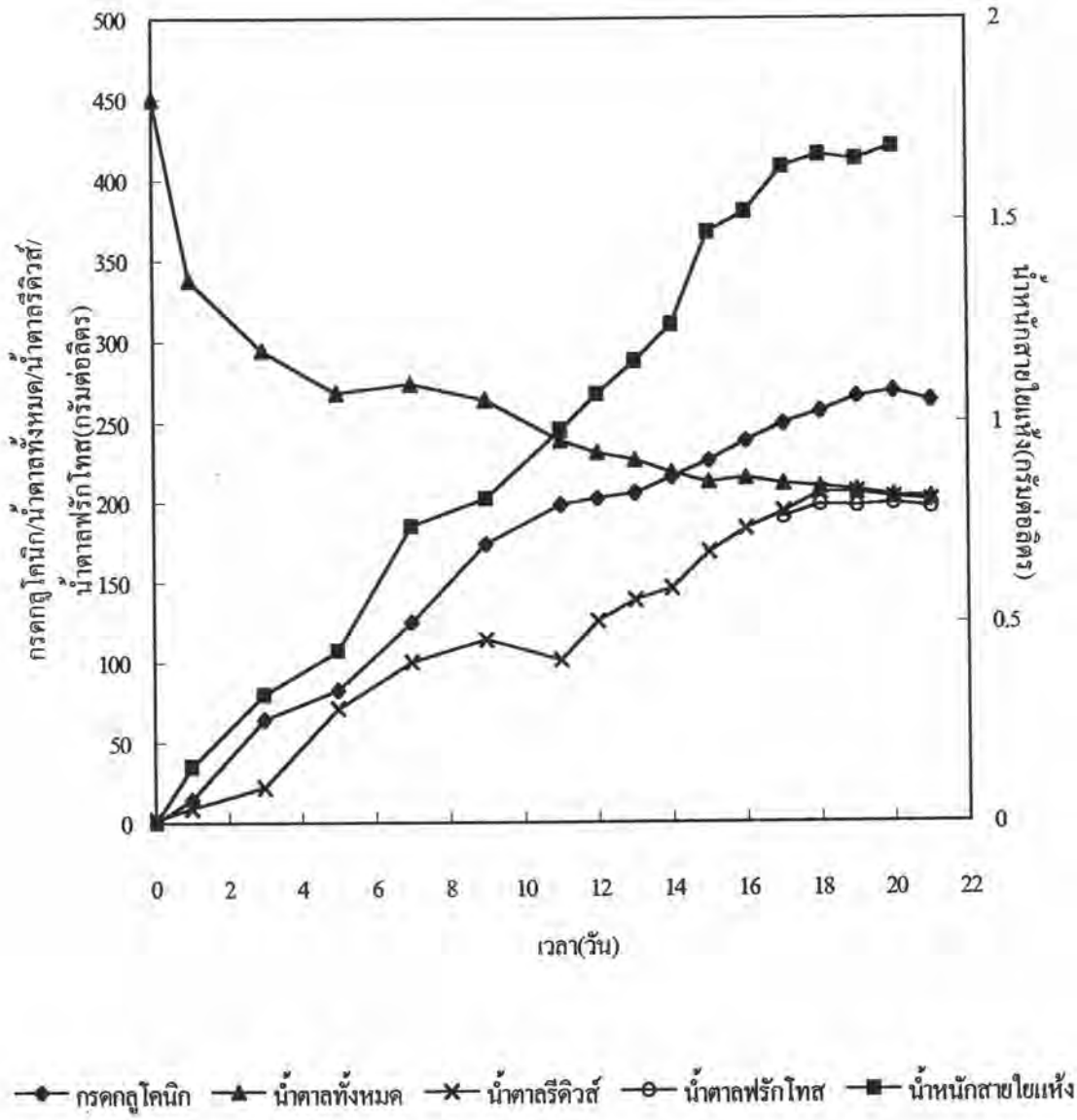
** = เป็นวิธีวิเคราะห์ทางเคมี



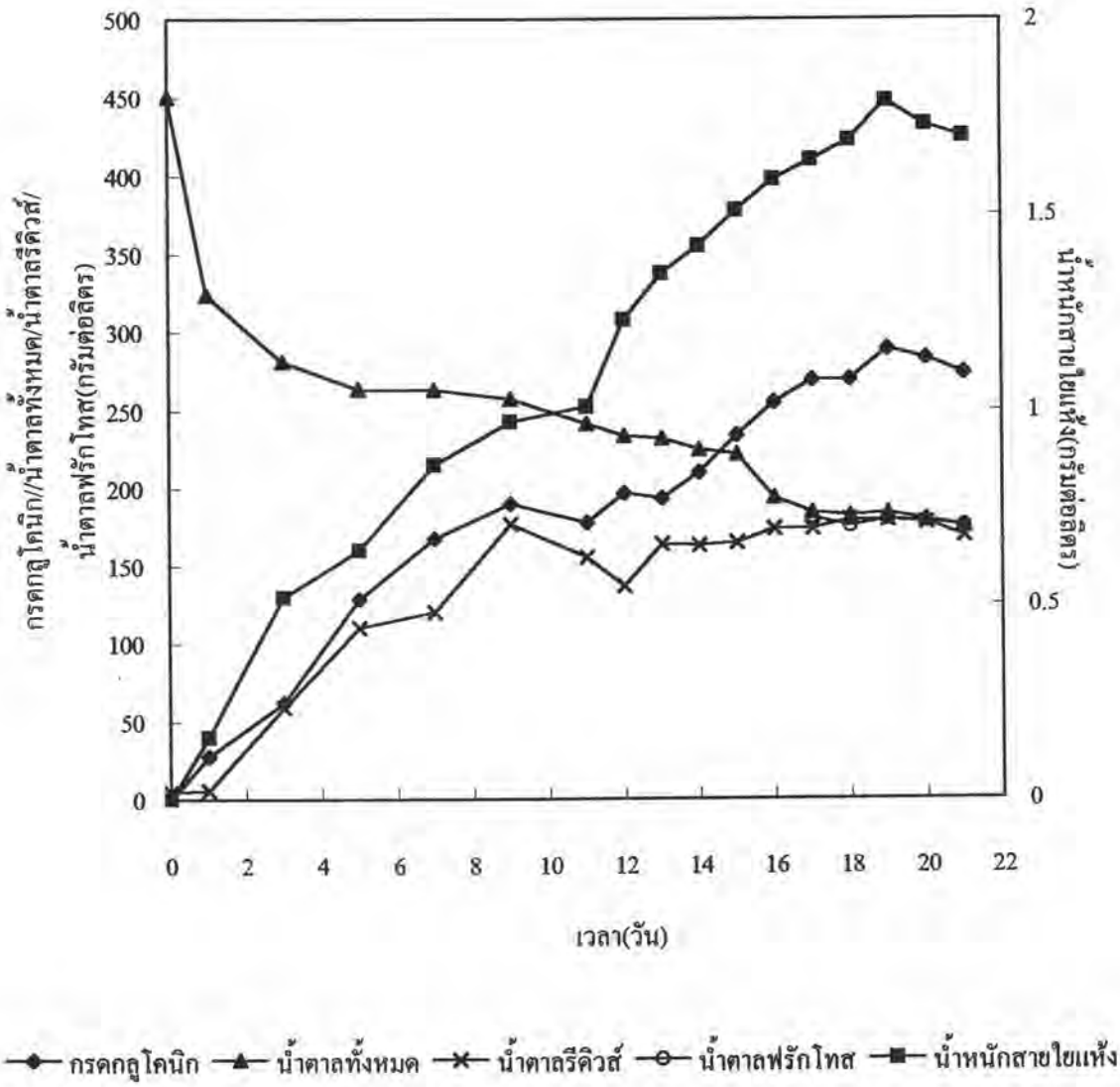
รูปที่ 14 ผลการวิเคราะห์น้ำตาลที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิตโดยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในระดับขวดเขย่า 250 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 450 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

ต่อไนโตรเจน 250:0.25 ได้กรดกลูโคนิกสูงสุดในวันที่ 20 ของการทดลองเท่ากับ 268.71 กรัมต่อลิตรและให้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 198.88 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 15) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดเท่ากับ 13.44 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตารางที่ 12ก) ขณะที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 250:0.5 ผลิตกรดกลูโคนิกสูงกว่าที่อัตราส่วนอื่นๆคือในวันที่ 19 ของการทดลองผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 288.56 กรัมต่อลิตร และได้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 179.39 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 16) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดเท่ากับ 15.18 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตารางที่12 ก) สำหรับอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 250:1.0 ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดในวันที่ 19 ของการทดลองคือเท่ากับ 280.08 กรัมต่อลิตรและให้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 181.85 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 17) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดเท่ากับ 14.74 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตารางที่12 ก) แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 250:1.5 ได้กรดกลูโคนิกสูงสุดในวันที่ 20 ของการทดลองคือเท่ากับ 204.31 กรัมต่อลิตร และให้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 213.45 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 18) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดเท่ากับ 10.22 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตารางที่12 ก) จะเห็นว่าที่อัตราส่วนที่ให้ปริมาณกรดมากจะได้ปริมาณน้ำตาลฟรักโทสต่ำกว่าอัตราส่วนที่ให้ปริมาณกรดน้อย โดยปริมาณกรดกลูโคนิกที่ได้จากอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 250:0.25 250:0.5 และ 250:1 มากกว่าปริมาณกรดที่ควรได้จากกลูโคสทั้งหมด แสดงว่ามีการนำฟรักโทสส่วนเล็กน้อยบางส่วนมาใช้ผลิตกรดกลูโคนิก แต่ฟรักโทสส่วนใหญ่ยังคงเหลืออยู่

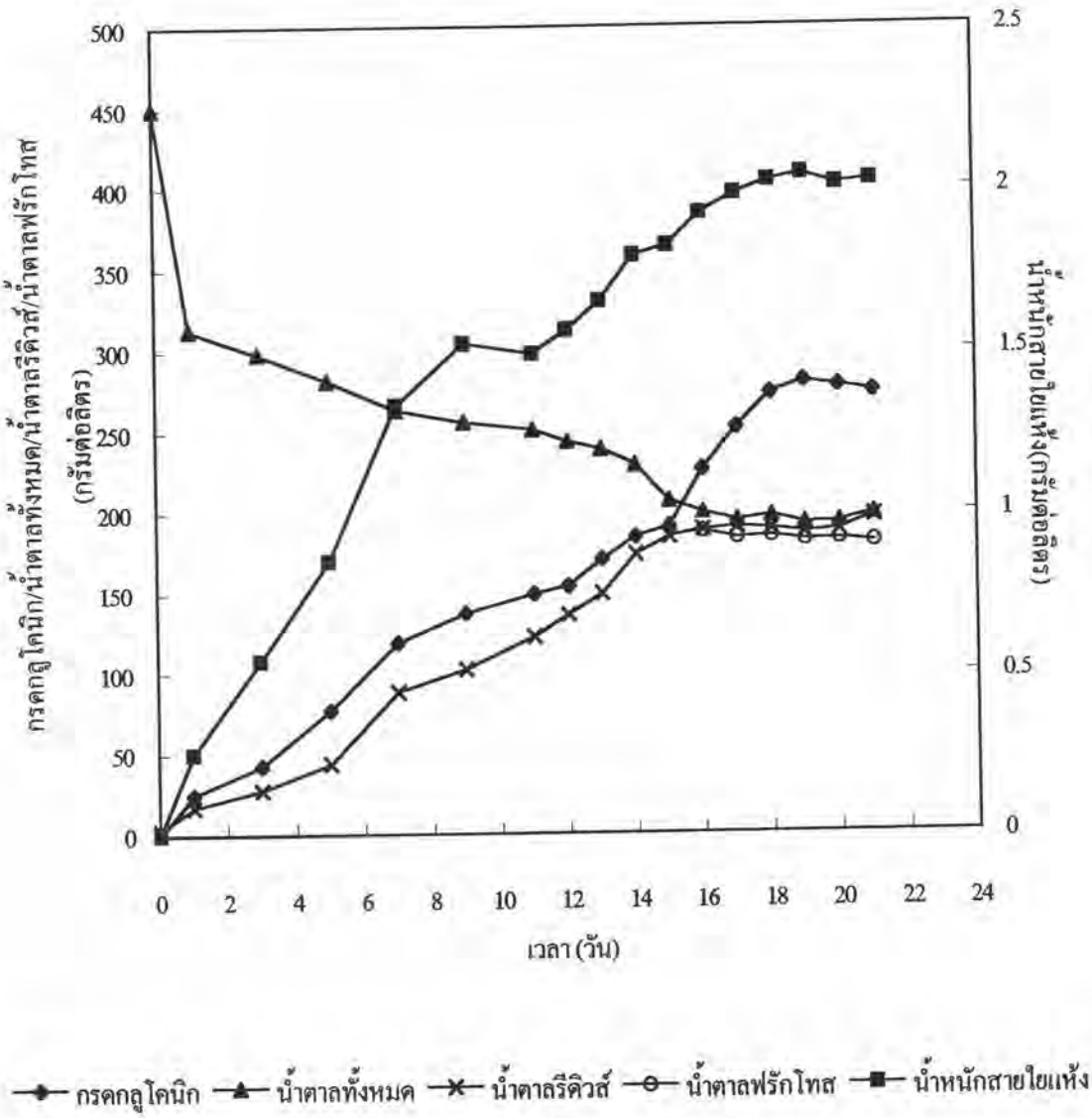
ในด้านการเติบโตพบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกับการผลิตกรดและฟรักโทส คือเมื่อการเติบโตเพิ่มขึ้น ปริมาณกรดและฟรักโทสที่ได้ก็เพิ่มขึ้นด้วย โดยในช่วงท้ายการทดลองยังคงพบน้ำตาลฟรักโทสในปริมาณสูงแสดงว่าน้ำตาลฟรักโทสส่วนใหญ่ไม่ได้ถูกใช้ไปในการเติบโต เมื่อพิจารณาการเจริญของสายใยโดยวัดน้ำหนักสายใยแห้งพบว่า ณ วันที่จุลินทรีย์ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด ที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 250:0.25 ได้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 1.68 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มอัตราส่วนเป็น 250:0.5 ได้น้ำหนักสายใยแห้งเพิ่มขึ้นเป็น 1.79 กรัมต่อลิตร และที่อัตราส่วน 250:1.0 ได้น้ำหนักสายใยแห้งเพิ่มขึ้นอีกคือเท่ากับ 2.04 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 250:1.5 น้ำหนักสายใยแห้งที่ได้กลับลดลงโดยให้ค่าต่ำกว่าอัตราส่วนอื่นๆคือให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 1.58 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 12ก) จาก ผลการทดลองจะได้ว่าที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 250:1.0 มีการเจริญของจุลินทรีย์สูงสุด รองลงมาคืออัตราส่วน 250:0.5 250:0.25 และ 250:1.5 ตามลำดับ และพบว่าอัตราส่วนที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงขึ้น



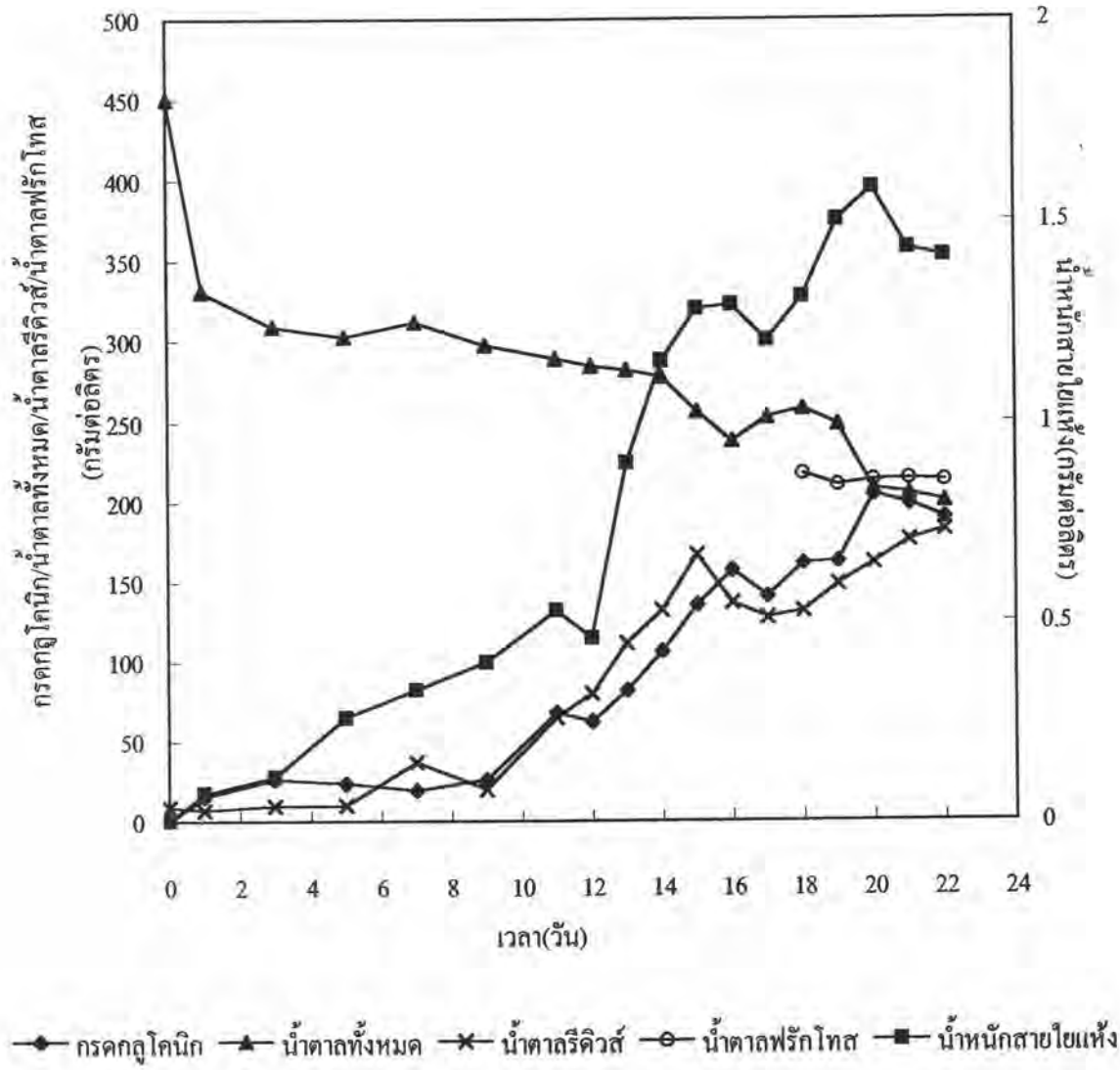
รูปที่ 15 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทสและน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 250:0.25 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 16 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทสและน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 250:0.5 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 17 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทสและน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 250:1.0 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 18 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทสและน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 250:1.5 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 12ก อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก ประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก เมื่อแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆกัน

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุด (ก/ล)	วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก (ก/ล/ว) *	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก*	น้ำหนักสายใยแห้ง (ก/ล)*	$Y_{P/X}$
250:0.25	268.71	20	13.44	54.84	1.68	159.95
250:0.5	288.56	19	15.18	58.89	1.79	161.21
250:1.0	280.08	19	14.74	57.16	2.04	130.87
250:1.5	204.31	20	10.22	41.70	1.58	129.31

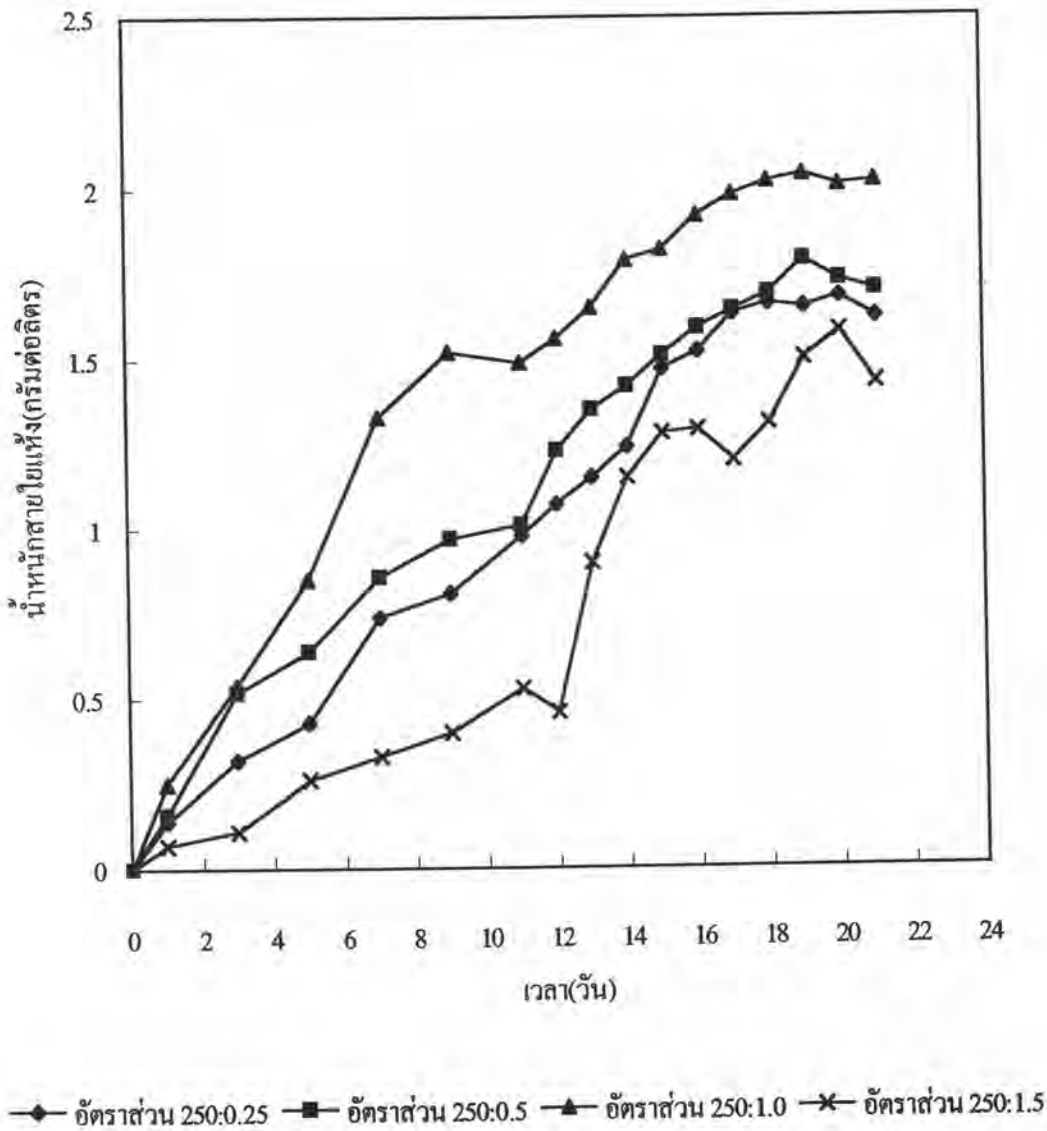
ตารางที่ 12ข ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทส ประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตน้ำตาลฟรักโทส เมื่อแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆกัน

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	ปริมาณฟรักโทส (ก/ล)*	วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทส*	$Y_{P/X}$
250:0.25	198.88	20	44.20	117.19
250:0.5	179.39	19	39.86	100.22
250:1.0	181.85	19	40.41	89.14
250:1.5	213.45	20	47.43	135.09

หมายเหตุ * = คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด

การเติบโตก็จะเพิ่มสูงด้วย ยกเว้นที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 250:1.5 แม้จะมีปริมาณไนโตรเจนสูงสุด แต่กลับมีการเติบโตต่ำสุด (ตารางที่12 และรูปที่ 19) นอกจากนี้อัตราส่วน 250:1.0 ซึ่งมีการเติบโตดีที่สุด พบว่ามีการผลิตกรดในช่วงแรกได้เร็วที่สุดรองลงมาคืออัตราส่วน 250:0.5 250:0.25 และ 250:1.5 ตามลำดับ นั่นคือถ้าการเติบโตของสายใยดี การผลิตกรดก็จะเร็วขึ้น แต่ในช่วงท้ายการทดลองพบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดต่างกันเพียง 1-2 วัน แสดงให้เห็นว่าเมื่อสายใยมีปริมาณมากถึงระดับหนึ่งก็จะให้ปริมาณเอนไซม์อินเวอร์เทสและกลูโคสออกซิเดสที่เพียงพอต่อความต้องการในการย่อยซูโครสและผลิตกรดกลูโคนิกของจุลินทรีย์ ขณะที่การที่มีสายใยมากเกินไปอาจเกิดการแย่งอาหาร ทำให้จุลินทรีย์ต้องใช้พลังงานเพื่อการดำรงชีพสูงขึ้น ทำให้ปริมาณเอนไซม์ทั้งสองในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปริมาณสายใยต่างกันมีปริมาณใกล้เคียงกัน เวลาที่ใช้ในการผลิตกรดร่วมกับฟรักโทสจึงใกล้เคียงกัน

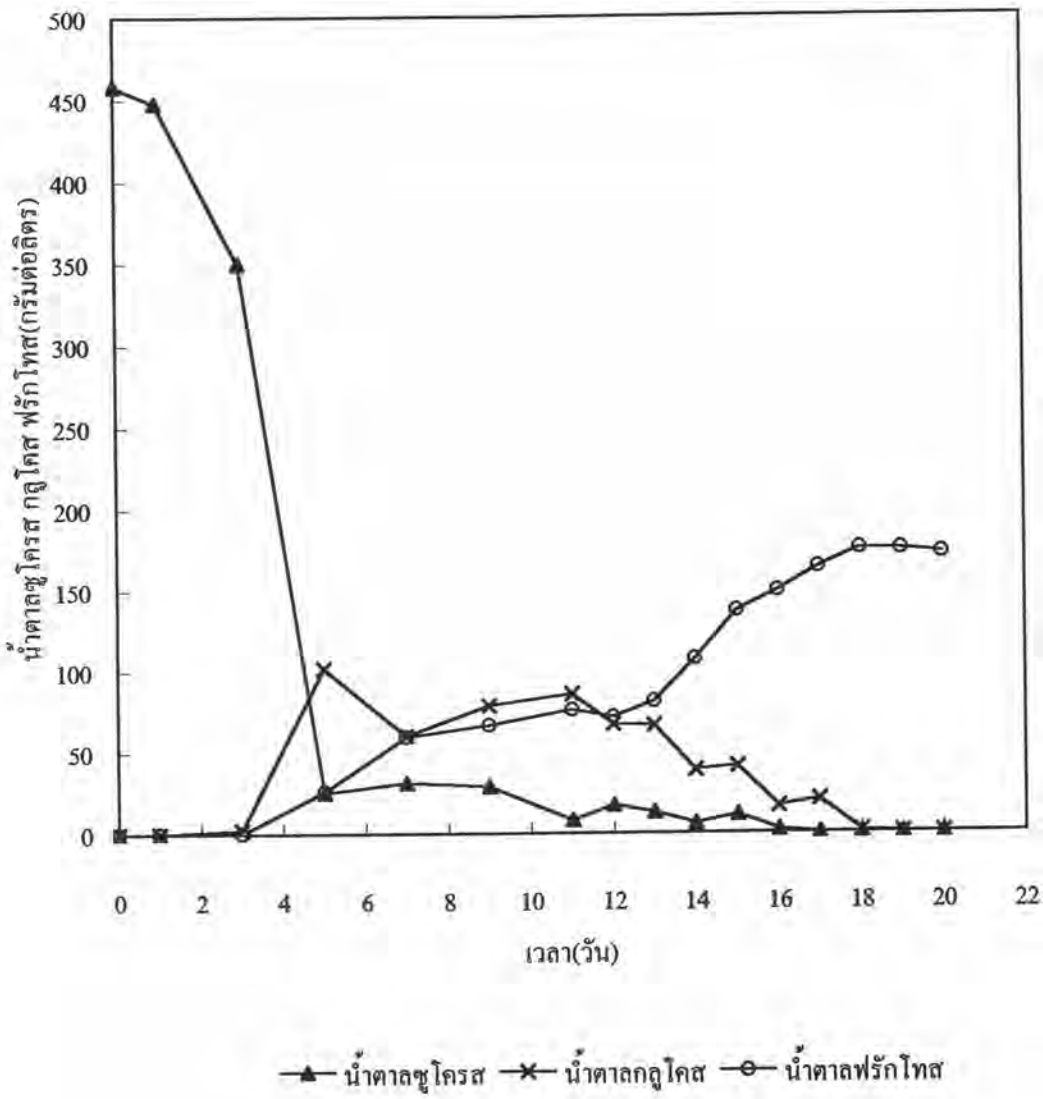
สำหรับการใช้น้ำตาลทรายของ *Aspergillus niger* G153 พบว่าในช่วงแรกปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วและลดลงไปเรื่อยๆ จนกระทั่งช่วงท้ายการทดลองปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วัดได้เริ่มคงที่และใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (รูปที่ 15-18) โดยรูปแบบการลดลงของน้ำตาลทั้งหมดจะเหมือนกันในทุกอัตราส่วน แต่ที่อัตราส่วน 250:1.5 มีอัตราการลดลงของน้ำตาลทั้งหมดช้าที่สุด (รูปที่ 15-18) และเมื่อพิจารณาลักษณะการลดลงของน้ำตาลทั้งหมด พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเติบโตและการผลิตกรดคือเมื่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็ว การเติบโตและการผลิตก็เกิดขึ้นรวดเร็ว จากนั้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงอย่างช้าๆและเริ่มคงที่ในช่วงท้ายการทดลอง จะเห็นว่าการเติบโตและการผลิตกรดก็จะเกิดขึ้นช้าลงและมีแนวโน้มคงที่เช่นกัน ส่วนน้ำตาลรีดิวส์ในช่วงแรกมีปริมาณน้อย และปริมาณจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนเริ่มคงที่ในช่วงท้ายของการทดลอง โดยค่าที่ได้ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (รูปที่ 15-18) ส่วนปริมาณน้ำตาลฟรักโทสซึ่งเริ่มวัดหลังจากค่าน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกับน้ำตาลรีดิวส์คือคาดว่าน้ำตาลซูโครสหมด มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวส์เช่นกัน (รูปที่ 15-18) จะเห็นได้ว่าในการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งสามชนิดพบว่าค่าที่ได้ในช่วง 3-4 วันสุดท้ายของการทดลองใกล้เคียงกัน เช่นที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 250:0.5 ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดมีค่าน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ และน้ำตาลฟรักโทสเท่ากับ 183.75 178.8 และ 179.39 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งจากค่าเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลที่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อน่าจะเป็นน้ำตาลฟรักโทส ส่วนน้ำตาลกลูโคสถูกใช้ไปในการเติบโตและการผลิตกรดจนหมดและเมื่อนำตัวอย่างน้ำหมักไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง



รูปที่ 19 เปรียบเทียบน้ำหนักสายใยแห้งที่ได้ระหว่างการผลิตกรดกลูโคนิก โดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในระดับขวดเขย่า 250 มิลลิลิตร ที่แปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

ตามวิธีการข้อ 10.4 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกมีแหล่งคาร์บอนอยู่ในรูปน้ำตาลซูโครส เมื่อเริ่มผลิตปริมาณน้ำตาลซูโครสจะลดลงขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทสเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณกลูโคสจะเพิ่มขึ้นในช่วงหนึ่งเท่านั้น จากนั้นก็จะถูกนำไปใช้เพื่อการเติบโตและการผลิตกรดจนหมด และในช่วงท้ายการผลิตไม่พบน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ยกเว้นอัตราส่วน 250:1.5 พบน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ) คงมีเพียงน้ำตาลฟรักโทสซึ่งเป็นผลผลิตร่วม ดังตัวอย่างรูปที่ 20 แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรักโทสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 250:0.5 พบว่าในช่วงแรกน้ำตาลซูโครสจะลดลงอย่างรวดเร็วและถูกใช้จนหมดในวันที่ 16 ส่วนน้ำตาลกลูโคสนั้นในช่วงแรกตรวจไม่พบอาจเนื่องมาจากถูกนำไปใช้อย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 4 จึงเริ่มพบน้ำตาลกลูโคสในน้ำหมัก และจะถูกใช้หมดในวันที่ 18 ขณะที่น้ำตาลฟรักโทสในช่วงแรกมีปริมาณน้อยมาก และจะเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลองยังคงมีน้ำตาลฟรักโทสในน้ำหมัก จะเห็นว่า ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดเป็นต้นไปพบเพียงแต่น้ำตาลฟรักโทสในน้ำหมักเท่านั้น แสดงว่าในการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลทรายได้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองในปริมาณมาก ซึ่งเมื่อคิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสที่อัตราส่วนต่างๆ ได้ว่าที่อัตราส่วน 250:0.25 มีค่าเท่ากับร้อยละ 54.84 และ 44.20 ตามลำดับ และอัตราส่วน 250:0.5 มีค่าเท่ากับร้อยละ 58.89 และ 39.86 ตามลำดับ ที่อัตราส่วน 250:1 มีค่าเท่ากับร้อยละ 57.16 และ 40.41 ตามลำดับ และที่อัตราส่วน 250:1.5 มีค่าเท่ากับร้อยละ 41.70 และ 47.43 ตามลำดับ จะเห็นว่าได้ผลผลิตสองชนิดในปริมาณสูง คือกรดกลูโคนิกที่เกิดจากน้ำตาลกลูโคสโดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและน้ำตาลฟรักโทสที่เกิดจากการย่อยซูโครสออกเป็นกลูโคสและฟรักโทสด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส แต่จะเห็นว่าอัตราส่วน 250:0.25 250:0.5 และ 250:1.0 มีค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกสูงกว่าร้อยละ 50 ขณะที่ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสต่ำกว่าร้อยละ 50 นั่นคือมีการนำฟรักโทสจำนวนเล็กน้อยบางส่วนมาใช้ผลิตกรดกลูโคนิก

ส่วนการใช้ไนโตรเจนพบว่า *A. niger* G153 มีแบบแผนการใช้ไนโตรเจนที่เหมือนกันในทุกอัตราส่วน โดยปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกนำไปใช้เรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง พบว่ามีไนโตรเจนเหลืออยู่ในทุกอัตราส่วนที่ทำการทดลอง โดยที่อัตราส่วน 250:0.25 250:0.5 250:1.0 และ 250:1.5 มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.893 1.786 3.573 5.360 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และในวันสุดท้ายของการทดลองพบว่าที่อัตราส่วน 250:0.25 250:0.5 250:1.0



รูปที่ 20 ปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรักโทสในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดกลูโคนิก โดย *Aspergillus niger G153* ในระดับขวดเขย่า 250 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 450 กรัมต่อลิตรและมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 250:0.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส วิเคราะห์โดยวิธี HPLC

และ 250:1.5 จะเหลือแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 0.50 1.36 และ3.19 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยที่อัตราส่วน 250:0.25 มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเหลือน้อยที่สุดและค่อยๆเพิ่มมากขึ้นตามลำดับโดยที่อัตราส่วน 250:1.5 พบปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารจำนวนมากที่สุด จะเห็นว่ายังคงมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเหลืออยู่ในทุกอัตราส่วน แต่การเติบโตกลับมีแนวโน้มคงที่หรือลดลง อาจเป็นเพราะกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด จึงต้องนำเอาฟรักโทสและแคลเซียมกลูโคเนตมาเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลผลิตทั้งสองมีปริมาณลดลงในช่วงท้ายการทดลอง แต่การนำเอาฟรักโทสและแคลเซียมกลูโคเนตอาจยุ่งยากกว่าการใช้กลูโคส และสายใยส่วนใหญ่เริ่มเข้าสู่ช่วงท้ายของวงจรชีวิต (stationary phase และ death phase) ทำให้การเติบโตต่ำลงและมีแอมโมเนียมซัลเฟตเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองได้ว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 250:0.5 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมโดยให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดเท่ากับ 288.56 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 คิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 58.89 (รูปที่ 16 และตารางที่ 12ก) ซึ่งเป็นค่าที่สูงสุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ และ ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดนี้ได้น้ำตาลฟรักโทส 179.39 กรัมต่อลิตรเป็นผลิตภัณฑ์ที่สอง คิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสเท่ากับ 39.86

ดังนั้นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกระดับขวดเขย่า มีส่วนประกอบดังนี้ ซูโครส 450 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.782 กรัมต่อลิตรและแคลเซียมคาร์บอเนต 60 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก.4) โดยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้นี้จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

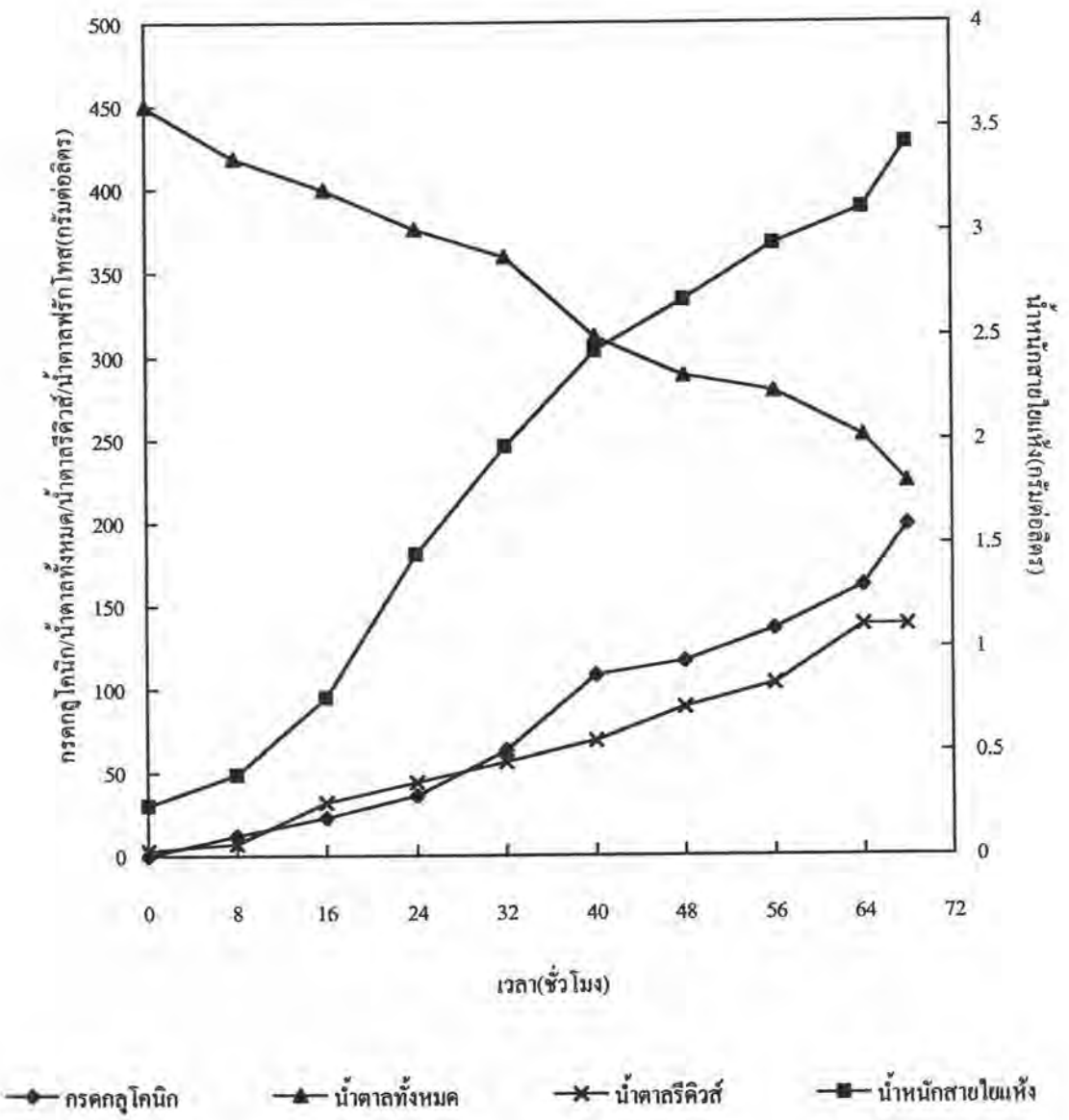
2. การหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิกโดยมีน้ำตาลฟรักโตสเป็นผลผลิตร่วมจากน้ำตาลทรายในระดับถังหมัก

2.1 การหาความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสม

2.1.1 ผลการผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมักเมื่อใช้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลทรายในการผลิตระดับขวดเขย่า

จากการทดลองในระดับขวดเขย่า ทำให้ทราบถึงความเข้มข้นของน้ำตาลทรายและอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ 450 กรัมต่อลิตรและอัตราส่วน 250:0.5 จึงนำค่าดังกล่าวมาทดลองผลิตในระดับถังหมัก โดยภาวะต่างๆที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิกในการทดลองนี้อ้างอิง มาจากบาจรีย์ จันทราภานุกร (2536) ซึ่งได้ทำการทดลองแล้วว่าเหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกจากแป้งไฮโดรไลเสสในระดับถังหมักได้แก่ ขนาดหัวเชื้อ 7% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

เมื่อถ่ายหัวเชื้อขนาด 7% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่า (ภาคผนวก ก 4) ปริมาตร 2.5 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพาะเลี้ยงตามภาวะที่ได้กล่าวข้างต้น ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0-6.5 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตตลอดการทดลอง พบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดในถังหมักเร็วกว่าระดับขวดเขย่ามากคือในชั่วโมงที่ 8 ของการผลิตวัดปริมาณกรดกลูโคนิกได้ถึง 12.23 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆจนใกล้ชั่วโมงที่ 68 ได้เกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตจำนวนมากในถังหมัก ทำให้การกวนทำได้ลำบากและการให้อากาศไม่ทั่วถึงจนไม่สามารถดำเนินการผลิตต่อไปได้จึงได้ยุติการทดลองนี้ที่ 68 ชั่วโมง ซึ่งขณะนั้นมีปริมาณกรดกลูโคนิก 198.79 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 21) เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาล พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงเรื่อยๆ โดยในชั่วโมงที่ 68 วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 224.76 กรัมต่อลิตร ขณะที่น้ำตาลรีดิวส์ก็มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยในชั่วโมงที่ 68 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เท่ากับ 138.72 กรัมต่อลิตรซึ่งแสดงว่าปริมาณน้ำตาลตั้งต้นที่ใช้สูงเกินไป (รูปที่ 21) นอกจากนี้จะเห็นว่าในช่วงท้ายการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าสูงกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์มากแสดงว่านอกจากน้ำตาลฟรักโทสแล้วยังคงมีน้ำตาลกลูโคสและ/หรือน้ำตาลซูโครสหลงเหลืออยู่ ทำให้ไม่สามารถวัดปริมาณน้ำตาลฟรักโทสด้วยวิธี Marshall และ Kooi (1957)ได้ เนื่องจากกรดซัลฟูริกที่เติมลงใน

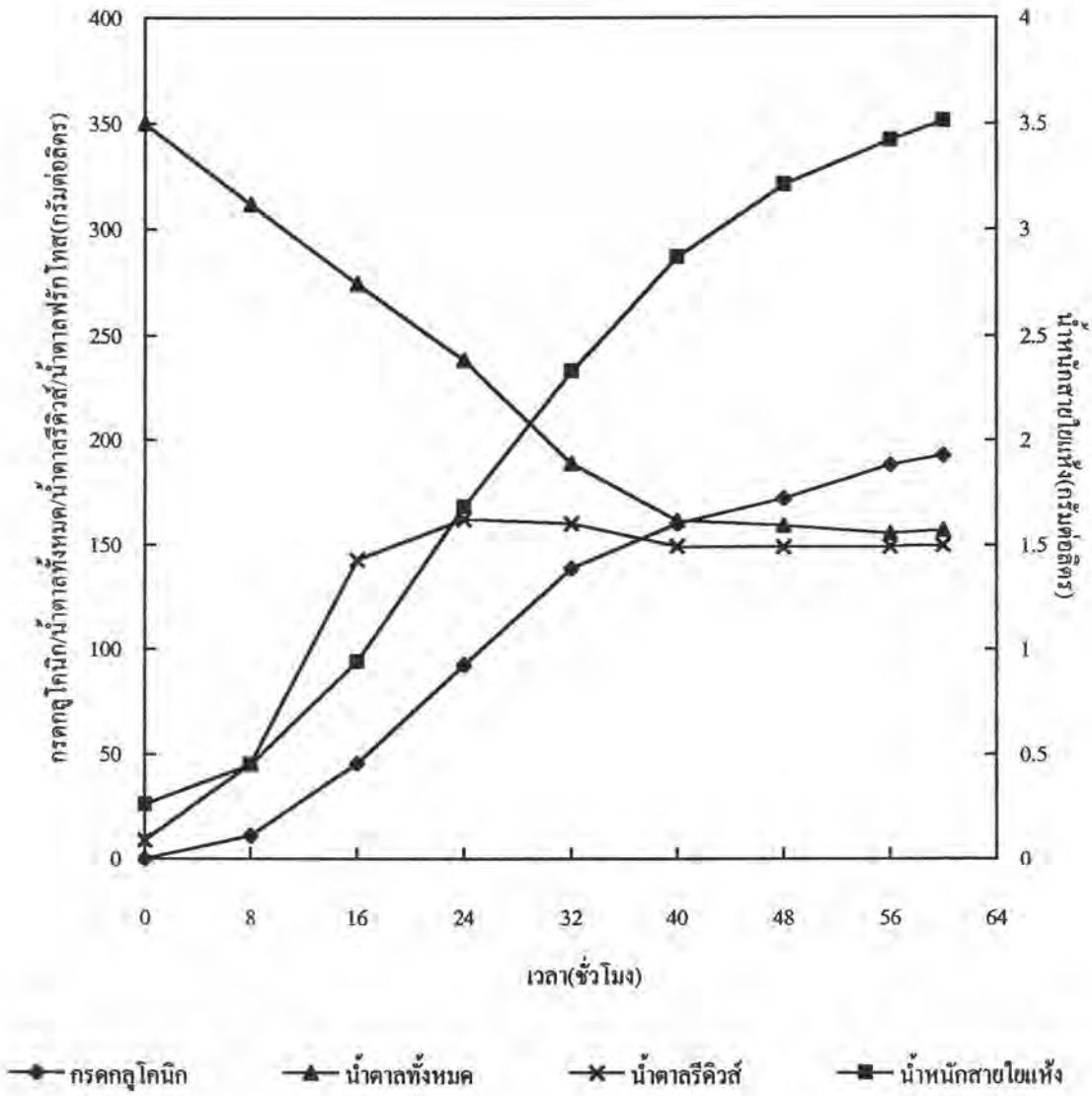


รูปที่ 21 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ และน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 450 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ขนาดหัวเชื้อ 7% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที

ระหว่างการวิเคราะห์จะไปสลายน้ำตาลซูโครสเป็นกลูโคสและฟรักโทสได้ทำให้ปริมาณน้ำตาลฟรักโทสอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไป สำหรับการเติบโตของ *A. niger* G153 พบว่าสามารถเติบโตได้ดีและเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยโดยในชั่วโมงที่ 68 ได้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 3.42 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 21) แสดงว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตรไม่ได้ส่งผลร้ายต่อการเติบโตของ *A. niger* G153 หากแต่เกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตจำนวนมาก รบกวนการกวนและการให้อากาศซึ่งไม่เหมาะสมในการผลิตระดับถังหมัก ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลทรายตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 450 กรัมต่อลิตร จึงไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตในถังหมัก ต้องหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสมในการผลิตระดับถังหมักต่อไป

2.1.2 ผลการหาความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสมในการผลิตระดับถังหมัก

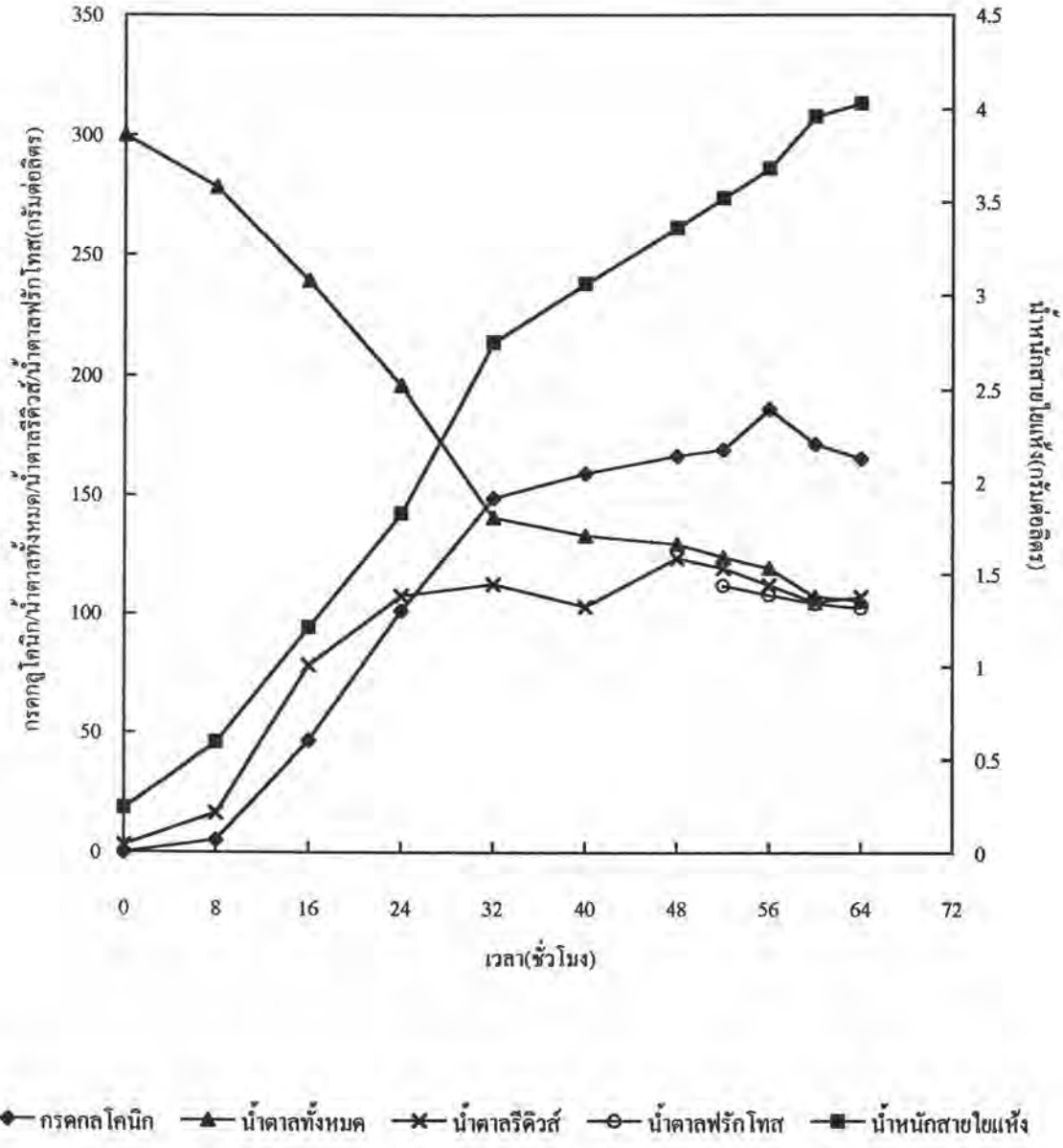
จากการทดลองที่ 2.1.1 พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลทราย 450 กรัมต่อลิตรไม่เหมาะสมในการผลิตระดับถังหมัก จึงทำการทดลองหาความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสมในการผลิตระดับถังหมักโดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 แต่แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทรายต่างๆ กันคือ 350 300 และ 250 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 350 กรัมต่อลิตรพบปัญหาเช่นเดียวกับที่ความเข้มข้น 450 กรัมต่อลิตรคือเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตจำนวนมาก ซึ่งส่งผลขัดขวางการกวนและการให้อากาศไม่สามารถดำเนินการทดลองต่อไปได้จึงยุติการทดลอง โดยพบว่าชั่วโมงที่ 60 ได้ผลผลิตกรดกลูโคนิก 192.8 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 22) สำหรับการใช้น้ำตาลของ *A. niger* G153 พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงไปเรื่อยๆจนเริ่มคงที่ในช่วงท้ายของการทดลองโดยในชั่วโมงที่ 60 วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้เท่ากับ 156.82 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะค่อยๆเพิ่มขึ้นและมีค่าคงที่ในชั่วโมงท้ายๆของการทดลอง โดยในชั่วโมงที่ 60 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เท่ากับ 149.92 กรัมต่อลิตร จะเห็นว่าปริมาณน้ำตาลทั้งสองวิธีที่วัดได้มีค่าแตกต่างกันเพียง 6.9 กรัมต่อลิตร จึงคาดได้ว่าเหลือน้ำตาลซูโครสและกลูโคสน้อยมากไม่น่าจะเป็นอุปสรรคสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลฟรักโทสด้วยวิธี Marshall และ Kooi (1957) จึงได้วิเคราะห์น้ำตาลฟรักโทสด้วยวิธี Marshall และ Kooi (1957) พบว่าในชั่วโมงที่ 60 วัดปริมาณน้ำตาลฟรักโทสเท่ากับ 132.91 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 17.01 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 22) เมื่อนำตัวอย่างเดียวกันนี้ไปวิเคราะห์น้ำตาลโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงตามวิธีการทดลองข้อ 10.4 พบว่าในชั่วโมงที่



รูปที่ 22 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ และน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 350 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ขนาดหัวเชื้อ 7% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที

60 ยังคงมีน้ำตาลซูโครสเหลืออยู่เล็กน้อยคือเท่ากับ 2.36 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลกลูโคสเหลือเท่ากับ 15.80 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำตาลฟรักโทสเหลืออยู่เท่ากับ 147.53 กรัมต่อลิตร สำหรับการเติบโตพบว่า *A. niger* G153 สามารถเติบโตได้ดีโดยชั่วโมงที่ 60 ได้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 3.51 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 22)

ส่วนที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตรสามารถทำการทดลองจนเสร็จสิ้นการทดลองคือกลูโคสหมดและการทดลองดำเนินไปด้วยดีมีการกวนและการให้อากาศอย่างทั่วถึง ได้กรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 56 ของการทดลองเท่ากับ 186.4 กรัมต่อลิตรและได้น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 107.95 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 23) คิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสเท่ากับ 57.06 และ 35.98 ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 3.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 13กและข) ซึ่งจากค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีการนำฟรักโทสเพียงเล็กน้อยมาใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิก แต่ปริมาณฟรักโทสส่วนใหญ่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สองร่วมกับกรดกลูโคนิก ส่วนการเติบโตของ *A. niger* G153 พบว่าเติบโตได้ดีและเป็นไปในทางเดียวกับการผลิตกรดและฟรักโทสคือเมื่อมีการเติบโตเพิ่มขึ้น ปริมาณกรดกลูโคนิกและฟรักโทสที่ผลิตได้ก็เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน โดยในชั่วโมงที่ 56 ซึ่งให้ปริมาณกรดสูงสุด ได้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 3.68 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 23) สำหรับการใช้น้ำตาลพบว่าในชั่วโมงแรกๆน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งช่วงท้ายของการทดลองปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วัดมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (รูปที่ 23) และมีความสัมพันธ์กับการเติบโตและการผลิตกรด คือในช่วงแรกปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนการเติบโตและการผลิตกรดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างช้าๆและคงที่ในช่วงท้ายการทดลอง การเติบโตและการผลิตกรดก็เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆและมีแนวโน้มคงที่หรือลดลงเช่นกัน ขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและมีค่าใกล้เคียงกับน้ำตาลทั้งหมดในช่วงท้ายของการทดลอง (รูปที่ 23) การที่น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวส์มีค่าใกล้เคียงกันแสดงว่าน้ำตาลซูโครสและกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด จึงวัดปริมาณน้ำตาลฟรักโทสในช่วงท้ายการทดลองได้ โดยชั่วโมงที่ 56 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ และน้ำตาลฟรักโทสเท่ากับ 119.37 112.29 และ 107.95 กรัมต่อลิตรตามลำดับ แสดงว่าน้ำตาลที่เหลืออยู่น่าจะเป็นฟรักโทส เมื่อนำมาวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงตามวิธีการของ 10.4 พบว่าใน



รูปที่ 23 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ขนาดหัวเชื้อ 7% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที

ตารางที่ 13ก อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก และประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย 250 และ 300 กรัมต่อลิตร ในการผลิตระดับถังหมัก

ความเข้มข้นน้ำตาลทราย (ก/ล)	ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุด (ก/ล)	ชม.ที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก (ก/ล/ชม) *	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก*	น้ำหนักสายใยแห้ง (ก/ล)*	$Y_{P/X}$
250	148.92	52	2.86	54.70	3.44	43.29
300	186.40	56	3.33	57.06	3.68	50.65

ตารางที่ 13ข ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทส และประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตฟรักโทส ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย 250 และ 300 กรัมต่อลิตร ในการผลิตระดับถังหมัก

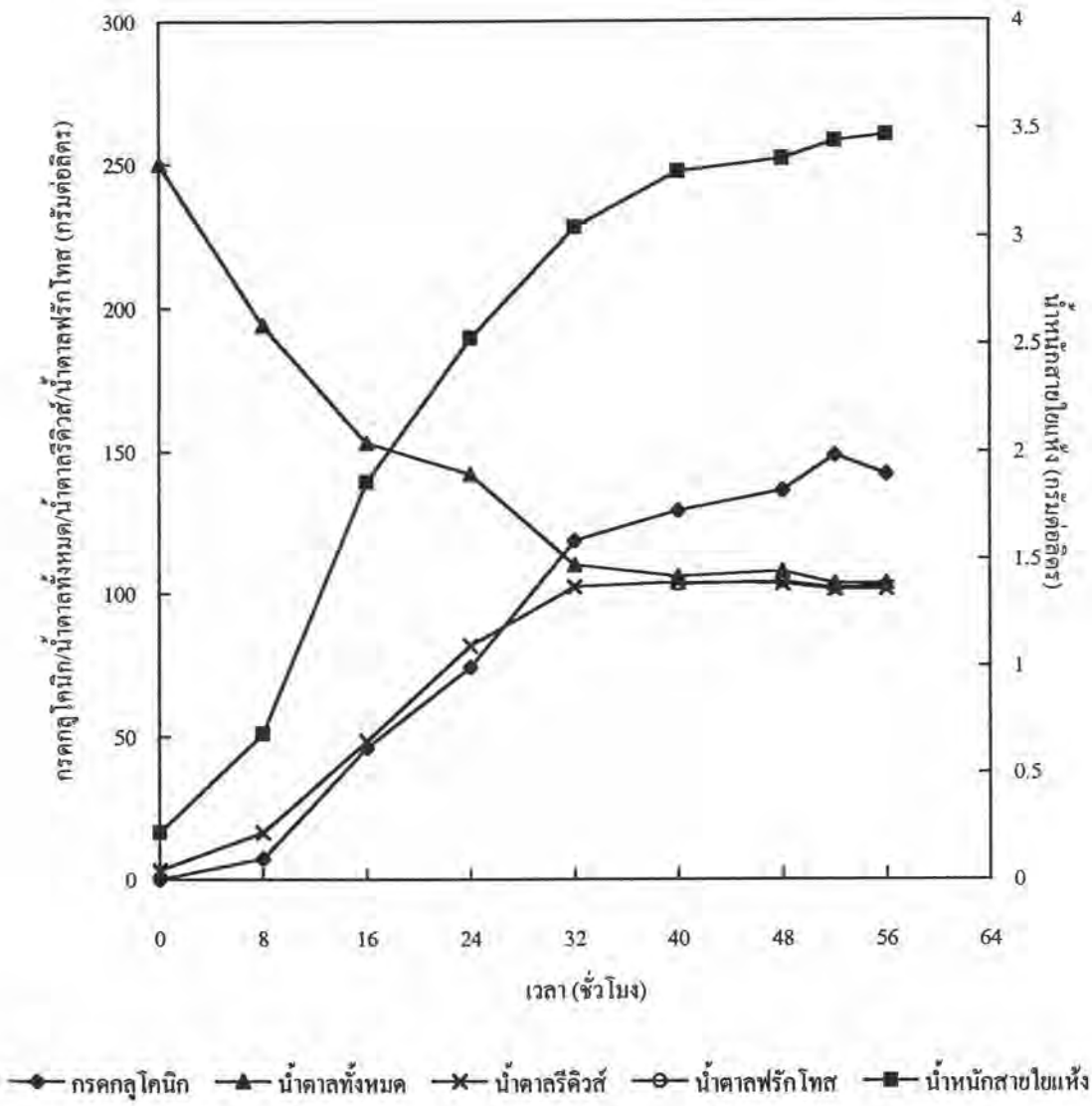
ความเข้มข้นน้ำตาลทราย(ก/ล)	ปริมาณฟรักโทส (ก/ล)*	ชม.ที่ให้กรดสูงสุด	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทส*	$Y_{P/X}$
250	102.09	52	40.84	29.68
300	107.95	56	35.98	39.33

หมายเหตุ * = คิดจากชั่วโมงที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด

ชั่วโมงที่ 56 ไม่พบน้ำตาลซูโครสและกลูโคส มีเพียงน้ำตาลฟรักโทส 105.58 กรัมต่อลิตรเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองร่วมกับกรดกลูโคนิก

สำหรับที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 250 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดกลูโคนิกได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 52 เท่ากับ 148.92 กรัมต่อลิตรและได้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วมเท่ากับ102.09 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 24) คิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสเท่ากับ 54.70 และ 40.84 ตามลำดับ และอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 2.86 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่13กและข) ซึ่งต่ำกว่าการผลิตที่ใช้น้ำตาลทรายตั้งต้น 300 กรัมต่อลิตร และปริมาณฟรักโทสส่วนใหญ่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สองร่วมกับกรดกลูโคนิก ในส่วนการเติบโตพบว่า *A. niger* G153 สามารถเติบโตได้ดีและเป็นไปในทางเดียวกับการผลิตกรดและฟรักโทส โดยชั่วโมงที่ 52 ได้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 3.44 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 24) สำหรับการใช้น้ำตาลพบว่าในชั่วโมงแรกๆน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งช่วงท้ายของการทดลองปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วัดมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (รูปที่ 24) และมีความสัมพันธ์กับการเติบโตและผลิตกรดเช่นเดียวกับที่ความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตรคือเมื่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและคงที่ในช่วงท้ายการทดลอง การเติบโตและการผลิตกรดก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและมีแนวโน้มคงที่หรือลดลงในช่วงท้ายการทดลองเช่นกัน ขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและมีค่าใกล้เคียงกับน้ำตาลทั้งหมดในช่วงท้ายของการทดลอง (รูปที่ 24) ส่วนปริมาณน้ำตาลฟรักโทสซึ่งเริ่มวัดหลังจากค่าน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกับน้ำตาลรีดิวส์คือคาดว่าน้ำตาลซูโครสหมด พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวส์ (รูปที่ 24) โดยชั่วโมงที่ 52 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์และน้ำตาลฟรักโทสเท่ากับ 103.72 101.69 และ 102.09 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จากค่าที่ได้แสดงว่ามีน้ำตาลฟรักโทสเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมากและได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สองคู่กับการผลิตกรด

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 450 และ 350 กรัมต่อลิตรยังคงเกิดปัญหาระหว่างการผลิตคือเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตจำนวนมาก เนื่องจากผลิตกรดกลูโคนิกจำนวนมากนั่นเอง จึงรบกวนการกวนและการให้อากาศจนต้องยุติการทดลอง ซึ่งพบว่ายังคงมีแหล่งคาร์บอนเหลืออยู่ แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นทั้งสองนี้ไม่เหมาะสม แต่ที่ความเข้มข้น 250 และ 300 กรัมต่อลิตรไม่พบน้ำตาลทรายและน้ำตาลกลูโคสหลงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ได้ผลผลิตกรดสูงสุด คงเหลือแต่น้ำตาลฟรักโทสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองอยู่



รูปที่ 24 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ขนาดหัวเชื้อ 7% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที

ในปริมาณมากโดยฟรักโทสเพียงเล็กน้อยบางส่วนจะถูกนำไปใช้เพื่อการเติบโตและผลิตกรด ค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสจึงต่ำกว่าร้อยละ 50 (ตารางที่ 13 ข) และพบว่าที่ความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตรมีค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกต่ำกว่าความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร แต่มีร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสสูงกว่า และเมื่อพิจารณาอัตราการผลิตกรดกลูโคนิก พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตรมีค่าเท่ากับ 3.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าสูงกว่าความเข้มข้นน้ำตาลทราย 250 กรัมต่อลิตรที่มีค่าเท่ากับ 2.86 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 13) แม้ว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร จะใช้เวลาในการผลิตกรดนานกว่าความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตรประมาณ 4 ชั่วโมง แต่มีอัตราการผลิตกรดที่สูงกว่ามาก จึงเลือกความเข้มข้นของน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตรเป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตกรด กลูโคนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในระดับขวดเขย่าและถังหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร พบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตระดับถังหมักสั้นกว่าการผลิตระดับขวดเขย่ามาก โดยในระดับขวดเขย่าใช้เวลาถึง 13 วัน (312 ชั่วโมง) จึงได้ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 176.54 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่การผลิตในถังหมักใช้เวลาเพียง 56 ชั่วโมงก็สามารถผลิตจนได้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 186.40 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 3.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 14 และรูปที่ 25) ซึ่งสูงกว่าอัตราการผลิตระดับขวดเขย่าถึง 2.77 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อคิดเป็นปริมาณกรดกลูโคนิกพบว่าในถังหมักให้ปริมาณกรดสูงกว่าขวดเขย่าเท่ากับ 9.86 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้พบว่าในถังหมักมีการเติบโตที่เร็วกว่าและได้น้ำหนักสายใยแห้งสูงกว่าระดับขวดเขย่า โดยการผลิตในขวดเขย่าได้น้ำหนักสายใยแห้ง ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 2.04 กรัมต่อลิตร ขณะที่การผลิตในถังหมักได้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 3.68 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 14) เมื่อคิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกในขวดเขย่าได้ค่าเท่ากับ 54.04 ขณะที่ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมักได้ค่าเท่ากับ 57.06 (ตารางที่ 14) การใช้น้ำตาลแม้แบบแผนการใช้น้ำตาลของ *A. niger* G 153 ในระดับขวดเขย่าและถังหมักจะเหมือนกันคือปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วและคงที่ในช่วงท้ายการทดลอง แต่ในระดับถังหมักการใช้น้ำตาลของ *A. niger* G 153 เร็วกว่าในระดับขวดเขย่ามาก (รูปที่ 25)

หรือเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดในระดับขวดเขย่าและถังหมัก ภายใต้ความเข้มข้นน้ำตาลทรายที่เหมาะสมของแต่ละระดับ คือความเข้มข้น 450 กรัมต่อลิตรในขวดเขย่ากับความ

เข้มข้น 300 กรัมต่อลิตรในถังหมัก พบว่าการผลิตในขวดเขย่ายังคงใช้เวลานานมากคือ 456 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 0.60 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 14) ขณะที่การผลิตในระดับถังหมักที่ใช้เวลาเพียง 56 ชั่วโมงซึ่งน้อยกว่ามาก แต่ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกของการผลิตในระดับขวดเขย่าและถังหมักมีค่าไล่เลี่ยกันคือเท่ากับ 55.94 และ 57.06 ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก และร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทส ที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 และ 450 กรัมต่อลิตรในระดับขวดเขย่ากับความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตรในระดับถังหมัก

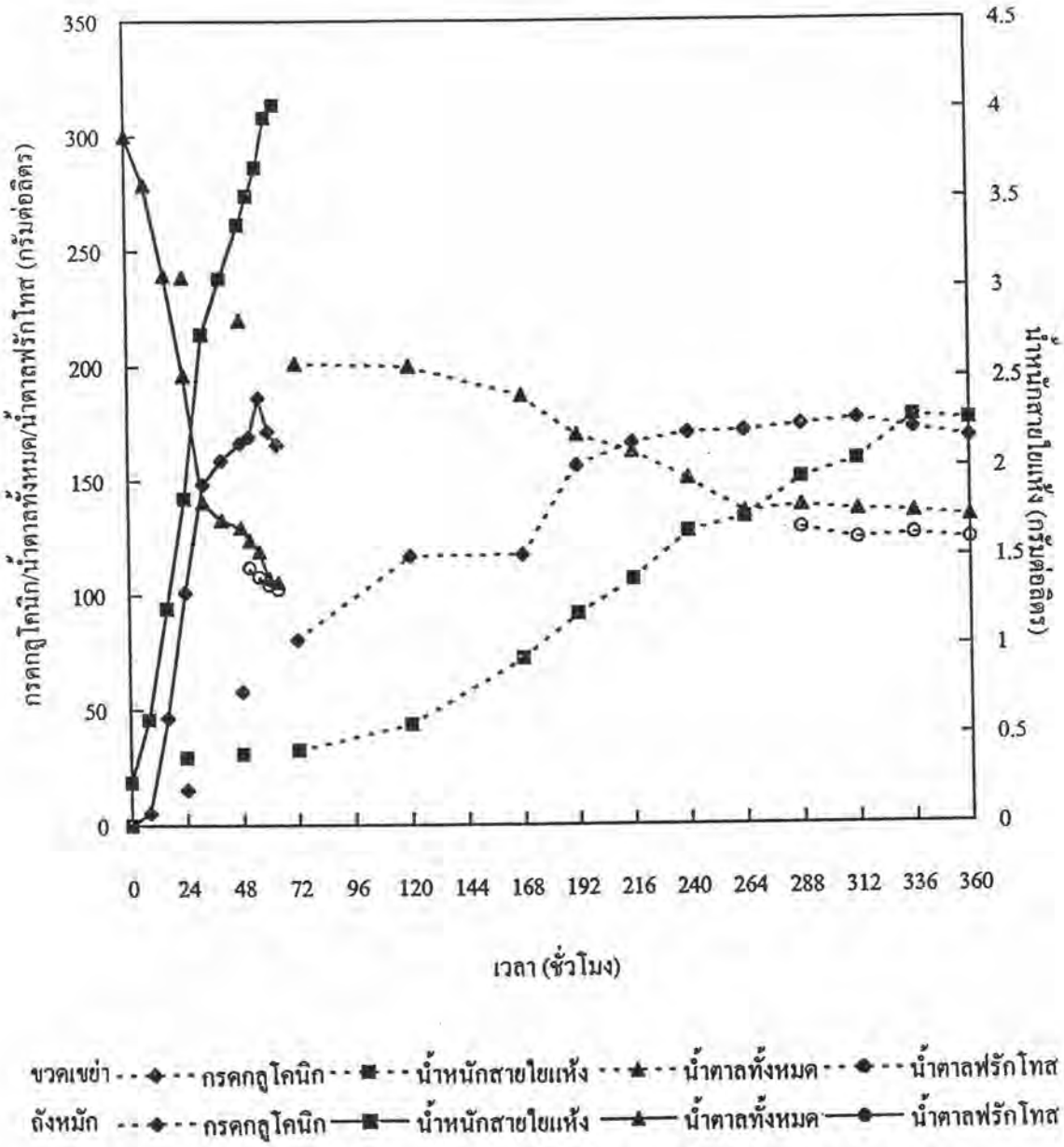
	ความเข้มข้นน้ำตาลทราย	ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุด (ก/ล)	ปริมาณฟรักโทส (ก/ล)*	ชม. ที่ให้กรดสูงสุด	อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก (ก/ล/ชม.)*	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก*	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทส*	น้ำหนักสายใยแห้ง (ก/ล)*
ขวดเขย่า	450	274.08	194.05	456	0.60	55.94	43.12	2.09
ขวดเขย่า	300	176.54	176.54	312	0.56	54.04	41.39	2.04
ถังหมัก	300	186.40	107.95	56	3.33	57.06	35.98	3.68

หมายเหตุ * = คิดจากชั่วโมงที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด

จากผลการทดลองจึงได้สูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกระดับถังหมักจากน้ำตาลทรายดังแสดงในภาคผนวก ก5 ดังนี้

น้ำตาลทราย	300	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.179	กรัม

ละลายน้ำตาลทรายและแอมโมเนียมซัลเฟตปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำประปา ซึ่งจะเห็นได้ว่าเป็นสูตรอาหารที่ง่ายมากและราคาถูก

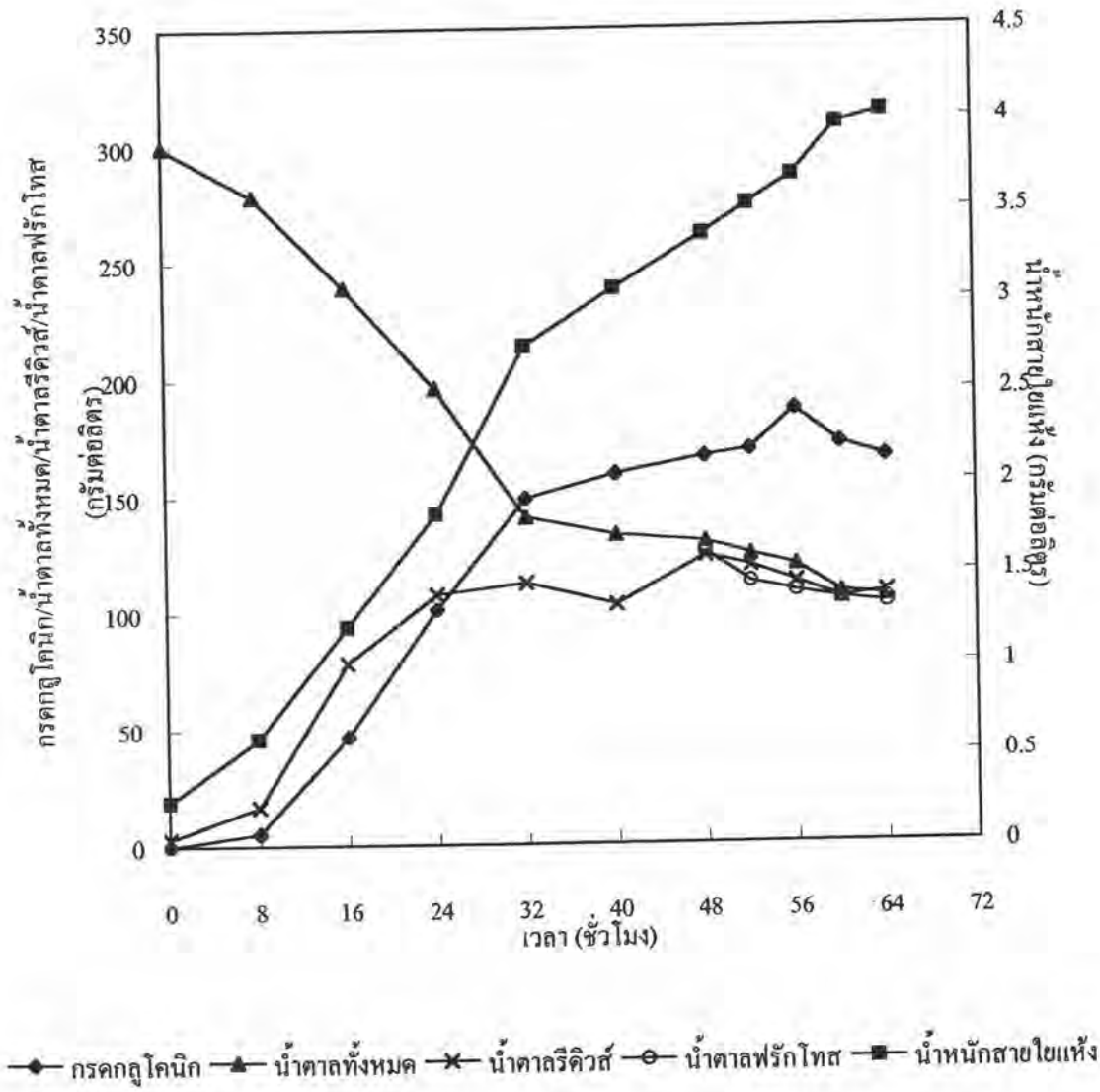


รูปที่ 25 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักสายใยแห้งในระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger G153* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่าและถังหมัก อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

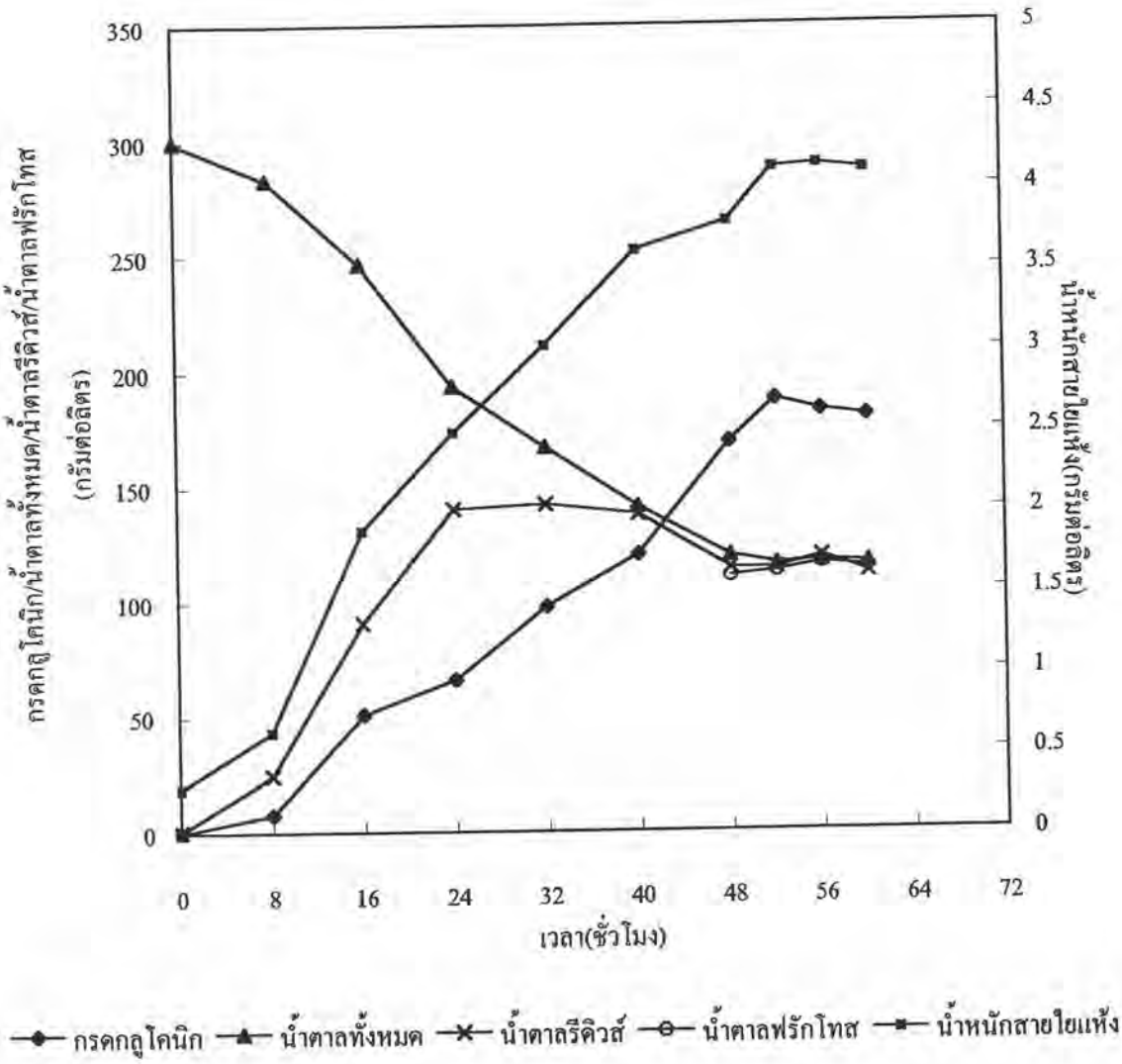
2.2 การหาขนาดหัวเชื้อที่เหมาะสม

จากผลการทดลองของบาจรีย์ จันทราภานุกร (2536) รายงานว่าขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยในระดับถังหมักคือ 7 % (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) แต่ในการทดลองนี้ได้เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทราย ดังนั้นจึงต้องหาขนาดเป็น 7 10 12 และ 15% ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับการผลิตกรด กลูโคนิกในถังหมัก (ภาคผนวก ก5) ปริมาตร 2.5 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0-6.5 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตตลอดการทดลอง อุณหภูมิเท่ากับ 30±2 องศาเซลเซียส พบว่าขนาดหัวเชื้อ 7% ให้กรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 56 เท่ากับ 186.4 กรัมต่อลิตรและฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 107.95 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 26) ที่ขนาดหัวเชื้อ 10% ผลิตกรดกลูโคนิกสูงกว่าขนาดหัวเชื้ออื่นๆคือในชั่วโมงที่ 52 ได้กรดสูงสุดเท่ากับ 187.51 กรัมต่อลิตรและฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วมเท่ากับ 112.54 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 27) ขณะที่ขนาดหัวเชื้อ 12% ได้กรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 52 เท่ากับ 184.15 กรัมต่อลิตรและฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 116.65 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 28) ส่วนขนาดหัวเชื้อ15% จะให้ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 173.73 กรัมต่อลิตร และฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 114.6 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 29) ซึ่งจะเห็นได้ว่าขนาดหัวเชื้อ 7-12% ให้ผลผลิตกรดไล่เลี่ยกัน แต่ที่ขนาดหัวเชื้อ 15% ให้ผลผลิตต่ำกว่าและใช้เวลาในการผลิตสั้นกว่าเล็กน้อย (ตารางที่ 15ก) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกของขนาดหัวเชื้อ 7 10 12 และ 15% เท่ากับ 3.33 3.61 3.54 และ 3.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งไล่เลี่ยกัน แต่ที่ขนาดหัวเชื้อ 7% ต่ำกว่าเล็กน้อย (ตารางที่ 15ก)

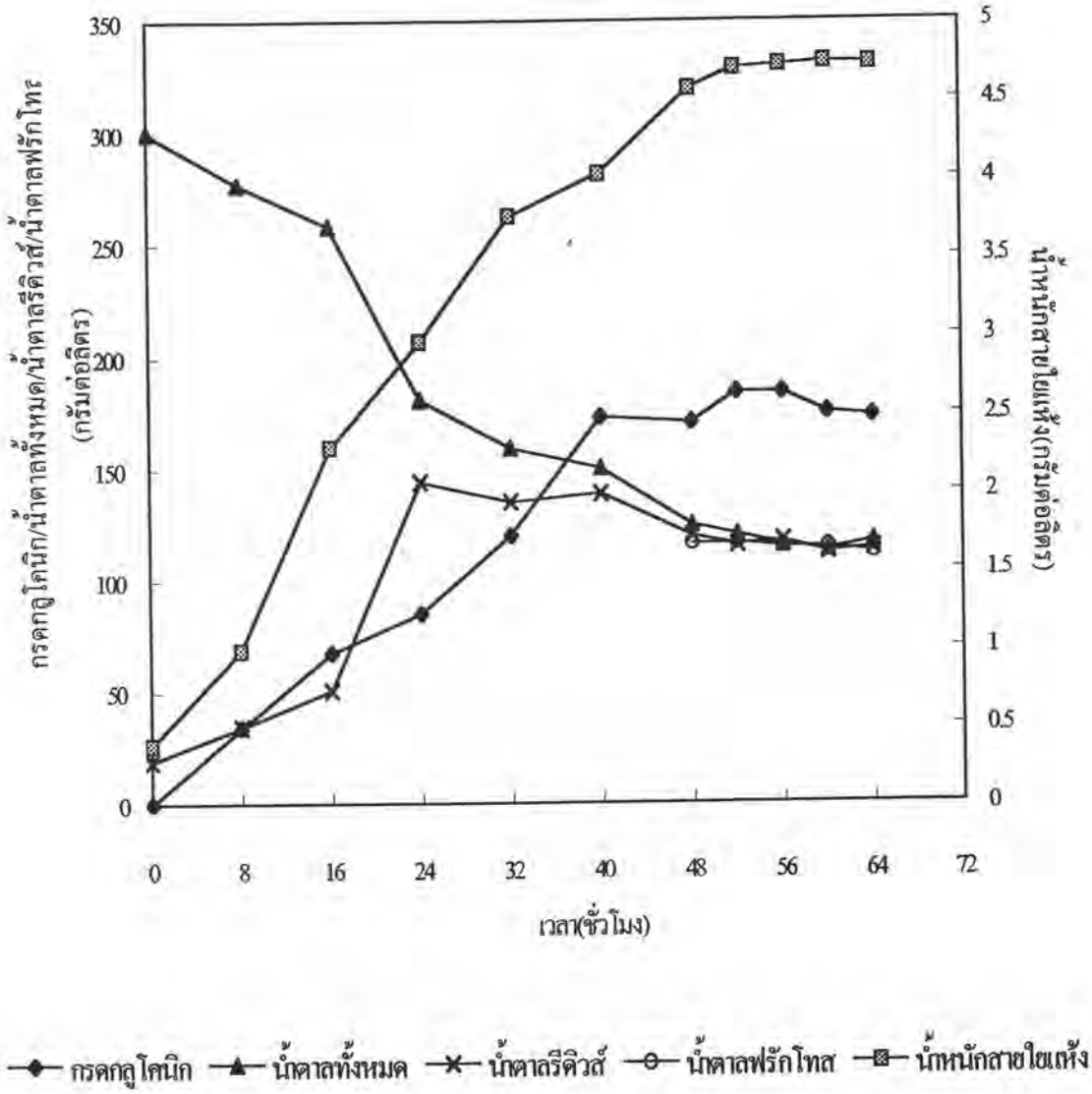
เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตในแต่ละขนาดหัวเชื้อโดยวัดจากน้ำหนักสายใยแห้ง พบว่าถ้าขนาดหัวเชื้อมากจะให้การเติบโตที่เร็วกว่าและมากกว่าขนาดหัวเชื้อน้อย โดยที่ขนาดหัวเชื้อ 15% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) มีการเติบโตเร็วที่สุด รองลงมาคือขนาดหัวเชื้อ 12 10 และ 7% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ตามลำดับ (รูปที่ 30) และ ณ ชั่วโมงที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด ขนาดหัวเชื้อ 7% ได้น้ำหนักสายใยแห้งต่ำสุดคือเท่ากับ 3.68 กรัมต่อลิตร ขณะที่ขนาดหัวเชื้อ 10 12 และ 15% ได้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 4.11 4.69 และ 4.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่15ก) จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มขนาดหัวเชื้อจะทำให้น้ำหนักสายใยแห้งเพิ่มขึ้นและการผลิตกรดเร็วขึ้นอีกด้วยซึ่งจะเห็นได้ชัดในช่วงชั่วโมงแรกๆที่เริ่มผลิต เมื่อคิดปริมาณผลผลิตกรด



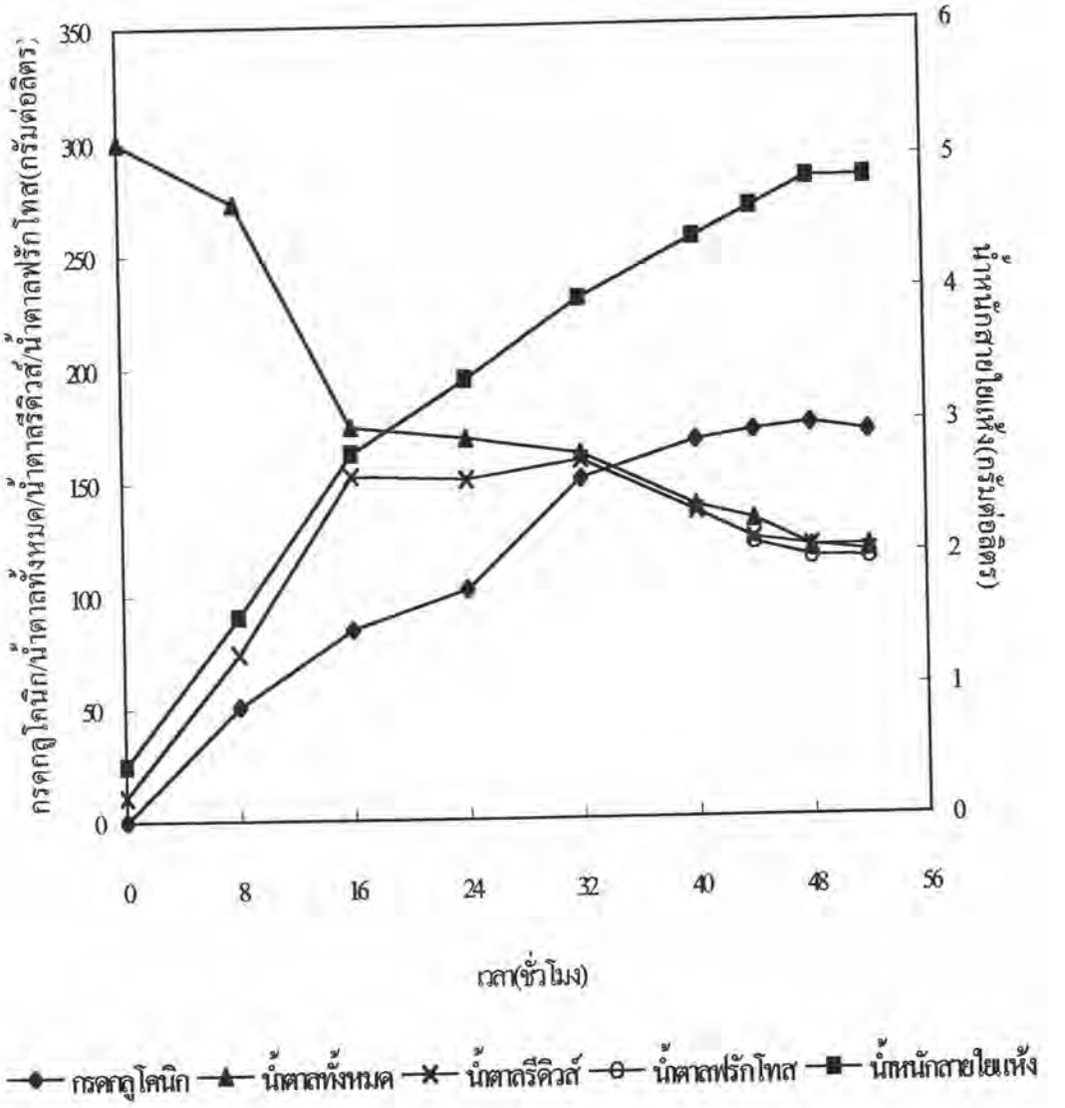
รูปที่ 26 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อ 7% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีอัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที



รูปที่ 27 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย เท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีอัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที



รูปที่ 28 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย เท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อ 12% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีอัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที



รูปที่ 29 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย เท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อ 15% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีอัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที

ตารางที่ 15ก อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก และประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก เมื่อแปรผันขนาดหัวเชื้อ

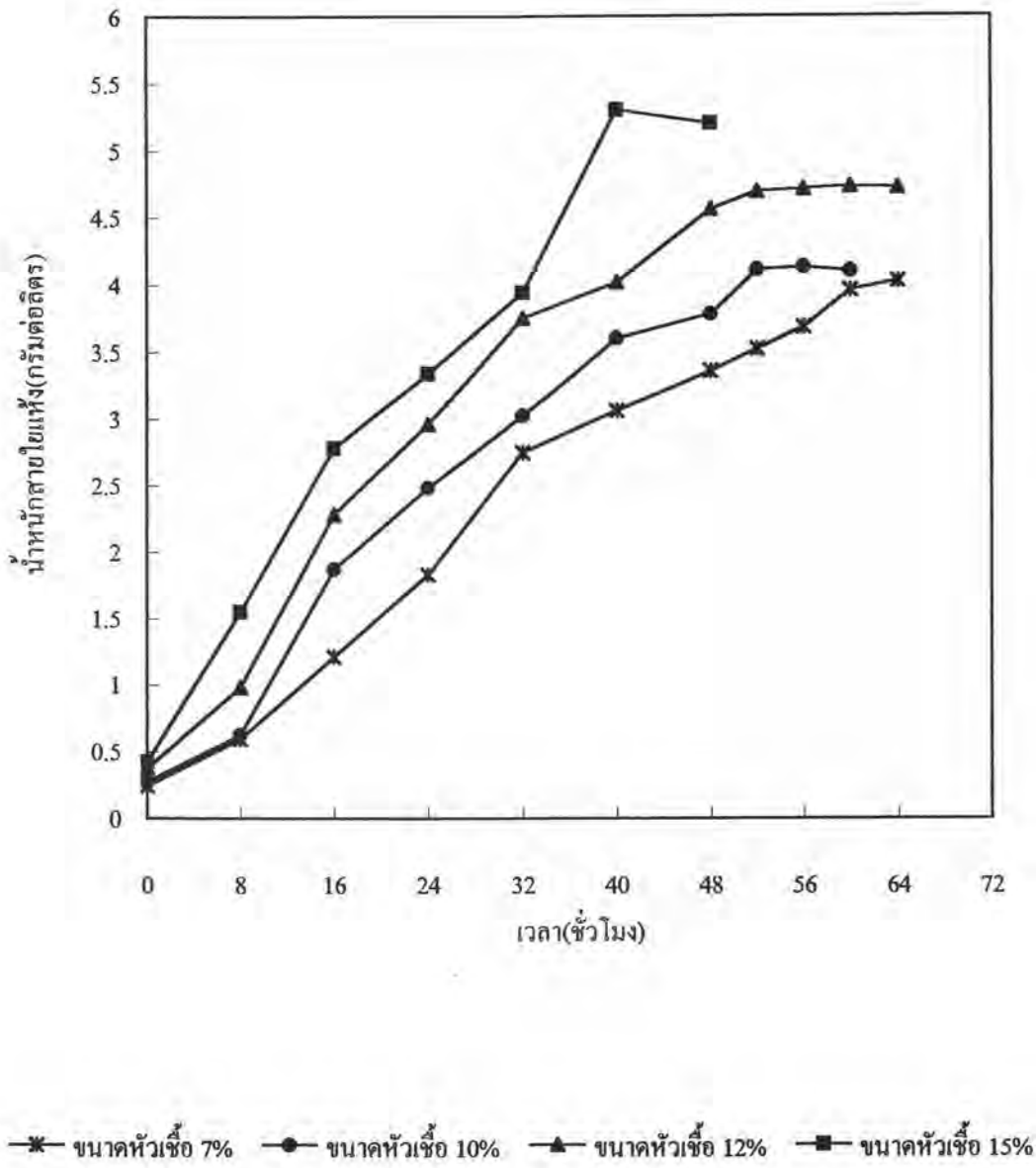
ขนาดหัวเชื้อ **	ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุด (ก/ล)	ชม.ที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	อัตราการผลิตกรดกลูโคนิกต่อวัน(ก/ล/ว)*	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก	น้ำหนักสายใยแห้ง (ก/ล)*	Y_{PX}
7%	186.4	56	3.33	57.06	3.68	50.65
10%	187.51	52	3.61	57.40	4.11	45.62
12%	184.15	52	3.54	56.37	4.69	39.26
15%	173.73	48	3.61	53.18	4.83	35.97

ตารางที่ 15ข ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทส และประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตฟรักโทส เมื่อแปรผันขนาดหัวเชื้อ

ขนาดหัวเชื้อ **	ปริมาณเฟรักโทส (ก/ล)*	ชม.ที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทส	Y_{PX}
7%	107.95	56	35.98	29.33
10%	112.54	52	37.51	27.38
12%	116.65	52	38.88	24.87
15%	114.6	48	38.2	23.73

หมายเหตุ * = คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิก

** = ปริมาตรหัวเชื้อต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 30 เปรียบเทียบน้ำหนักสายใยแห้ง ณ วันที่ให้ผลผลิตสูงสุดจากการผลิตในถังหมัก 5 ลิตร โดยสายพันธ์ *Aspergillus niger* G153 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบ ต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที แปรผันขนาดหัวเชื้อต่างๆ

กลูโคนิกต่อน้ำหนักสายใยแห้งที่สร้างขึ้น ($Y_{P/X}$) ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิกในวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด พบว่าขนาดหัวเชื้อ 7% มีค่าสูงสุดคือ 50.65 ส่วนที่ขนาดหัวเชื้อ 10 12 และ 15% มีค่าลดลงตามลำดับคือมีค่าเท่ากับ 45.62 39.26 และ 35.97 ตามลำดับ (ตารางที่ 15ก) จะเห็นว่าขนาดหัวเชื้อ 7% มีประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด สำหรับการผลิตฟรักโทสพบว่าปริมาณผลผลิตฟรักโทสต่อน้ำหนักสายใยแห้งที่สร้างขึ้น ($Y_{P/X}$) ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตฟรักโทสในวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด มีลักษณะเช่นเดียวกับ $Y_{P/X}$ ของกรดคือที่ขนาดหัวเชื้อ 7% มีค่าสูงสุดและที่ขนาดหัวเชื้อ 10 12 และ 15% มีค่าลดลงตามลำดับ (ตารางที่ 15ข)

สำหรับการใช้น้ำตาลทรายของ *Aspergillus niger* G153 พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วและเริ่มมีค่าคงที่ในช่วงท้ายการทดลอง ซึ่งปริมาณที่เหลืออยู่จะใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (รูปที่ 26-29) และมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับการเติบโตและผลิตกรดกลูโคนิก คือเมื่อน้ำตาลทั้งหมดลดลง การเติบโตและผลิตกรดก็จะเพิ่มขึ้น (รูปที่ 26-29) ขณะที่น้ำตาลรีดิวส์ในช่วงแรกมีปริมาณน้อย และปริมาณจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนเริ่มคงที่ในช่วงท้ายของการทดลอง โดยค่าที่ได้ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (รูปที่ 26-29) ส่วนปริมาณน้ำตาลฟรักโทสซึ่งเริ่มวัดหลังจากค่าน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกับน้ำตาลรีดิวส์คือคาดว่าน้ำตาลซูโครสหมด มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวส์เช่นกัน (รูปที่ 26-29) ซึ่งคาดว่าน้ำตาลที่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อน่าจะเป็นน้ำตาลฟรักโทส โดยที่ขนาดหัวเชื้อ 7-12% เริ่มวัดฟรักโทสได้ในชั่วโมงที่ 48 ส่วนขนาดหัวเชื้อ 15% สามารถวัดฟรักโทสได้ในชั่วโมงที่ 44 แสดงว่าขนาดหัวเชื้อ 15% มีความสามารถในการย่อยและใช้ฟรักโทสได้เร็วกว่าขนาดหัวเชื้ออื่นๆ (รูปที่ 26.-29) นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงที่น้ำตาลทั้งสามชนิดมีค่าใกล้เคียงกันจะเกิดขึ้นก่อนชั่วโมงที่ได้กรดกลูโคนิกสูงสุดประมาณ 4-8 ชั่วโมง แสดงว่าราสามารถใช้กลูโคสได้ดีและใช้ทั้งหมดไปในการเติบโตและผลิตกรดกลูโคนิก คิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกได้ว่าที่ขนาดหัวเชื้อ 10% มีค่าสูงสุดคือเท่ากับ 57.40 รองลงมาคือขนาดหัวเชื้อ 7 และ12% มีค่าเท่ากับ 57.06 และ 56.37 ซึ่งไล่เลี่ยกับขนาด 10% แต่ที่ขนาด 15% มีค่าต่ำที่สุดคือ 53.18 (ตารางที่ 15ก) จะเห็นว่าทุกขนาดหัวเชื้อให้ค่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกสูงกว่า 50 แสดงว่ามีการนำฟรักโทสเล็กน้อยมาใช้ในการผลิตกรดด้วยโดยพบว่าร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสของขนาดหัวเชื้อ 7 10 12 และ 15% เท่ากับ 35.98 37.51 38.88 และ 38.20 ตามลำดับ (ตารางที่ 15ข) แต่จากการที่ขนาดหัวเชื้อ 15% มีการเติบโตสูงสุดแต่ให้กรดกลูโคนิกต่ำสุดและได้

ฟรักโทสไล่เลี่ยกับขนาดหัวเชื้อ 10 และ 12% โดยที่ทุกขนาดหัวเชื้อใช้ซูโครสและกลูโคสหมด และการเติบโตจะสูงขึ้นตามขนาดหัวเชื้อที่มากขึ้นบางส่วน แสดงว่ากลูโคสบางส่วนถูกใช้ไปในการเติบโตจึงทำให้ผลิตกรดกลูโคนิกได้น้อยลงและความสามารถของ *A. niger* G153 ในการใช้ฟรักโทสไปเพื่อการผลิตกรดต่ำ ถึงแม้จะมีเซลล์เพิ่มก็ใช้ฟรักโทสไปผลิตกรดไม่แตกต่างจากขนาดหัวเชื้ออื่นๆจึงเหลือฟรักโทสในทุกขนาดหัวเชื้อไล่เลี่ยกัน ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สองร่วมกับกรดกลูโคนิก

และเนื่องจากขนาดหัวเชื้อ 10 และ 15% มีอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดคือเท่ากับ 3.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเท่ากัน แต่ขนาดหัวเชื้อ 10% ให้ผลผลิตกรดสูงกว่าคือให้ปริมาณกรดสูงกว่าและสูงที่สุดคือเท่ากับ 187.51 กรัมต่อลิตร ขณะที่ฟรักโทสที่ได้มีปริมาณไล่เลี่ยกัน การเลือกใช้ขนาดหัวเชื้อ 10% จะประหยัดขนาดหัวเชื้อที่ใช้มากกว่าขนาดหัวเชื้อ 15% ดังนั้นหัวเชื้อขนาด 10% จึงเป็นขนาดหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดกลูโคนิกร่วมกับน้ำตาลฟรักโทสจากน้ำตาลทรายในระดับถังหมัก 5 ลิตร

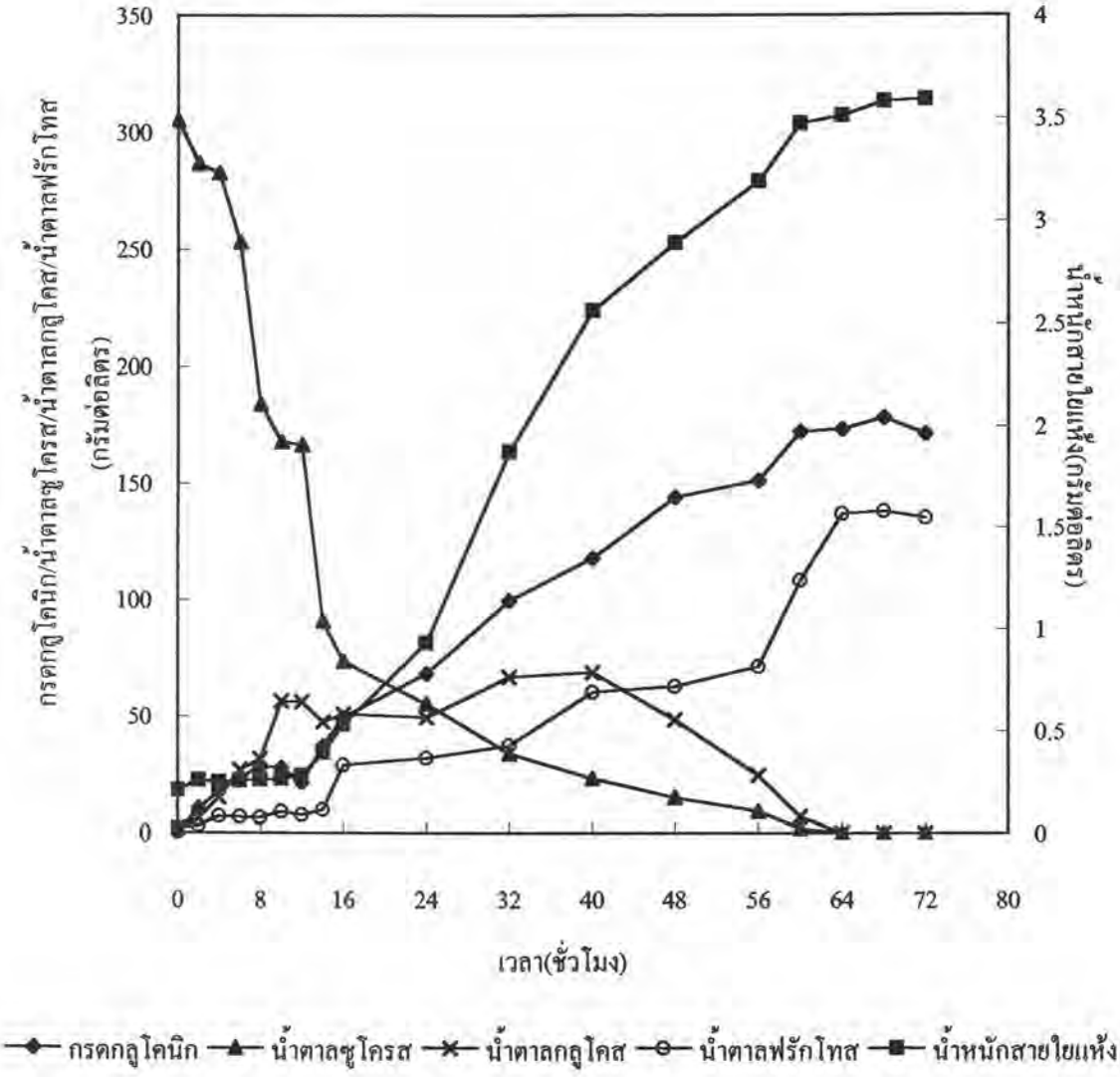
2.3 การหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดกลูโคนิก ซึ่งต้องมีขั้นตอนการแตกโมเลกุลของน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทสก่อนแล้วจึงนำไปใช้เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก อีกทั้งมีรายงานของ Rosenberg และคณะ (1992) พบว่าเอนไซม์อินเวอร์เทสของ *Aspergillus niger* CCM8004 ซึ่งทำหน้าที่แตกโมเลกุลของซูโครสเป็นกลูโคสและฟรักโทส นั่นทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 งานวิจัยนี้จึงทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยนำค่าที่ Rosenberg และคณะ (1992) อ้างอิงมาประกอบคือ แปรค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการผลิตเป็น 4.5 5.5 และ 6.5 เพื่อหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะต่อการย่อยน้ำตาลซูโครสก่อน แล้วจึงปรับช่วงหลังจาก 12 ชั่วโมงไปจนสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 6.0-6.5ซึ่งเหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายพันธุ์นี้ ดังแสดงในผัง

ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5	ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5
ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5	ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5
ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5	ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5
12 ชั่วโมง	60 ชั่วโมง

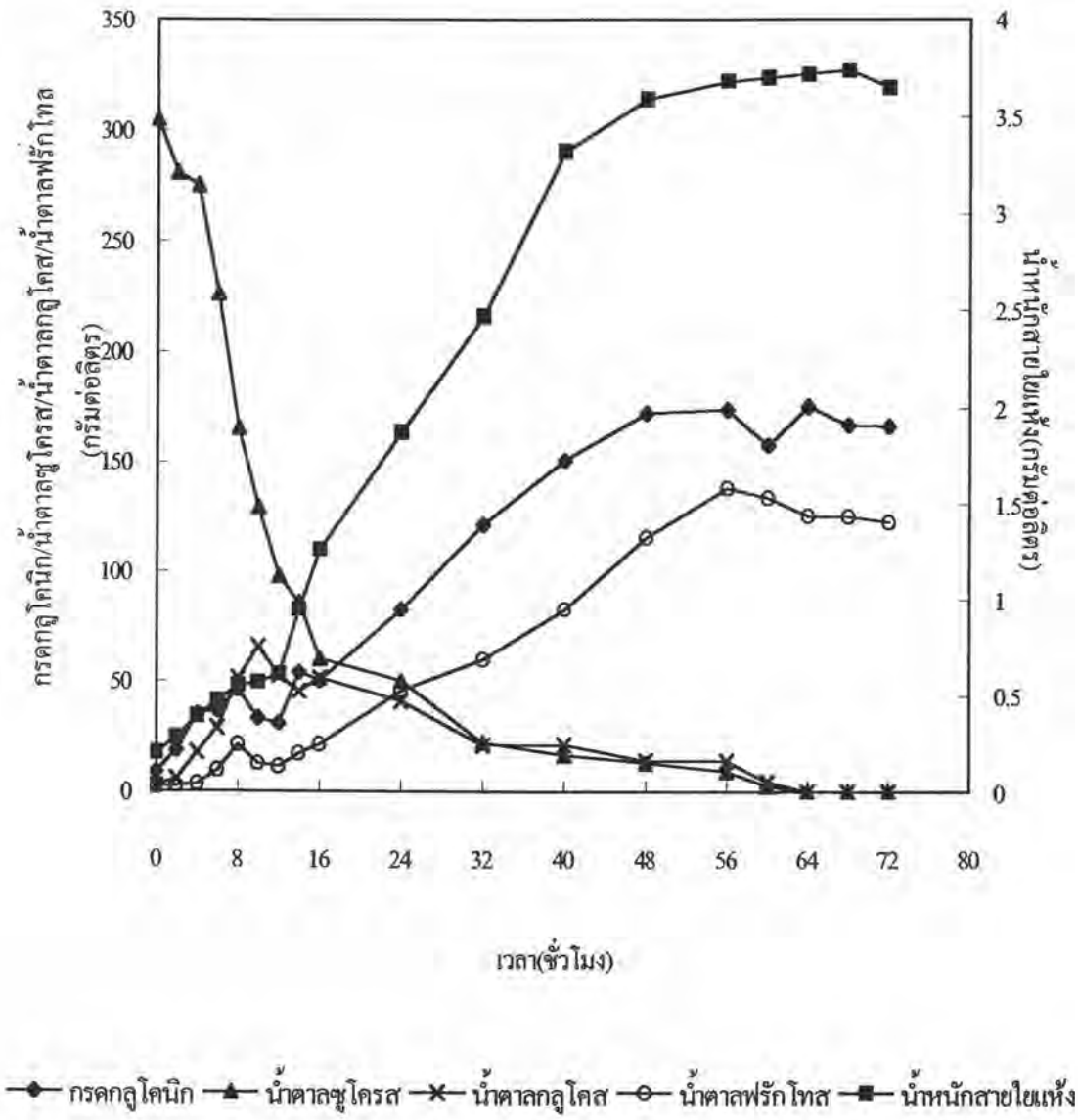
ผลการทดลองพบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างใน 12 ชั่วโมงแรกเป็น 4.5 และปรับเป็น 6.0-6.5 ตลอดช่วงการผลิตที่เหลือได้ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 68 เท่ากับ 178.58 กรัมต่อลิตรและได้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 128.1 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 31) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดกลูโคนิก 2.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 16ก) ส่วนการจัดค่าความเป็นกรดด่างใน 12 ชั่วโมงแรกเป็น 5.5 และปรับเป็น 6.0-6.5 ตลอดช่วงการผลิตที่เหลือได้กรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 เท่ากับ 175.75 และได้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 125.9 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 32) มีอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 2.85 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 16ก) สำหรับการทดลองที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-6.5 ตลอดการทดลอง ได้ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงกว่าค่าความเป็นกรดด่างอื่นๆเล็กน้อยคือผลิตกรดกลูโคนิกได้เท่ากับ 182.42 และได้ฟรักโทสไล่เลี่ยกันแต่น้อยกว่าความเป็นกรดด่างอื่นเล็กน้อยคือ 111.45 กรัมต่อลิตรแต่ใช้เวลาสั้นกว่าคือ 60 ชั่วโมง (รูปที่33) มีอัตราการผลิตกรดกลูโคนิก 3.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่ 16ก) ซึ่งเป็นอัตราการผลิตที่สูงกว่าค่าความเป็นกรดด่างอื่นๆ แสดงว่าค่าความเป็นกรดด่างนี้ดีที่สุด ทำให้การผลิตกรดเร็วขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากเหตุผล 2 ประการ คือทั้งการแตกของซูโครสเร็วขึ้นและการผลิตกรดเร็วขึ้น (ตารางที่ 16ก) อาจเนื่องจากเป็นค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและการผลิตกรดกลูโคนิกโดยราสายพันธุ์นี้ จึงทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-6.5 ตลอดการทดลองให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกและอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด และใช้เวลาสั้นที่สุด

เมื่อพิจารณาการเติบโตโดยวัดน้ำหนักสายใยแห้ง พบว่าการเติบโตมีความสัมพันธ์กับการผลิตกรด เมื่อการเติบโตเพิ่มขึ้นการผลิตกรดก็เพิ่มขึ้นด้วย พบว่าใน 12 ชั่วโมงแรกที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 5.5 และ 6.0-6.5 ได้น้ำหนักสายใยแห้งในชั่วโมงที่ 12 สูงขึ้นตามลำดับคือเท่ากับ 0.28 0.61 และ 0.76 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตกรดกลูโคนิกสูงขึ้นตามลำดับเช่นกันคือเท่ากับ 21.67 30.98 และ 41.56 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 31-33) แสดงว่า *A. niger* G153 สามารถเติบโตและผลิตกรดกลูโคนิกที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 ได้ดีกว่า 4.5 และ 5.5 และพบว่าในช่วงหลัง 12 ชั่วโมงของการผลิต เมื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.0-6.5 พบว่าทุกการทดลองมีการเติบโตสูงขึ้นและผลิตกรดได้เร็ว โดย ณ ชั่วโมงที่จุลินทรีย์ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด ที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.0-6.5 ตลอดการทดลองได้น้ำหนักสายใยแห้งสูงกว่าค่าความเป็นกรดด่างอื่นๆ คือเท่ากับ 4.11 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือค่าความเป็นกรดด่างใน 12 ชั่วโมงแรกเป็น 5.5 และปรับเป็น 6.0-6.5 ตลอดช่วงการผลิตที่เหลือเท่ากับ 3.72 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรดด่างใน 12



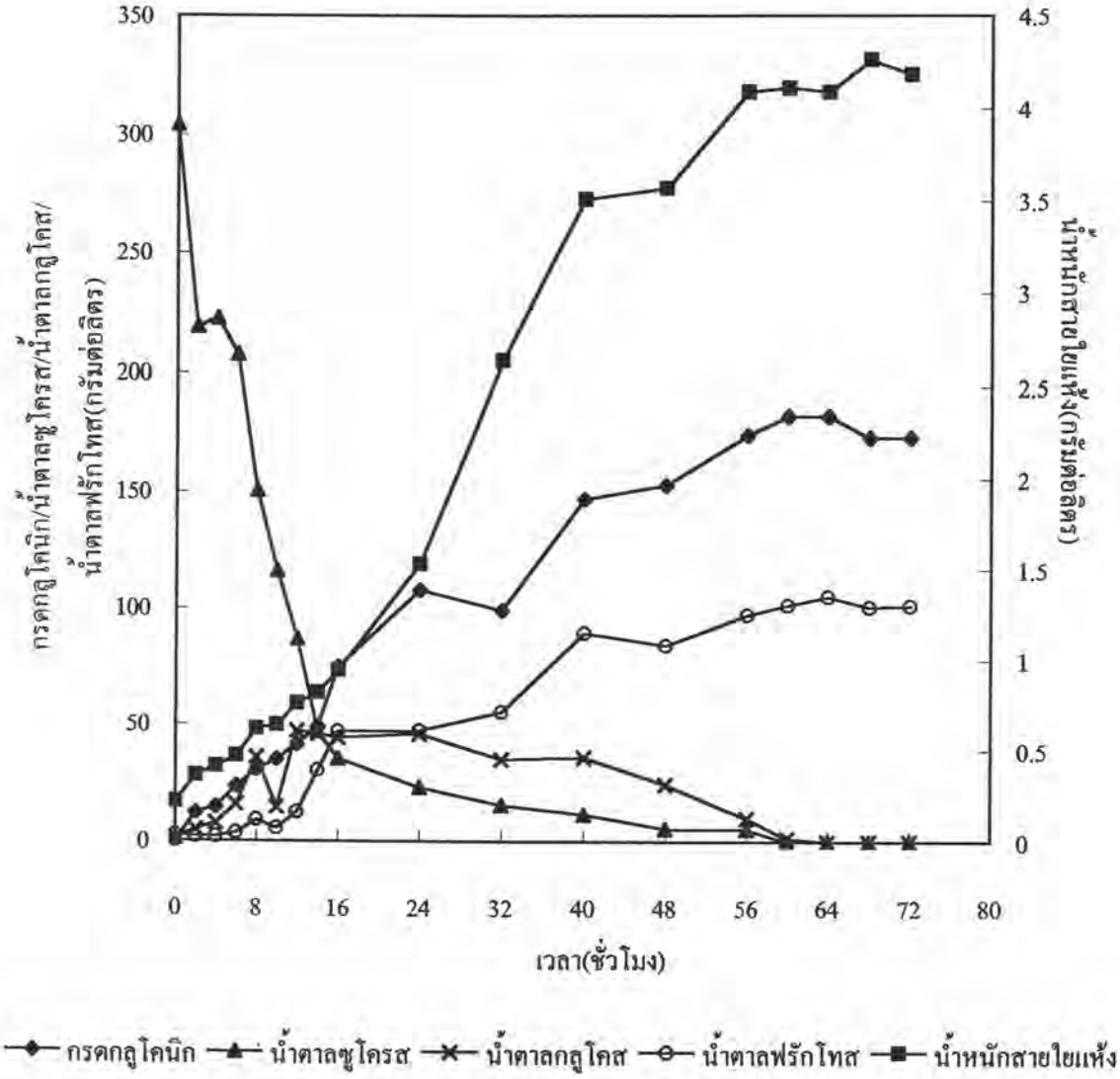
รูปที่ 31 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งในระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่างช่วง 12 ชั่วโมงแรกเป็น 4.5 หลังจากนั้นควบคุมที่ 6.0-6.5 จนสิ้นสุดการทดลอง

หมายเหตุ ปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรักโทสที่แสดงในกราฟวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง



รูปที่ 32 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งในระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่างช่วง 12 ชั่วโมงแรกเป็น 5.5 หลังจากนั้นควบคุมที่ 6.0-6.5 จนสิ้นสุดการทดลอง

หมายเหตุ ปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรักโทสที่แสดงในกราฟวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง



รูปที่ 33 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้งในระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 จนสิ้นสุดการทดลอง

หมายเหตุ ปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรักโทสที่แสดงในกราฟวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

ตารางที่ 16ก การใช้น้ำตาลซูโครสในน้ำตาลทรายช่วง 12 ชั่วโมงแรก อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก และประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรดด่างต่างๆกัน

ค่าความเป็นกรดด่าง		ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุด (ก/ล)	การใช้ซูโครสในน้ำตาลทรายช่วง 12 ชั่วโมงแรก		ชม.ที่ให้กรดสูงสุด	อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก (ก/ล/ชม.)*	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก*	น้ำหนักสายใยแห้ง*	$Y_{P/X}$*
12ชม.แรก	หลัง 12 ชม.		ก/ล	ร้อยละ					
4.5	6.0-6.5	178.58	133.41	44.49	68	2.68	54.67	3.58	49.88
5.5	6.0-6.5	175.75	201.69	67.23	64	2.85	53.80	3.72	47.24
6.0-6.5	6.0-6.5	182.42	213.05	71.02	60	3.04	55.84	4.11	44.38

ตารางที่ 16ข ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทส ประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตน้ำตาลฟรักโทส เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรดด่างต่างๆกัน

ค่าความเป็นกรดด่าง		ปริมาณฟรักโทส (ก/ล)*	ชม.ที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	ร้อยละของน้ำตาลทรายผลิตฟรักโทส	$Y_{P/X}$
12ชม.แรก	หลัง 12 ชม.				
4.5	6.0-6.5	128.1	68	42.70	35.78
5.5	6.0-6.5	125.9	64	41.97	33.84
6.0-6.5	6.0-6.5	111.45	60	37.15	27.12

หมายเหตุ * = คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด

ชั่วโมงแรกเป็น 4.5 และปรับเป็น 6.0-6.5 ตลอดช่วงการผลิตที่เหลือได้น้ำหนักสายใยแห้งต่ำสุด เท่ากับ 3.58 กรัมต่อลิตร เมื่อคิดปริมาณผลผลิตกรดกลูโคนิกต่อน้ำหนักสายใยแห้ง ($Y_{P/X}$) ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก ในวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด พบว่าเมื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.5 ในช่วงแรกของการผลิตมีค่าสูงสุดคือ 49.88 รองลงมาคือปรับค่าความเป็นกรดด่างในช่วงแรกการผลิตคือเท่ากับ 47.24 ส่วนค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.0-6.5 ตลอดการทดลองมีค่าต่ำสุดคือ 44.38 (ตารางที่ 16ก) แต่อัตราการผลิตและผลผลิตรวมที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5เร็วที่สุดและมากที่สุด อีกทั้งใช้เวลาในการผลิตสั้นที่สุด ขณะที่ปริมาณผลผลิตฟรักโทสต่อน้ำหนักสายใยแห้ง ($Y_{P/X}$) ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตฟรักโทส ในวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด พบว่าเมื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.5 และ 5.5 ในช่วงแรกของการผลิตมีค่าใกล้เคียงกันคือเท่ากับ 35.78 และ 33.84 ส่วนที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.0-6.5 ตลอดการทดลองมีค่าต่ำสุดคือ 27.12 (ตารางที่ 16ข)

สำหรับการใช้น้ำตาลทรายของ *Aspergillus niger* G153 พบว่ามีรูปแบบเดียวกันในทุกค่าความเป็นกรดด่างคือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงอย่างรวดเร็วและลดลงไปเรื่อยๆ จนเริ่มคงที่และมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในช่วงท้ายการทดลอง ส่วนน้ำตาลรีดิวส์ก็เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนเริ่มคงที่ในช่วงท้ายของการทดลองโดยค่าที่ได้ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ส่วนปริมาณน้ำตาลฟรักโทส [วัดด้วยวิธีของ Marshall และ Kooi (1957) ซึ่งเป็นวิธีทางเคมี] ซึ่งเริ่มวัดหลังจากค่าน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกับน้ำตาลรีดิวส์ มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวส์เช่นกัน คาดว่าน้ำตาลที่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อน่าจะเป็นน้ำตาลฟรักโทส (ไม่แสดงข้อมูลการวิเคราะห์ทางเคมี) และเมื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงตามวิธีการทดลองข้อ 10.4 พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกที่แปรผันค่าความเป็นกรดด่าง การทดลองควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-6.5 ตลอดการทดลอง มีการใช้น้ำตาลทรายสูงสุดโดยชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณน้ำตาลซูโครสเหลืออยู่ 86.95 กรัมต่อลิตรและได้น้ำตาลฟรักโทสเท่ากับ 12.64 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 33) ขณะที่เมื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 ใน 12 ชั่วโมงแรกมีการใช้ซูโครสรองลงมา โดยพบน้ำตาลซูโครสและฟรักโทสในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 98.31 และ 11.47 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (รูปที่ 32) และที่การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 ใน 12 ชั่วโมงแรกพบว่าเหลือน้ำตาลซูโครส 166.54 กรัมต่อลิตรและได้ฟรักโทส 7.6 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 31) ซึ่งเป็นการใช้ซูโครสต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่ค่าความเป็นกรดด่างอื่นๆ คิดเป็นร้อยละการใช้ซูโครสที่ชั่วโมงที่ 12 ของการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างใน 12

ชั่วโมงแรกเป็น 4.5 5.5 และ 6.0-6.5 เท่ากับ 44.99 67.23 และ 71.02 ตามลำดับ (ตารางที่ 16ก) จะเห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-6.5 การใช้น้ำตาลทรายเกิดขึ้นสูงมากที่สุด แตกต่างกับการใช้ของน้ำตาลที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.5 อย่างชัดเจน แต่หลังจากชั่วโมงที่ 12 ได้ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 6.0-6.5 ในทุกการทดลองด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตตลอดช่วงการผลิตที่เหลือ พบว่าในการทดลองควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 12 ชั่วโมงแรกไว้ที่ 4.5 เมื่อเปลี่ยนเป็นค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 มีการใช้น้ำตาลซูโครสเร็วขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ขณะที่ในการทดลองควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 12 ชั่วโมงแรกไว้ที่ 5.5 เมื่อเปลี่ยนเป็นค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 มีการใช้น้ำตาลซูโครสเร็วขึ้นเช่นกัน และในทั้งสองการทดลองที่แปรผันค่าความเป็นกรดด่าง 12 ชั่วโมงแรกเป็น 4.5 และ 5.5 น้ำตาลซูโครสแตกตัวได้หมดในเวลาไล่เลี่ยกันคือประมาณชั่วโมงที่ 60-64 (รูปที่31-32) ส่วนในการทดลองควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 6.0-6.5 ตลอดการทดลอง น้ำตาลซูโครสถูกใช้หมดประมาณชั่วโมงที่ 56-60 (รูปที่ 33) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์อินเวอร์เทสของ *Apergillus niger* G153 สลายพันธะไกลโคซิดิกในโมเลกุลของน้ำตาลซูโครสในน้ำตาลทรายได้ดีที่ความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 เมื่อคิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกและฟรักโทสจะเห็นว่ามีค่าไล่เลี่ยกันและมีรูปแบบเหมือนกันในทุกการทดลอง คือร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกสูงกว่าร้อยละ 50 (ตารางที่ 16ก) ขณะที่ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสต่ำกว่าร้อยละ 50 (ตารางที่ 16ข) แสดงว่าน้ำตาลฟรักโทสเล็กน้อยถูกใช้ไปเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก แต่ฟรักโทสส่วนใหญ่ยังคงอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สองร่วมกับกรดกลูโคนิก

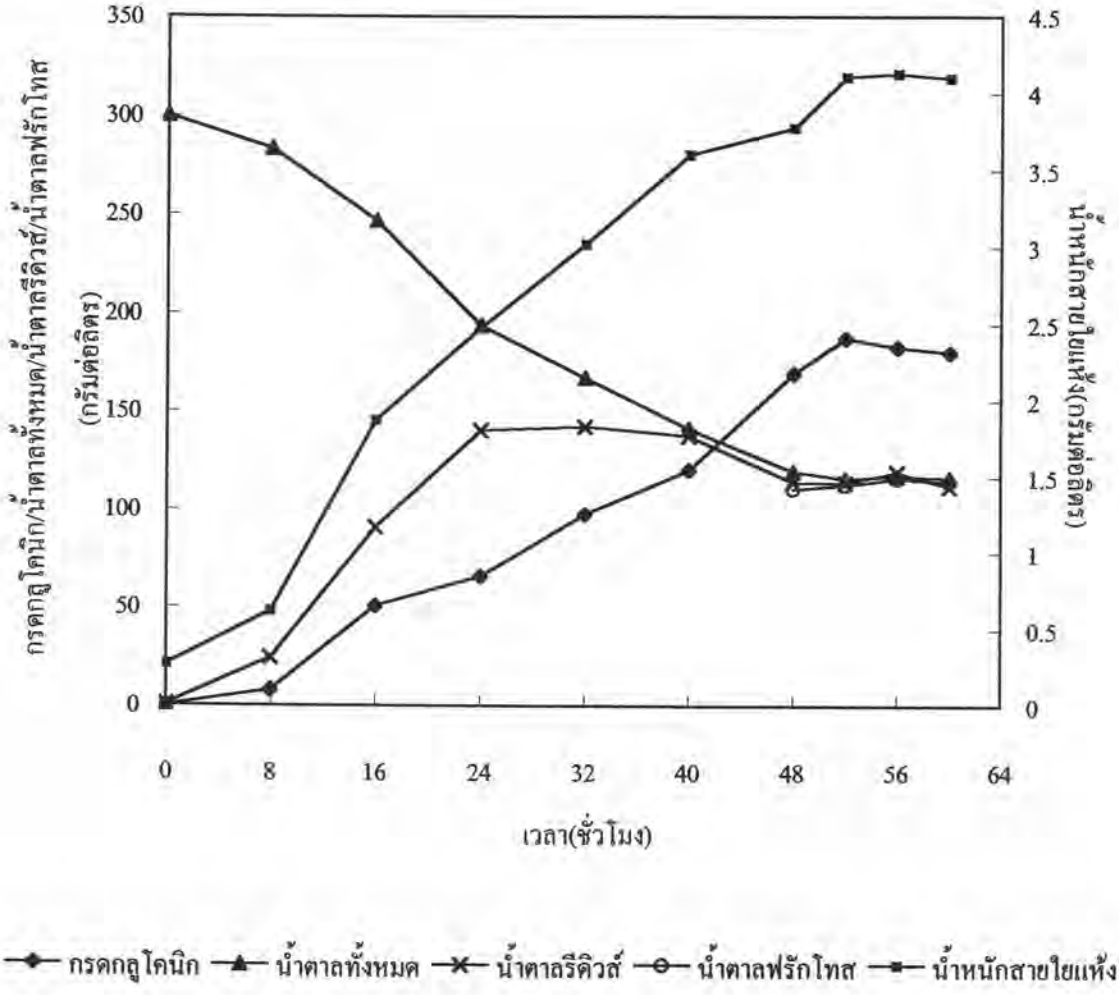
จากผลการทดลองแสดงว่า *Aspergillus niger* G 153 สามารถใช้น้ำตาลทรายได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 และนำไปใช้ผลิตกรดโดยให้ปริมาณกรดกลูโคนิกมากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด อีกทั้งการจัดค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0-6.5 ไม่ต้องปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการทดลองให้ยุ่งยาก และไม่ต้องใช้เครื่องควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง จึงถือว่าการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ที่ 6.0-6.5 ตลอดการทดลองเป็นภาวะที่เหมาะสมในการย่อยน้ำตาลทรายและผลิตกรดกลูโคนิกร่วมกับน้ำตาลฟรักโทสด้วย *Aspergillus niger* G153

2.4 ผลการหาอัตราการกวนที่เหมาะสม

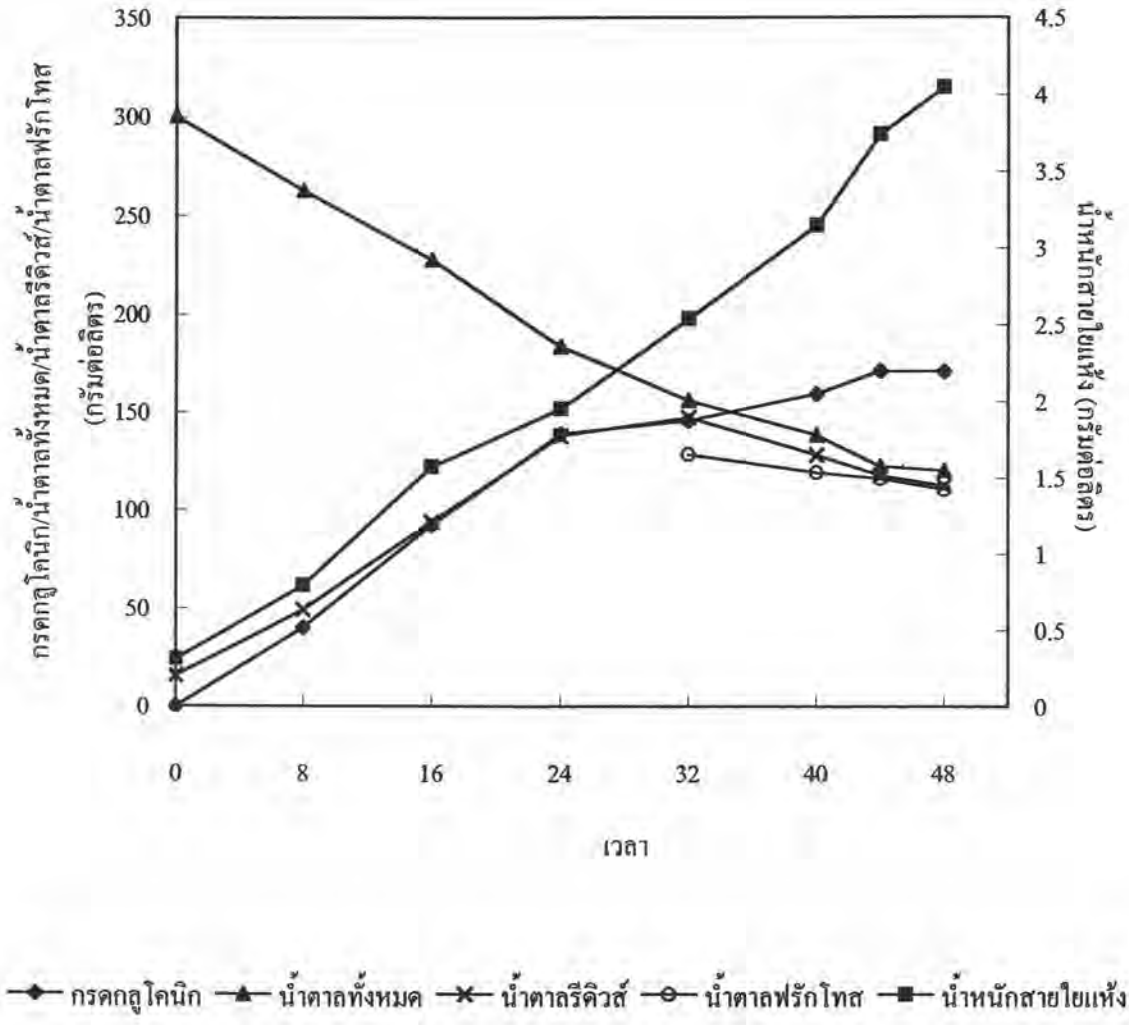
เนื่องจากการผลิตกรดกลูโคนิกเป็นกระบวนการออกซิเดชั่นที่ต้องการออกซิเจนในการผลิต ดังนั้นการกวนที่เหมาะสมจึงมีผลต่อปริมาณและการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากงานวิจัยของบาจรีย์ จันทราภานุกร (2536) ทราบว่าอัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิกจากแป้งไฮโดรไลเสสโดย *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จึงใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีเป็นหลักและแปรผันหาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลทราย

เมื่อถ่ายหัวเชื้อขนาดหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมัก (ภาคผนวก ก 5) ปริมาตร 2.5 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และแปรผันอัตราการกวนเป็น 500 550 และ 600 รอบต่อนาที ได้ผลการทดลองดังนี้ ที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 52 เท่ากับ 187.51 กรัมต่อลิตรและได้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 112.54 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 34) เมื่อเพิ่มอัตราการกวนขึ้นพบว่าผลิตกรดกลูโคนิกเร็วขึ้นโดยเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิกลดลง คือที่อัตราการกวน 550 รอบต่อนาทีผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 44 เท่ากับ 171.26 กรัมต่อลิตรและได้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 116.19 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 35) และที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาทีให้กรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 44 เท่ากับ 174.37 กรัมต่อลิตรและได้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 113.26 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 36) จะเห็นว่าที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงกว่าอัตราการกวนอื่นๆ ขณะที่ปริมาณฟรักโทสที่ได้ไล่เลี่ยกัน โดยคิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก พบว่าอัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีมีค่าสูงสุดคือ 57.40 รองลงมาคืออัตราการกวน 600 รอบต่อนาทีเท่ากับ 53.38 และอัตราการกวน 550 รอบต่อนาทีเท่ากับ 52.43 ตามลำดับ (ตารางที่ 17ก) ส่วนร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสมีค่าไล่เลี่ยกัน คือที่อัตราการกวน 500 550 และ 600 รอบต่อนาที มีค่าเท่ากับ 37.51 38.73 และ 37.75 ตามลำดับ (ตารางที่ 17ข) แต่เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตกรดกลูโคนิก พบว่าอัตราการกวน 600 รอบต่อนาทีมีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.96 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาคืออัตราการกวน 550 และ 500 รอบต่อนาทีเท่ากับ 3.89 และ 3.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 17ก)

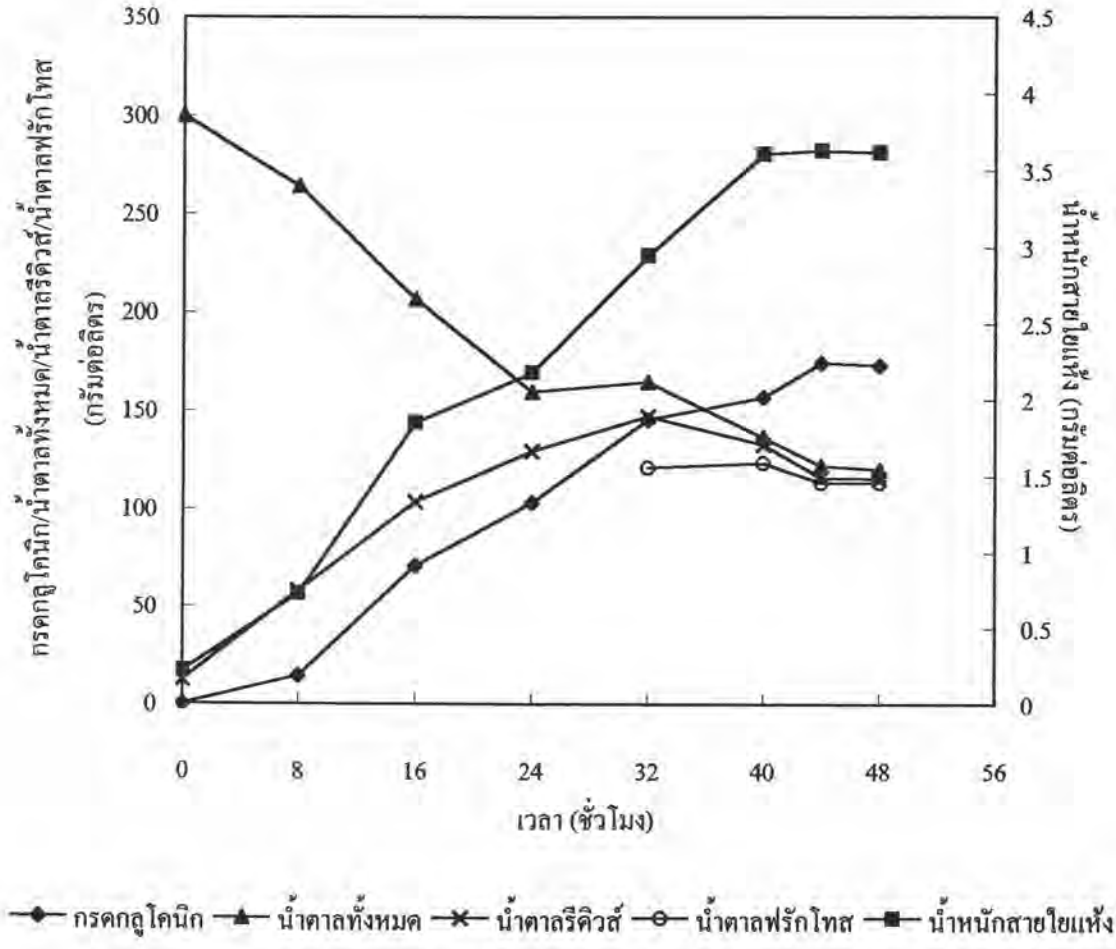
เมื่อพิจารณาการเติบโตโดยวัดน้ำหนักสายใยแห้ง พบว่า *A. niger* G153 มีการเติบโตไปพร้อมกับการผลิตกรดกลูโคนิก (รูปที่ 34-36) และ ณ วันที่จุลินทรีย์ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด ที่



รูปที่ 34 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จัดอัตราการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ขนาดหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรหัวเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที



รูปที่ 35 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จัดอัตราการกวนเท่ากับ 550 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ขนาดหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรหัวเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที



รูปที่ 36 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จัดอัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ขนาดหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรหัวเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที

ตารางที่ 17ก อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก และประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก เมื่อแปรผันอัตราเร็วของการกวนต่างๆกัน

อัตราเร็วของการกวน (รอบต่อนาที)	ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุด(ก/ล)	ชม.ที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก (ก/ล/ชม.) *	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก*	น้ำหนักสายใยแห้ง(ก/ล)*	$Y_{P/X}$
500	187.51	52	3.61	57.40	4.11	45.62
550	171.26	44	3.89	52.43	3.74	45.79
600	174.37	44	3.96	53.38	3.63	48.04

ตารางที่ 17ข ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก ประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก เมื่อแปรผันอัตราเร็วของการกวนต่างๆกัน

อัตราเร็วของการกวน (รอบต่อนาที)	ปริมาณเฟรักโทส (ก/ล)*	ชม.ที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทส*	$Y_{P/X}$
500	112.54	52	37.51	27.38
550	116.19	44	38.73	31.07
600	113.26	44	37.75	31.20

หมายเหตุ * = คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด

อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีได้น้ำหนักสายใยแห้งสูงที่สุดคือเท่ากับ 4.11 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออัตราการกวน 550 และ600 รอบต่อนาทีเท่ากับ 3.74 และ 3.62 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อคิดเป็นปริมาณผลผลิตกรดกลูโคนิกต่อน้ำหนักสายใยแห้งที่สร้างขึ้น ($Y_{P/X}$) ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก ณ ชั่วโมงที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด พบว่าทุกอัตราการกวนมีค่าไม่ต่างกันมากนัก แต่ที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที มีค่าสูงสุดคือ 48.04 รองลงมาคืออัตราการกวน 550 และ 500 รอบต่อนาทีเท่ากับ 45.79 และ 45.62 ตามลำดับ (ตารางที่ 17ก) ในส่วนปริมาณผลผลิตฟรักโทสต่อน้ำหนักสายใยแห้งที่สร้างขึ้น ($Y_{P/X}$) ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตฟรักโทส ณ ชั่วโมงที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดก็มีค่าไม่แตกกันมากนักเช่นกันโดยที่อัตราการกวน 500 550 และ 600 รอบต่อนาทีมีค่าเท่ากับ27.38 31.07 และ 31.20 ตามลำดับ (ตารางที่ 17ข)

สำหรับการใช้น้ำตาลทรายของ *Aspergillus niger* G153 พบว่ามีรูปแบบเดียวกันในทุกอัตราการกวนคือ ในช่วงแรกปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็ว จนเข้าสู่ช่วงท้ายการทดลองปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วัดได้เริ่มคงที่และใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (รูปที่ 34-36) ซึ่งสัมพันธ์กับการเติบโตและการผลิตกรดที่เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลง ขณะที่น้ำตาลรีดิวส์ก็มีปริมาณเพิ่มขึ้นและคงที่ในช่วงท้ายของการทดลอง โดยค่าที่ได้ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (รูปที่ 34-36) ซึ่งจากกราฟแสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวส์ (รูปที่ 34-36) จะเห็นว่าเวลาที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกับน้ำตาลรีดิวส์ไม่แตกต่างกันมากนักในทุกอัตราการกวนคือประมาณชั่วโมงที่ 40-44 แสดงว่า *A. niger* G153 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้ดีพอๆที่อัตราการกวน 500-600 รอบต่อนาที ส่วนน้ำตาลฟรักโทสซึ่งเริ่มวัดหลังจากค่าน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกับน้ำตาลรีดิวส์คือคาดว่าน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวส์เช่นกัน (รูปที่ 34-36) จึงคาดว่าน้ำตาลที่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อน่าจะเป็นน้ำตาลฟรักโทส และพบว่าปริมาณฟรักโทสที่เหลืออยู่มีค่าต่ำกว่าปริมาณฟรักโทสที่ควรได้จากการสลายพันธะไกลโคซิดิกของน้ำตาลซูโครสทั้งหมด (ตารางที่ 17ข) อีกทั้งร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสต่ำกว่าร้อยละ 50 (ตารางที่ 17ข) ขณะที่ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกสูงกว่าร้อยละ 50 (ตารางที่ 17ก) แสดงว่ามีการนำฟรักโทสเล็กน้อยมาใช้ผลิตกรดกลูโคนิก แต่ฟรักโทสส่วนใหญ่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บเกี่ยวได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สองร่วมกับกรดกลูโคนิก

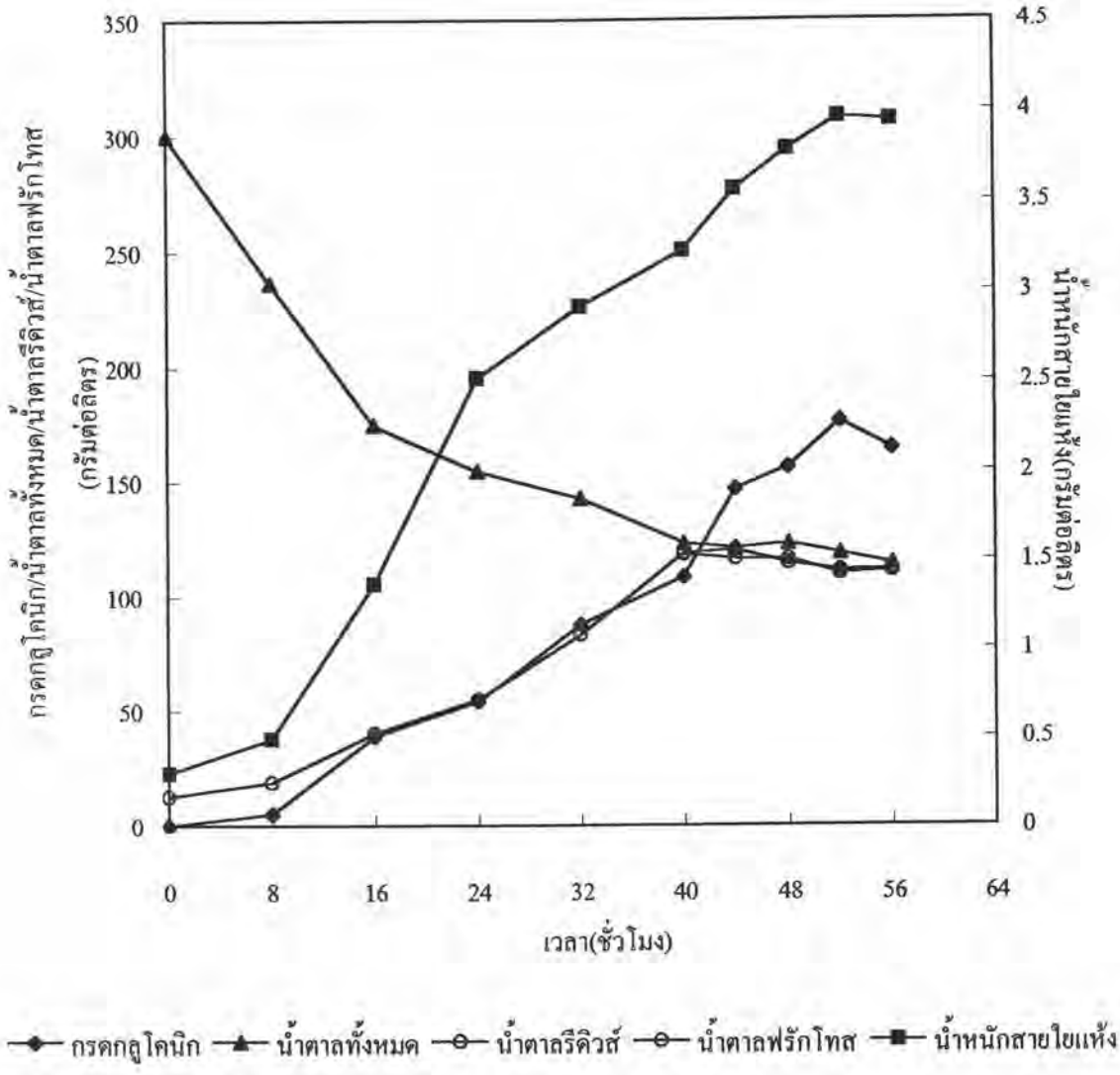
จากผลการทดลองโดยรวมแล้วอาจกล่าวได้ว่าค่าอัตราการกวนช่วง 500-600 รอบต่อนาทีเป็นช่วงการกวนที่เหมาะสมโดยให้ผลผลิตไล่เลี่ยกัน แต่ที่อัตราการกวน 550 และ 600 รอบต่อ

นาที มีการกวนค่อนข้างรุนแรงทำให้น้ำหมักที่มีน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรักโทส ตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตและสายใยบางส่วนกระเด็นขึ้นไปติดภายในตัวถังหมักโดยรอบ ทำให้สายใยและน้ำตาลเหล่านั้นไม่ได้ใช้ในการผลิตกรดต่อไป ซึ่งจะเห็นได้จากปริมาณกรดกลูโคนิกของอัตราการกวน 550 และ 600 รอบต่อนาทีต่ำกว่าอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ดังนั้นเมื่อพิจารณาโดยรวมอีกทั้งเพื่อเป็นการรักษาอายุการใช้งานของถังหมัก จึงเลือกใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ในการทดลองต่อไป

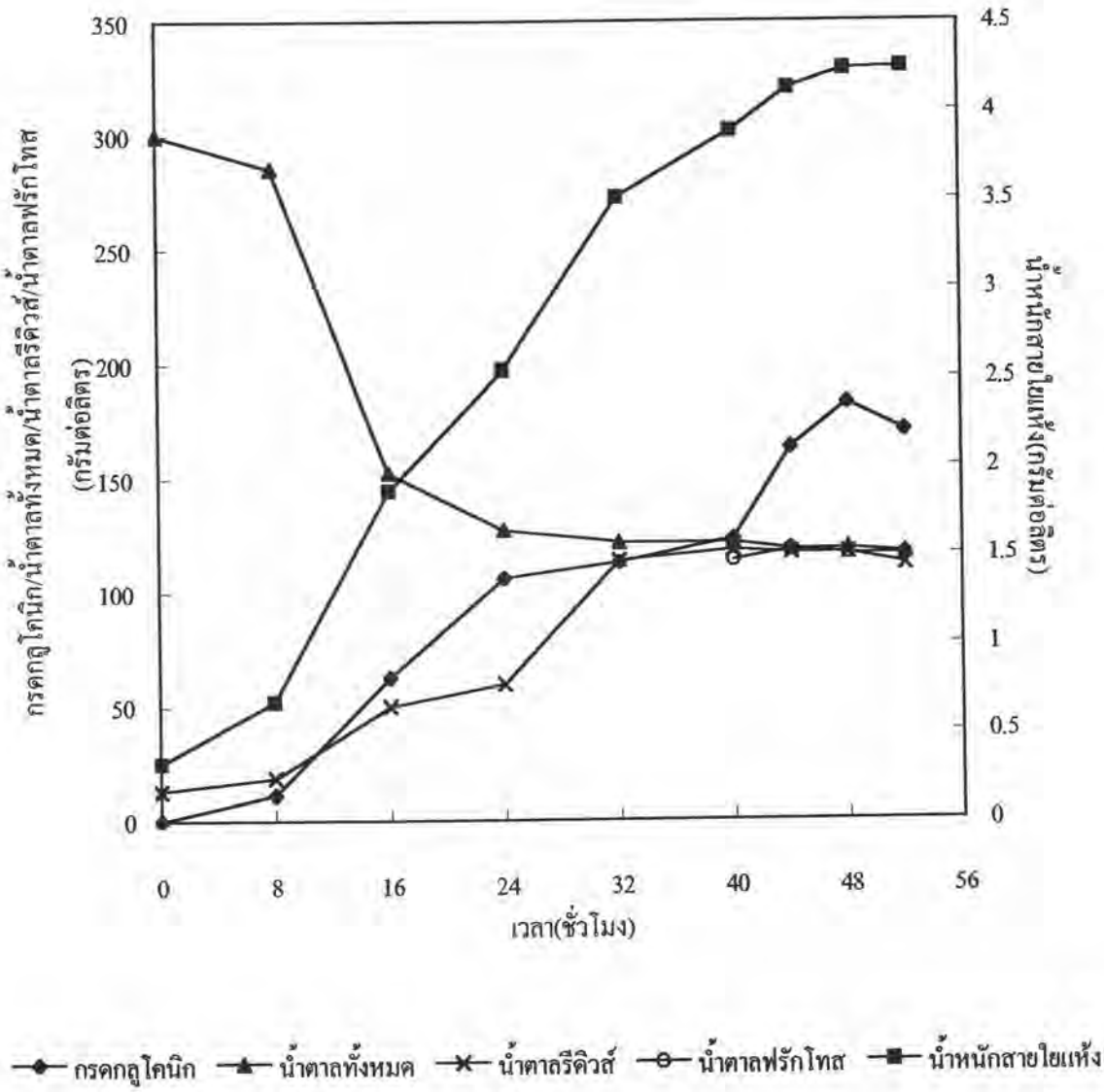
2.5 ผลการหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม

เนื่องจากการผลิตกรดกลูโคนิกเป็นกระบวนการออกซิเดชั่นที่ต้องการออกซิเจนในการผลิต ดังนั้นปริมาณอากาศที่ให้จึงมีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิกของจุลินทรีย์ จากงานวิจัยของบาจรีย์ จันทราภานุกร (2536) พบว่าอัตราการการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิกจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยโดย *Aspergillus niger* G153 จึงใช้อัตราการการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีเป็นหลักและแปรผันหาอัตราการการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลทราย

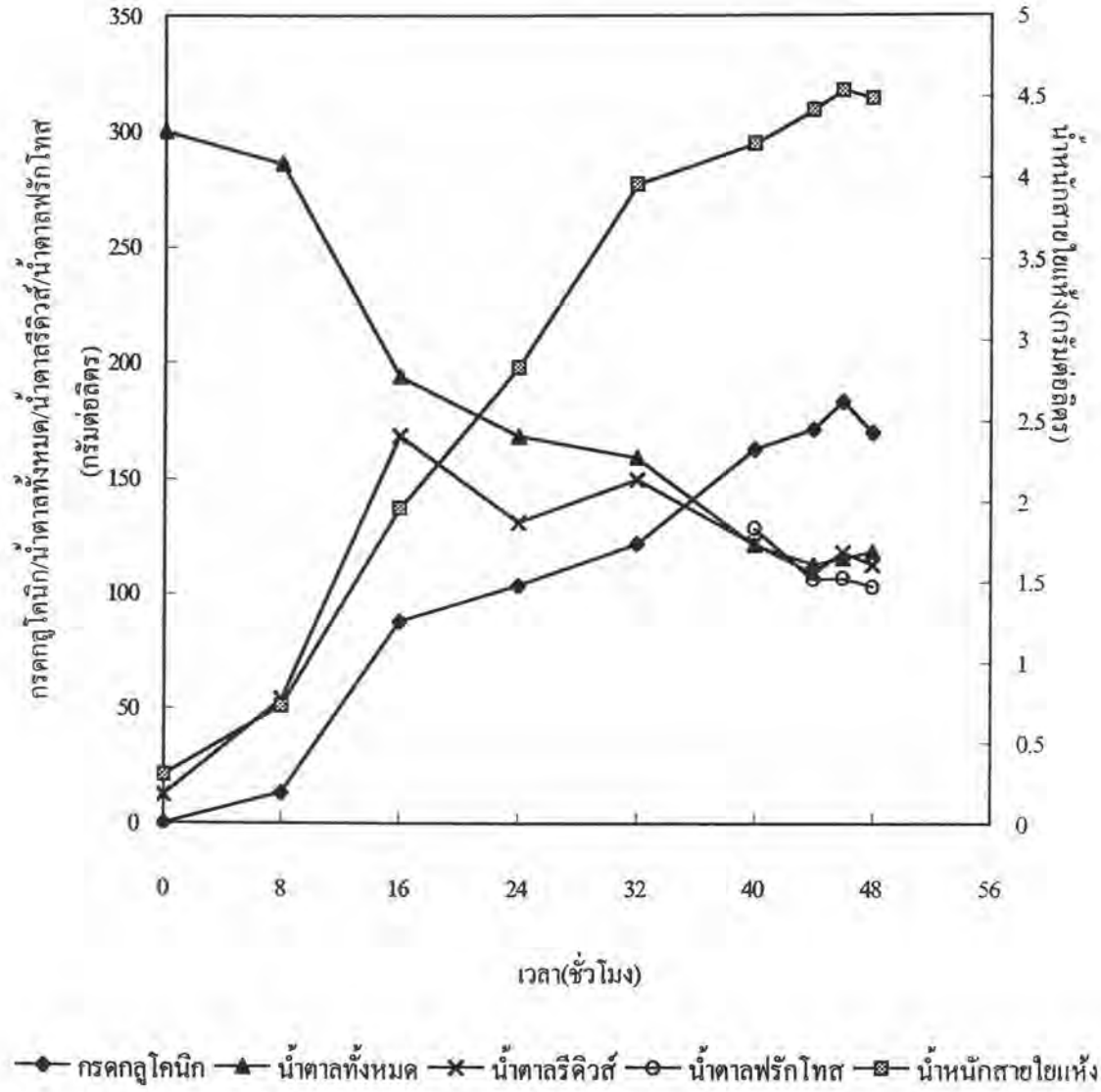
เมื่อถ่ายหัวเชื้อขนาดหัวเชื้อเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิก (ภาคผนวก ก 5) ปริมาตร 2.5 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีจากผลการทดลองข้อ 2.4 อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที ได้ผลการทดลองดังนี้ ที่อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีได้กรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 52 เท่ากับ 176.91 กรัมต่อลิตร และได้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 110.36 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 37) อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีได้กรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 182.95 กรัมต่อลิตรและได้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 116.56 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 38) และที่อัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีได้กรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 46 เท่ากับ 183.29 กรัมต่อลิตรและได้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 106.78 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 39) ส่วนอัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีได้กรดกลูโคนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 178.12 กรัมต่อลิตรและได้ฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม 112.71 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 40) จะเห็นได้ว่าปริมาณกรดกลูโคนิกที่ได้ในแต่ละการทดลองที่แปรผันการให้อากาศนั้นไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ที่อัตราการให้อากาศที่ต่ำ (1.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที) หรือ



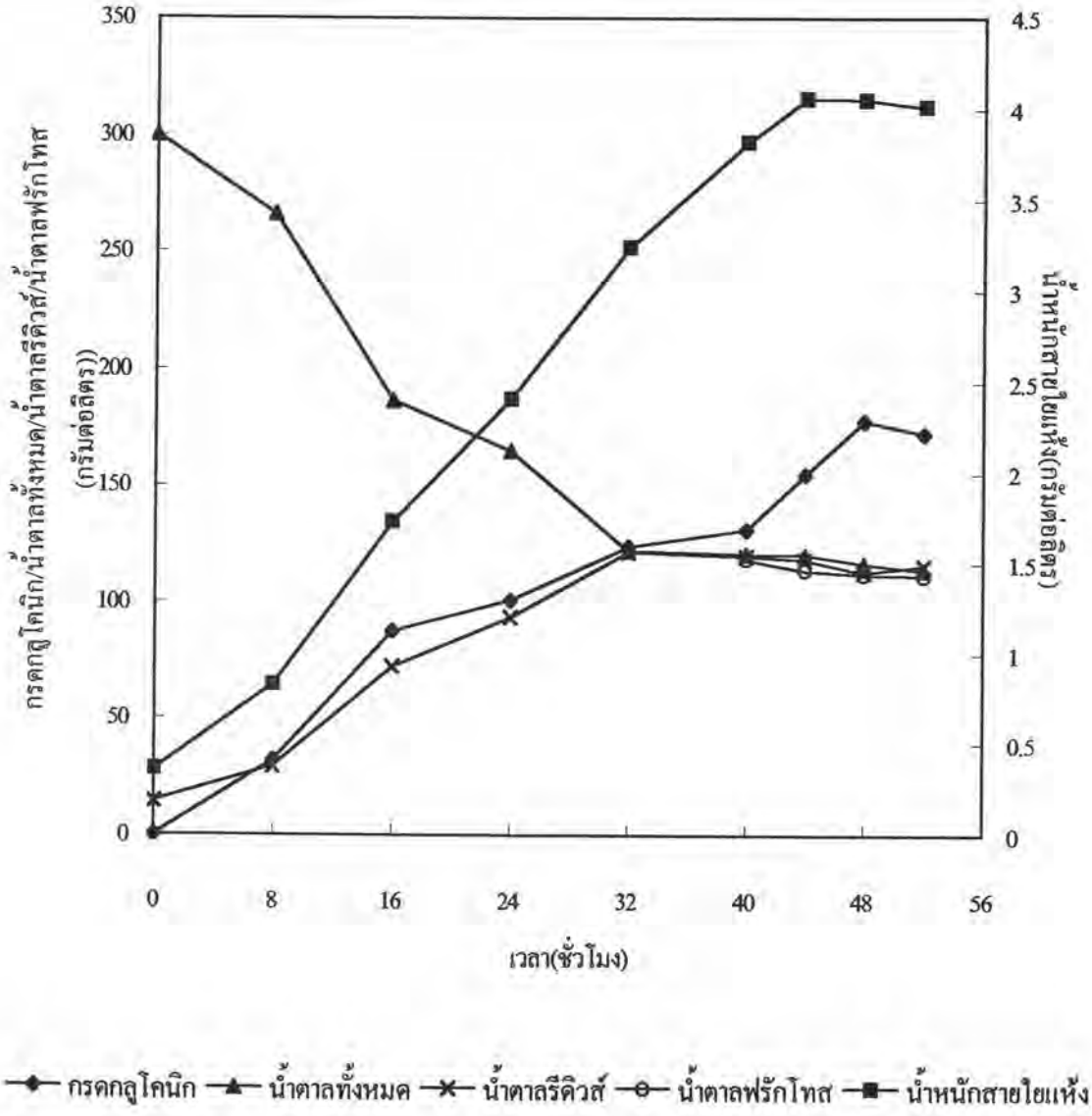
รูปที่ 37 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อจัดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ขนาดหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรหัวเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที



รูปที่ 38 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อจัดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ขนาดหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรหัวเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที



รูปที่ 39 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อจัดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ขนาดหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรหัวเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที



รูปที่ 40 ปริมาณกรดกลูโคนิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลฟรักโทส และน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อจัดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที ที่ความเข้มข้นน้ำตาลทรายเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร ขนาดหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรหัวเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที

สูงเกินไป (2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที) ให้ผลผลิตกรดน้อยกว่า เมื่อคิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก พบว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีเท่ากับ 54.16 56.00 56.11 และ 54.53 ตามลำดับ โดยที่อัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีมีค่าสูงสุด (ตารางที่ 18ก) ขณะที่ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสของอัตราการให้อากาศ 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีเท่ากับ 36.79 38.85 35.59 และ 37.57 ตามลำดับ (ตารางที่18ข) เมื่อพิจารณาเวลาที่ใช้ในการผลิต พบว่าถ้าอัตราการให้อากาศเหมาะสมจะทำให้ได้ผลผลิตเร็ว แต่ถ้าอัตราการให้อากาศต่ำและสูงเกินไปทำให้ผลิตช้าลงคือ ที่อัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ผลิตได้เร็วที่สุด ใช้เวลาในการผลิตน้อยที่สุดคือ 46 ชั่วโมง รองลงมาคืออัตราการให้อากาศ 1.5 และ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีคือเท่ากับ 48ชั่วโมง ส่วนที่อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที ใช้เวลามากที่สุดคือ เท่ากับ 52 ชั่วโมง (ตารางที่ 18ก) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกพบว่าที่อัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีมีค่าสูงสุดคือ 3.98 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาคืออัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาทีเท่ากับ 3.81 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและอัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาทีเท่ากับ 3.71 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาทีมีค่าต่ำสุดคือ 3.40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 18ก)

ส่วนการเติบโตโดยวัดน้ำหนักสายใยแห้ง พบว่า *A. niger* G153 มีการเติบโตควบคู่กับการผลิตกรดกลูโคนิก (รูปที่ 37-40) และ ณ วันที่จุลินทรีย์ผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด อัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรอบต่อนาทีได้น้ำหนักสายใยแห้งสูงสุดคือเท่ากับ 4.54 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออัตราการให้อากาศ 1.5 2.5 และ 1.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีเท่ากับ 4.24 4.05 และ 3.94 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อคิดปริมาณผลผลิตกรดกลูโคนิกต่อน้ำหนักสายใยแห้งที่สร้างขึ้น ($Y_{P/X}$) ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด พบว่าอัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีมีค่าสูงสุดคือ 44.90 รองลงมาคืออัตราการให้อากาศ 2.5 1.5 และ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีเท่ากับ 43.98 43.15 และ 40.37 ตามลำดับ (ตารางที่ 18ก) ส่วนปริมาณผลผลิตฟรักโทสต่อน้ำหนักสายใยแห้งที่สร้างขึ้น ($Y_{P/X}$) ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตฟรักโทส ณ ชั่วโมงที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดก็มีค่าไม่แตกกันมากนักเช่นกันโดยที่อัตราการให้อากาศ 1.0 1.5 2.0 และ 2.5

ตารางที่ 18ก อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก และประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศต่างๆกัน

อัตราการให้อากาศ (ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที)	ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุด(ก/ล)	ชม.ที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	อัตราการผลิตกรดกลูโคนิก (ก/ล/ชม.) *	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิก*	น้ำหนักสายใยแห้ง (ก/ล)*	$Y_{P/X}$
1.0	176.91	52	3.40	54.16	3.94	44.90
1.5	182.95	48	3.81	56.00	4.24	43.15
2.0	183.29	46	3.98	56.11	4.54	40.37
2.5	178.12	48	3.71	54.53	4.05	43.98

ตารางที่ 18ข ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตน้ำตาลฟรักโทส ประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตฟรักโทส เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศต่างๆกัน

อัตราการให้อากาศ (ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที)	ปริมาณฟรักโทส (ก/ล)*	ชม.ที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	$Y_{P/X}$	ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทส*
1.0	110.36	52	28.01	36.79
1.5	116.56	48	27.49	38.85
2.0	106.78	46	23.52	35.59
2.5	112.71	48	27.83	37.57

หมายเหตุ * = คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด

ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีมีค่าเท่ากับ 28.01 27.49 23.52 และ 27.83 ตามลำดับ (ตารางที่ 18ข)

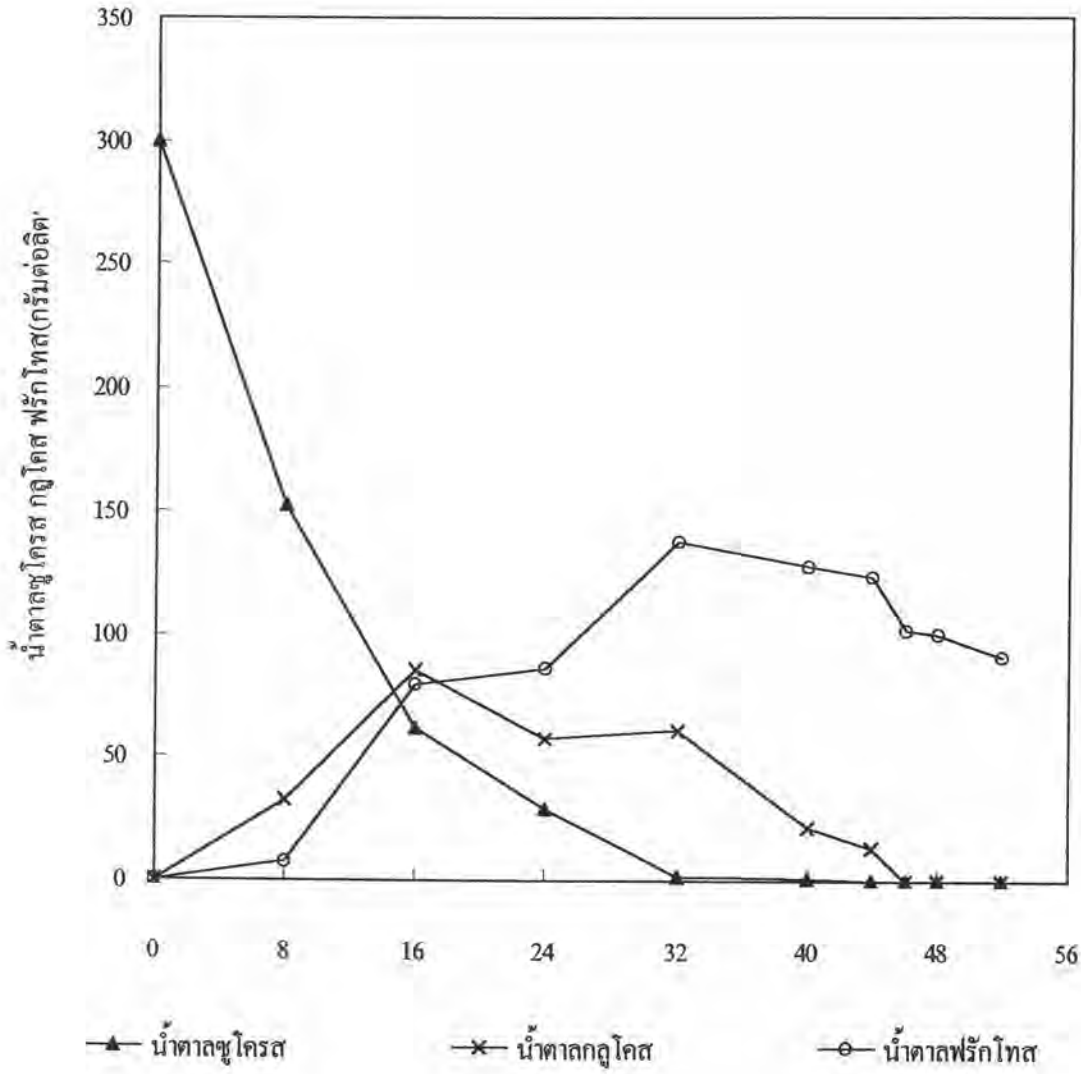
Aspergillus niger G153 มีการใช้น้ำตาลรูปแบบเดียวกันในทุกอัตราการให้อากาศคือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็ว จนเข้าสู่ช่วงท้ายการทดลองปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วัดได้เริ่มคงที่และใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (รูปที่ 37-40) ซึ่งสัมพันธ์กับการเติบโตและการผลิตกรดที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลง ส่วนน้ำตาลรีดิวส์จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนเริ่มคงที่ในช่วงท้ายของการทดลอง โดยค่าที่ได้ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (รูปที่ 37-40) ส่วนปริมาณน้ำตาลฟรักโทสซึ่งเริ่มวัดหลังจากค่าน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกับน้ำตาลรีดิวส์คือคาดว่าน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวส์เช่นกัน (รูปที่ 37-40) ซึ่งคาดได้ว่าน้ำตาลที่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อน่าจะเป็นน้ำตาลฟรักโทส และมีปริมาณฟรักโทสเหลืออยู่ต่ำกว่าปริมาณที่ควรได้จากการสลายพันธะไกลโคซิดิกของน้ำตาลซูโครสทั้งหมด (ตารางที่ 18ข) คิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตฟรักโทสพบว่ามีค่าต่ำกว่าร้อยละ 50 (ตารางที่ 18ข) ขณะที่ร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกสูงกว่าร้อยละ 50 (ตารางที่ 18ก) แสดงว่ามีการนำฟรักโทสเล็กน้อยมาใช้ผลิตกรดกลูโคนิก แต่ฟรักโทสส่วนใหญ่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บเกี่ยวได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สองร่วมกับกรดกลูโคนิก

จะเห็นว่าการเพิ่มอัตราการให้อากาศมากขึ้นจนเกินพอก็มิได้ส่งผลในทางการเพิ่มปริมาณผลผลิตหรือลดเวลาที่ใช้ลงเสมอไปหากอากาศที่ให้มาก (2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที) เกินกว่าที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ทันก็ถือเป็นการสูญเสียพลังงาน ส่วนที่อัตราการให้อากาศที่ต่ำจะส่งผลให้ใช้เวลาในการผลิตเพิ่มขึ้น ดังนั้นอัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เป็นอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมที่สุดต่อจุลินทรีย์ในการผลิตกรดกลูโคนิก เนื่องจากใช้ระยะเวลาสั้น มีอัตราการผลิตกรดกลูโคนิกสูง และมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลทรายเป็นกรดกลูโคนิกที่ดี (ตารางที่ 18)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าอัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีเหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิก ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิกร่วมกับน้ำตาลฟรักโทสโดย *Aspergillus niger* G153 ในระดับถังหมัก คือใช้น้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 250:0.5 ปริมาณหัวเชื้อ 10 % อุณหภูมิ 30$\pm$2 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อ

นาที ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-6.5 ตลอดการทดลอง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลตลอดการผลิตภายใต้ภาวะเหมาะสมดังกล่าวด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ได้ผลดังรูปที่ 41 นั่นคือจุลินทรีย์สามารถย่อยน้ำตาลทรายได้อย่างรวดเร็วและหมดในชั่วโมงที่ 32 ส่วนกลูโคสถูกใช้หมดในชั่วโมงที่ 46 คงเหลือแต่น้ำตาลฟรักโทส 101.96 กรัมต่อลิตรเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองร่วมกับกรดกลูโคนิก

เมื่อใช้น้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดกลูโคนิกร่วมกับฟรักโทสภายใต้ภาวะที่เหมาะสม พบว่าผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 183.29 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละของน้ำตาลทรายที่ผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 56.11 ซึ่งเป็นค่าร้อยละที่ต่ำเมื่อเทียบกับการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยที่มีความเข้มข้นกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าร้อยละของการใช้น้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 95.64 (บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536) และเนื่องจากในการใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น น้ำตาลฟรักโทสที่ได้จากการสลายพันธะไกลโคซิดิกของซูโครส ไม่ได้ถูกนำไปใช้ผลิตกรด แต่สามารถใช้น้ำตาลทรายได้ถึง 300 กรัมต่อลิตร เท่ากับมีกลูโคสตั้งต้นประมาณ 150 กรัมต่อลิตร ซึ่งบาจรีย์ จันทราภานุกร พบว่าความเข้มข้น 150-200 กรัมต่อลิตรเหมาะที่สุดสำหรับการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอนและให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกเท่ากับ 191.28 กรัมต่อลิตร (จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยที่มีความเข้มข้นกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร) ซึ่งไม่แตกต่างกันมากนักกับผลผลิตกรด (183.29 กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร แต่การใช้น้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตรจะได้ฟรักโทสเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองเพิ่มอีกอย่างหนึ่ง และมากถึง 106.78 กรัมต่อลิตร อีกทั้งสามารถแยกผลิตภัณฑ์ทั้งสองออกจากกันได้ง่าย ดังนั้นการใช้น้ำตาลทรายจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจมากในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนผลิตกรดกลูโคนิกโดย *A. niger* G153



รูปที่ 41 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงของน้ำตาลแต่ละชนิด ที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้ภาวะเหมาะสมคือความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร ขนาดหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

3. ผลการแยกแคลเซียมกลูโคเนตออกจากน้ำตาลฟรักโทส

เมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากการทดลองซึ่งแยกสายใย *Aspergillus niger* G153 ออกไปแล้ว บรรจุลงในภาชนะ นำไปเก็บไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิประมาณ 4-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จะได้ตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตสีขาวรูปร่างคล้ายดอกกะหล่ำขึ้นที่ก้นภาชนะเช่นเดียวกับการแยกตะกอนออกจากน้ำหมักที่ใช้กลูโคสหรือแป้งไฮโดรไลเสสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ได้ส่วนน้ำใสสีน้ำตาลซึ่งมีน้ำตาลฟรักโทสอยู่เหนือส่วนตะกอนอีกด้วย(รูปที่ 42) เมื่อแยกตะกอนที่เกิดขึ้นออกจากส่วนน้ำ โดยเทส่วนน้ำใสซึ่งมีน้ำตาลฟรักโทสลงในภาชนะอีกใบอย่างเบามือไม่ให้ตะกอนร่วงลงไปด้วย ล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำเย็น 4-5 ครั้ง แล้วนำตะกอนไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อตะกอนแห้ง นำมาบดเป็นผงเก็บใส่ภาชนะเพื่อการวิเคราะห์ต่อไป (รูปที่ 43 ก) ส่วนน้ำใสที่มีน้ำตาลฟรักโทสนำไปแช่แข็งเพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไปเช่นกัน (รูปที่ 43 ฉ)

ก

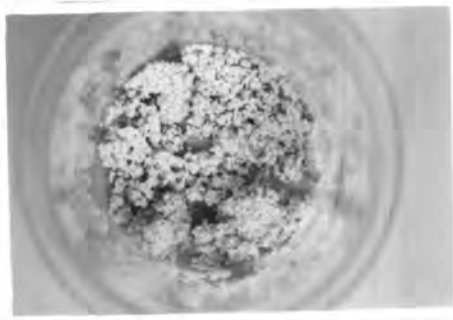
ข

รูปที่ 42 ตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตที่เกิดขึ้นในน้ำหมัก เมื่อนำไปเก็บในอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

ก ถ่ายจากด้านข้างของภาชนะ

ข ถ่ายจากด้านบนของภาชนะ

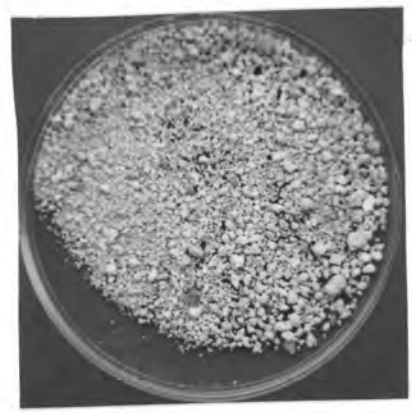
ก



ข

ค

ง



จ

ฉ

รูปที่ 43 ตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตที่แยกได้จากน้ำหมัก แคลเซียมกลูโคเนตมาตรฐาน และส่วนน้ำใสที่มีน้ำตาลฟรักโทสผสมอยู่

ก ตะกอนที่แยกส่วนน้ำออกไป

ข ตะกอนที่แยกจากน้ำหมัก (ผ่านการล้าง 1 ครั้ง)

ค ตะกอนที่แยกจากน้ำหมัก (ผ่านการล้าง 4 ครั้ง)

ง แคลเซียมกลูโคเนตมาตรฐาน (เกรดอุตสาหกรรม)

จ แคลเซียมกลูโคเนตมาตรฐาน (เกรดวิเคราะห์)

ฉ ส่วนน้ำใสที่มีฟรักโทสผสมอยู่และแยกตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตออกแล้ว

4. ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย *A. niger* G153 ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

4.1 ผลการวิเคราะห์น้ำหมัก

นำน้ำหมักที่แยกสายใยราออกแล้ว ไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยในการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ด้วยคอลัมน์ Zorbax C-8 พบว่ากรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นมีช่วงเวลาที่อยู่ในคอลัมน์เช่นเดียวกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน (รูปที่ 44) และใช้เวลาวิเคราะห์นาน 20 นาที ไม่พบการปนเปื้อนของกรดอินทรีย์ชนิดอื่นเลย เมื่อนำมาวิเคราะห์น้ำตาลด้วยคอลัมน์ Spherisorb-NH_2 พบว่ามีน้ำตาลเพียงชนิดเดียวและมีช่วงเวลาที่อยู่ในคอลัมน์เช่นเดียวกับน้ำตาลฟรักโทสมาตรฐาน (รูปที่ 45) แสดงว่าในน้ำหมักที่ได้จากการทดลองมีกรดอินทรีย์คือกรดกลูโคนิกและน้ำตาลฟรักโทส

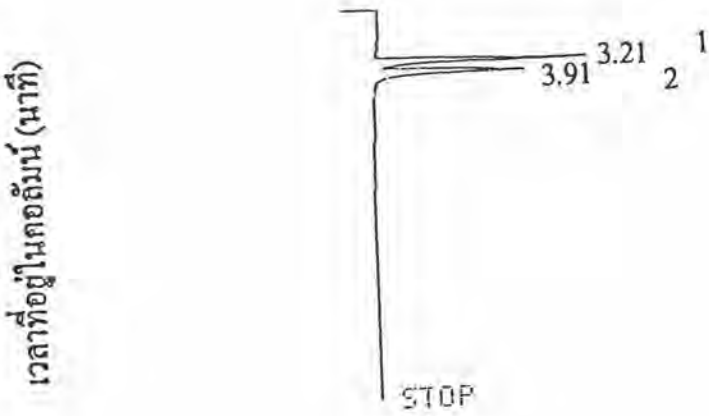
4.2 ผลการวิเคราะห์ตะกอนและของเหลวใสสีน้ำตาล

4.2.1 ผลการวิเคราะห์ตะกอนขาว

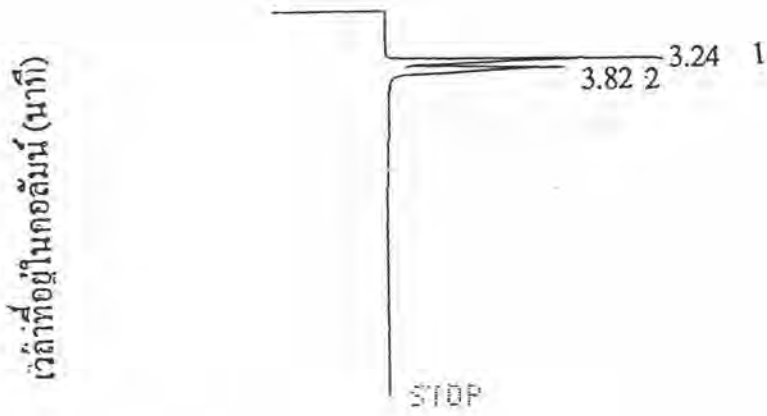
นำผงตะกอนขาวจากผลการทดลองข้อ 4 บางส่วนไปละลายในน้ำร้อน นำมาวิเคราะห์กรดอินทรีย์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ Zorbax C-8 กับ Spherisorb C-18 พบว่าตะกอนขาวดังกล่าวมีช่วงเวลาที่อยู่ในคอลัมน์เพียงช่วงเดียวและเป็นเวลาเดียวกับแคลเซียมกลูโคเนตมาตรฐาน (รูปที่ 46 และ 47 ตามลำดับ) ขณะที่การวิเคราะห์น้ำตาลในตะกอนขาวด้วยคอลัมน์ Spherisorb-NH_2 ไม่พบน้ำตาลชนิดใด แสดงว่าตะกอนที่เกิดขึ้นเป็นตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตโดยไม่มีน้ำตาลฟรักโทสปน (รูปที่48)

4.2.2 ผลการวิเคราะห์ของเหลวใสสีน้ำตาล

นำของเหลวใสสีน้ำตาลที่แยกตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตออกแล้วมาวิเคราะห์กรดอินทรีย์และน้ำตาลเช่นเดียวกับข้อ 5.2.1 พบว่าการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Zorbax C-8 พบกรดอินทรีย์ชนิดกรดกลูโคนิกในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เล็กน้อยซึ่งคำนวณได้เท่ากับ 10.98 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 49) ขณะที่การวิเคราะห์น้ำตาลด้วยคอลัมน์ Spherisorb-NH_2 พบน้ำตาลฟรักโทสเพียงชนิดเดียว (รูปที่ 50)



(ก)



(ข)

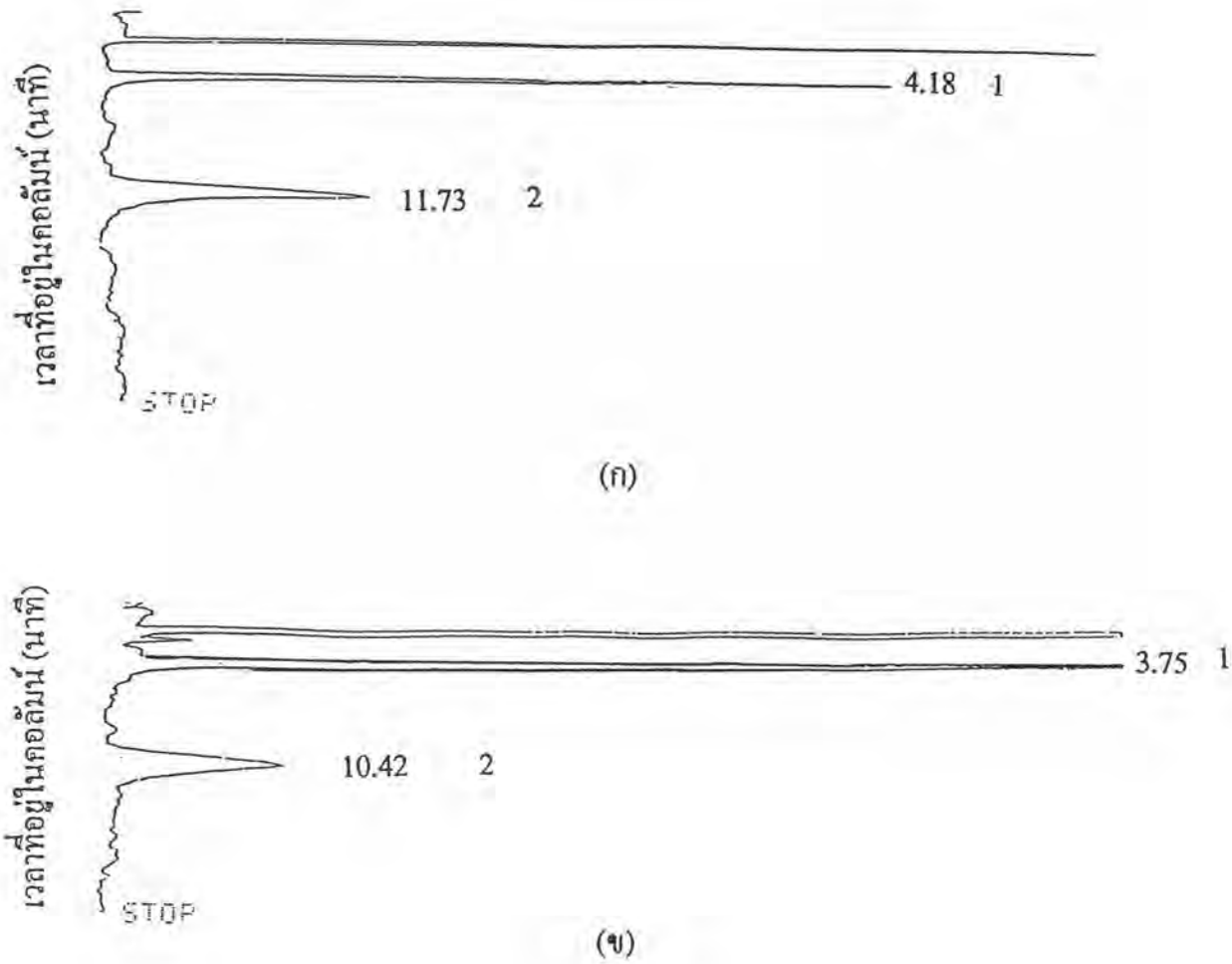
รูปที่ 44 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ในน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 และกรดกลูโคนิกมาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Zorbox C-8

(ก) กรดกลูโคนิกมาตรฐานผสมกับกรดอิทาโคนิกมาตรฐาน ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน

(ข) กรดอินทรีย์ที่ผลิตโดย *A. niger* G153 ผสมกับกรดอิทาโคนิกมาตรฐาน

1 หมายถึง กรดกลูโคนิก

2 หมายถึง กรดอิทาโคนิก (สารมาตรฐานภายใน)



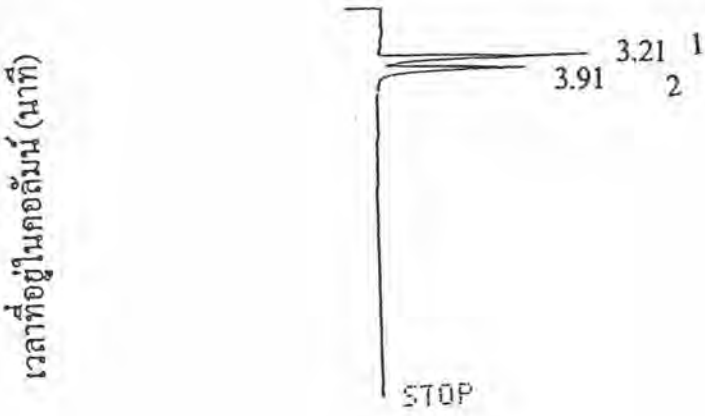
รูปที่ 45 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* G153 และน้ำตาลฟรักโทสมาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Sphensorb-NH_2

(ก) น้ำตาลฟรักโทสมาตรฐาน และแลกโทสมาตรฐาน ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน

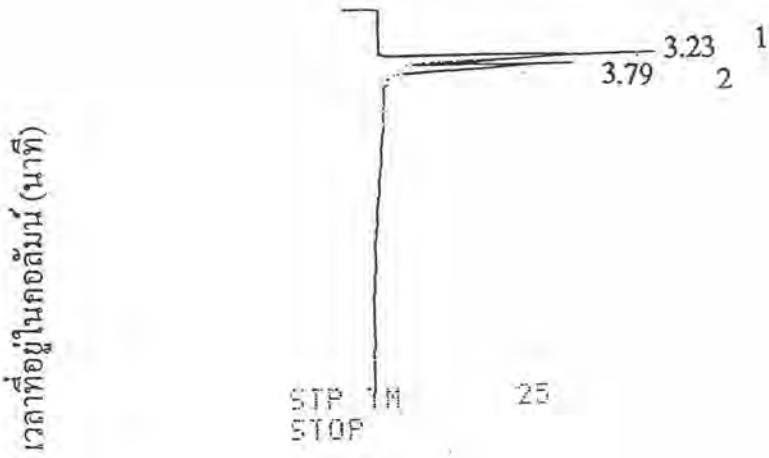
(ข) น้ำตาลในน้ำหมัก (ณ ชั่วโมงที่สิ้นสุดการทดลอง) ที่ผลิตขึ้นโดย *A. niger* G153 ผสมกับน้ำตาลแลกโทสมาตรฐาน

1 หมายถึง น้ำตาลฟรักโทส

2 หมายถึง น้ำตาลแลกโทส (สารมาตรฐานภายใน)



(ก)



(ข)

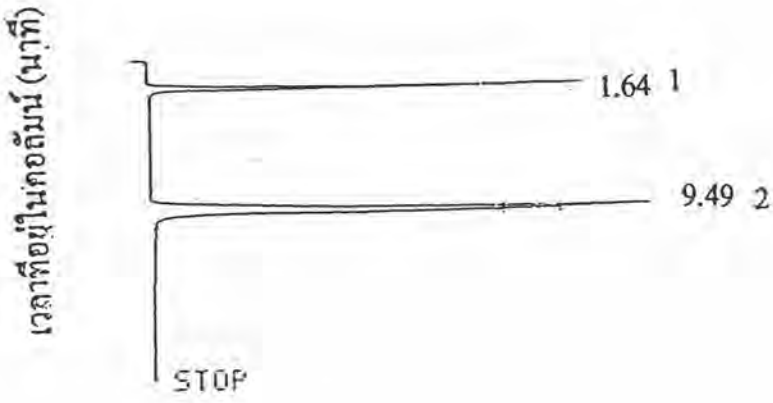
รูปที่ 46 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์จากตะกอนขาวที่แยกจากส่วนของเหลวใสและผ่านการล้าง 4 ครั้ง (จากรูปที่ 43 ค) และกรดกลูโคนิกมาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Zorbox C-8

(ก) กรดกลูโคนิกมาตรฐานผสมกับกรดอิทาโคนิกมาตรฐาน ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน

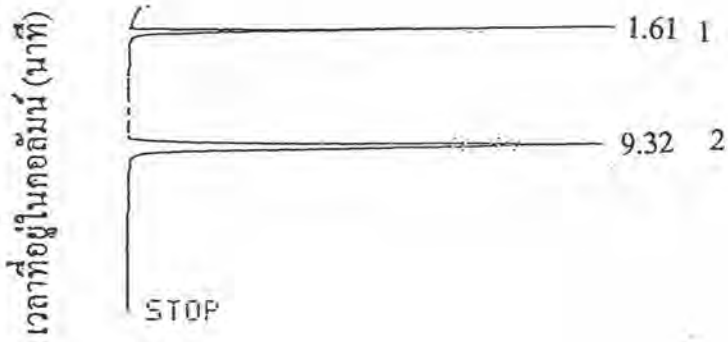
(ข) กรดอินทรีย์จากตะกอนขาวที่แยกจากส่วนของเหลวผสมกับกรดอิทาโคนิกมาตรฐาน

1 หมายถึง กรดกลูโคนิก

2 หมายถึง กรดอิทาโคนิก (สารมาตรฐานภายใน)



(ก)



(ข)

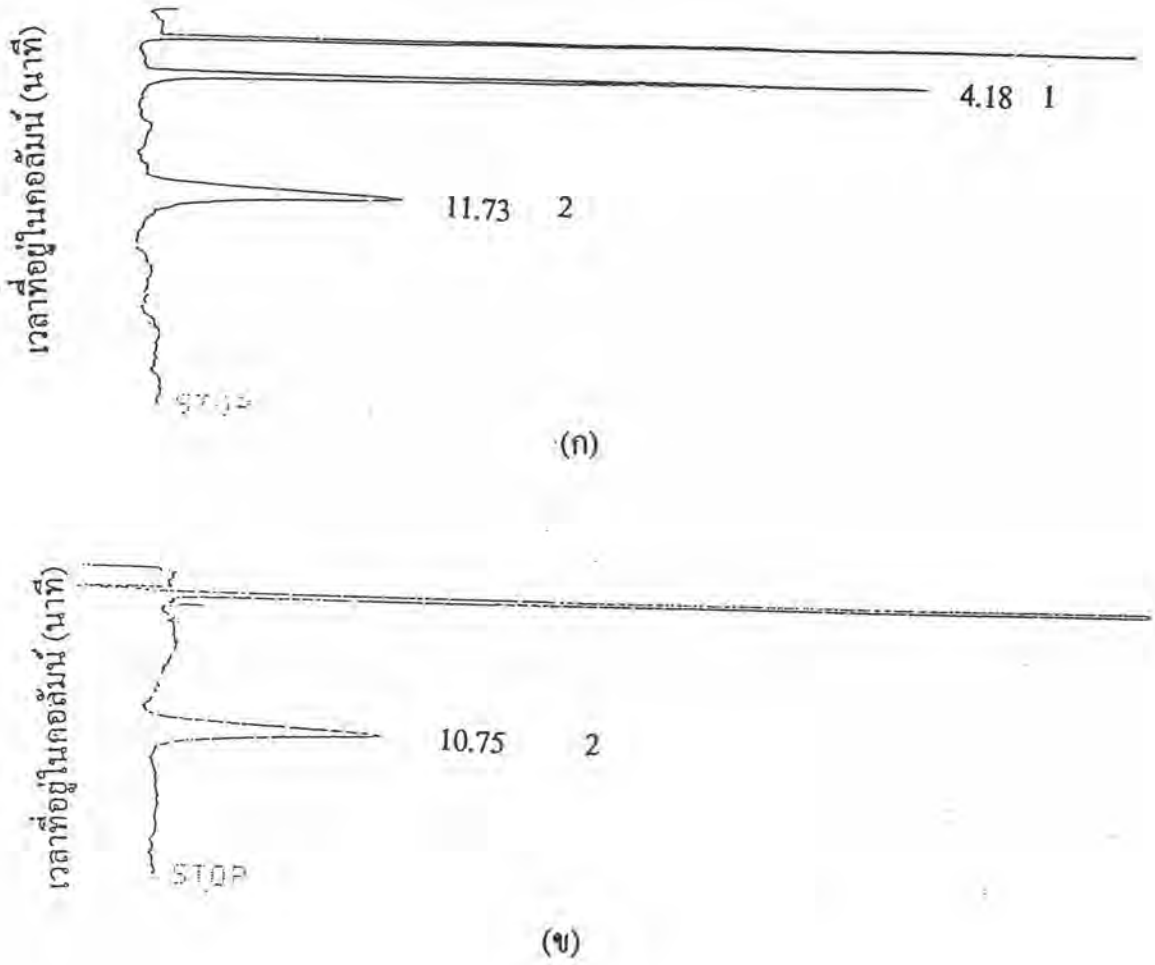
รูปที่ 47 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์จากตะกอนขาวที่แยกจากส่วนของเหลวใสและผ่านการล้าง 4 ครั้ง (จากรูปที่ 43 ค) และกรดกลูโคนิกมาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb C-18

(ก) กรดกลูโคนิกมาตรฐานผสมกับกรดอิทาโคนิกมาตรฐาน ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน

(ข) กรดอินทรีย์จากตะกอนขาวที่แยกจากส่วนของเหลวใส ผสมกับกรดอิทาโคนิกมาตรฐาน

1 หมายถึง กรดกลูโคนิก

2 หมายถึง กรดอิทาโคนิก (สารมาตรฐานภายใน)



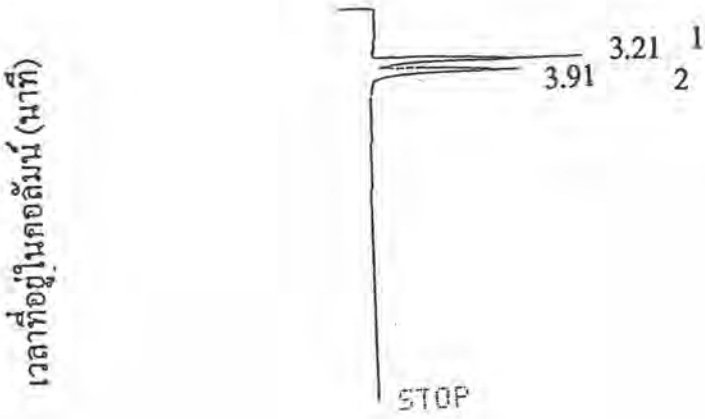
รูปที่ 48 โครมาโตแกรมของน้ำตาลจากตะกอนขาวที่แยกจากส่วนของเหลวใสและผ่านการล้าง 4 ครั้ง (จากรูปที่ 43 ค) และน้ำตาลฟรักโทสมาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Sphensorb-NH_2

(ก) น้ำตาลฟรักโทสมาตรฐาน และแลกโทสมาตรฐาน ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน

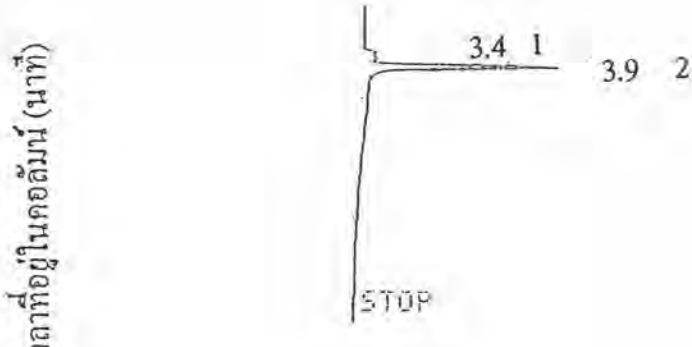
(ข) น้ำตาลจากตะกอนขาวที่แยกจากส่วนของเหลวใส ผสมกับน้ำตาลแลกโทสมาตรฐาน

1 หมายถึง น้ำตาลฟรักโทส

2 หมายถึง น้ำตาลแลกโทส (สารมาตรฐานภายใน)



(ก)



(ข)

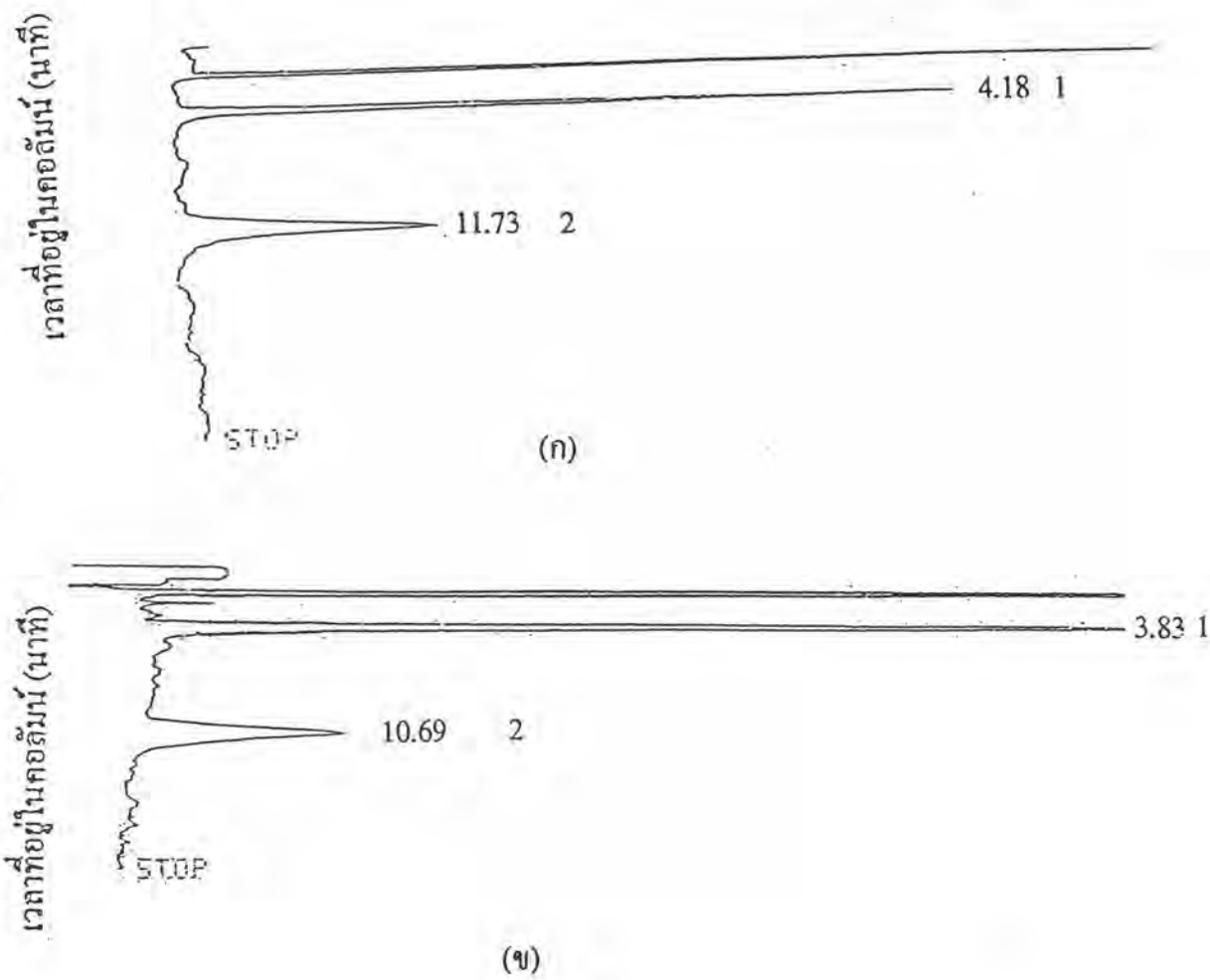
รูปที่ 49 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์จากของเหลวใสที่แยกตะกอนออกแล้ว และกรดกลูโคนิกมาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Zorbox C-8

(ก) กรดกลูโคนิกมาตรฐานผสมกับกรดอิทาโคนิกมาตรฐาน ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน

(ข) กรดอินทรีย์จากของเหลวใสที่แยกตะกอนออกแล้ว ผสมกับกรดอิทาโคนิกมาตรฐาน

1 หมายถึง กรดกลูโคนิก

2 หมายถึง กรดอิทาโคนิก (สารมาตรฐานภายใน)



รูปที่ 50 โครมาโตแกรมของน้ำตาลจากของเหลวใสที่แยกตะกอนออกแล้ว และน้ำตาลฟรักโทสมาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Sphensorb-NH_2

(ก) น้ำตาลฟรักโทสมาตรฐาน และแลกโทสมาตรฐาน ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน

(ข) น้ำตาลจากส่วนของเหลวใสที่แยกตะกอนออกแล้ว ผสมกับน้ำตาลแลกโทสมาตรฐาน

1 หมายถึง น้ำตาลฟรักโทส

2 หมายถึง น้ำตาลแลกโทส (สารมาตรฐานภายใน)

จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงดังกล่าวในข้อ 4-5 แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดกลูโคนิกโดยมี น้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วมเป็นสิ่งที่ทำได้โดยไม่พบกรดอินทรีย์ชนิดอื่นหรือน้ำตาลชนิดอื่นปนในผลิตภัณฑ์หลังการเก็บเกี่ยว และสามารถแยกผลิตภัณฑ์หนึ่งออกจากอีกผลิตภัณฑ์หนึ่งได้ง่าย นอกจานี้หลังการแยกแคลเซียมกลูโคเนตออกจากฟรักโทส พบว่าสามารถทำแคลเซียมกลูโคเนตให้ปราศจากการปนของฟรักโทสได้โดยง่าย และฟรักโทสที่แยกได้ก็มีแคลเซียมกลูโคเนตปนเพียงเล็กน้อย