บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

1. ชนิดของ PUF ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงสายใยของ *Aspergillus niger* G153 เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก คือ ชนิดโครงสร้างเปิด ความหนาแน่นสูง ขนาดชิ้น 0.25 เซนติเมตร

2. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงสายใยของ *Aspergillus niger* G153 ใน PUF คือ ใช้สปอร์ความหนาแน่น 1.0-2.5 X 10^8 สปอร์ต่อ PUF 1 กรัม เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก (ภาคผนวก ก 2) นาน 40 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

3. ไม่ต้องมีการเติมแหล่งไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกด้วยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153

4. ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิก ในระดับขวดเขย่า คือ 250 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. เมื่อทำการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขยายส่วน ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ซึ่งมีปริมาตรการใช้งาน 500 มิลลิลิตร พบว่าไม่สามารถผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นสูงกว่า 50 กรัมต่อลิตรได้ เนื่องจากเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตปริมาณมาก รบกวนการผลิต

6. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขยายส่วน ด้วยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศทางด้านล่าง คือ ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลเสต 50 กรัมต่อลิตร ใช้ PUF ขนาดชิ้น 0.25 เซนติเมตร จัดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 9 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที โดยใช้ PUF ที่มีสายใยตรึงหนัก 200 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต ได้ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุด 53.80 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ของการผลิต

7. เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยที่ตรึงใน PUF และในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าไม่แตกต่างกันมากนัก คือ ให้ปริมาณกรดกลูโคนิกใกล้เคียงกัน กล่าวคือ เมื่อใช้ PUF ที่มีสายใยตรึงหนัก 200 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้เวลาผลิต 24 ชั่วโมง สำหรับการ

ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตใช้เม็ดเจลสายใยตรึงหนัก 300 กรัมต่อลิตรอาหาร ใช้เวลาในการผลิต 18 ชั่วโมง

8. การผลิตกรดกลูโคนิกซ้ำด้วยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม โดยใช้แป้งไฮโดรไลเสตที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สามารถผลิตกรดโดยใช้สายใยตรึงซ้ำได้รวม 12 ครั้ง โดยปริมาณกรดสูงสุดลดลงเล็กน้อย ได้ปริมาณกรดสูงสุด 53.8-45.5 กรัมต่อลิตร ในเวลา 24 ชั่วโมง

9. เมื่อตรวจการเจริญของสายใยตรึง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่าสายใยเติบโตอยู่เพียงบริเวณผิว และลึกลงไปจากระดับผิวหน้าของชิ้น PUF ลงไปเพียงเล็กน้อย มิได้เจริญทั่วทั้งชิ้น วัสดุตรึง

10. เมื่อเก็บชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึงเจริญอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าประสิทธิภาพในการผลิตไม่ลดลง

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองหาชนิดของ PUF ที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์ พบว่า ชนิดของ PUF ที่เหมาะสม คือ ชนิดโครงสร้างเปิด ทั้งนี้เนื่องจาก PUF ชนิดโครงสร้างเปิดเป็น PUF ที่มีโพรงของเซลต่อถึงกัน (บรรเลง ศรานิล, 2535) ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อ และสปอร์ของราสามารถผ่านเข้าทั่วถึงทั้งชิ้น PUF ได้ และเมื่อสปอร์งอกเป็นสายใยก็จะถูกตรึงอยู่ภายในชิ้น PUF ส่วน PUF ชนิดโครงสร้างปิด มีโครงสร้างเป็นเซลที่ไม่ต่อถึงกัน (บรรเลง ศรานิล, 2535) อาหารเลี้ยงเชื้อ และสปอร์ของราไม่สามารถเข้าไปภายในชิ้น PUF ได้ ดังนั้นสปอร์ของราจะติดอยู่เพียงบริเวณผิวของชิ้น PUF ส่วนภายในยังคงมีแต่เนื้อโฟมเปล่า ๆ ทำให้สปอร์ส่วนที่เหลือเจริญเป็นสายใยอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ PUF ชนิดโครงสร้างปิดเมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลอยไม่จมลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเหมือน PUF โครงสร้างเปิด เนื่องจากมีฟองอากาศ อยู่ภายในชิ้น PUF อาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถเข้าไปแทนที่อากาศภายในได้ ดังนั้น PUF ชนิดโครงสร้างปิดจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรึงสายใยเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก

ความหนาแน่นของ PUF ก็เป็นส่วนสำคัญอีกอย่างหนึ่งในการ คัดเลือกชนิด PUF เพื่อนำมาใช้ในการตรึงสายใยเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก PUF ความหนาแน่นต่ำจะมีน้ำหนักต่อปริมาตรน้อยกว่า PUF ความหนาแน่นสูง กล่าวคือ PUF ชนิดความหนาแน่นต่ำมีเส้นใยของ PUF เชื่อมกันอย่างหลวม ๆ เมื่อนำมาทำการตรึงสปอร์เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกแล้วผ่านการเขย่าบนเครื่องเขย่า พบว่าเส้นใยของ PUF ฉีกขาด สปอร์และสายใยจึงหลุดออกมา ทำให้เกิดสายใยอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนมาก ส่วน PUF ความหนาแน่นสูงมีความทนทานต่อการ

เขย่ามากกว่า ไม่พบการฉีกขาด เนื่องจากเส้นใยของ PUF ต่อปริมาณมีมากกว่าจึงเชื่อมกันได้แน่นหนากว่า ทำให้ทนทานต่อการเขย่าบนเครื่องเขย่าได้ดีกว่า จึงสามารถนำมาใช้ในการตรึงสายใยเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกได้ดีกว่า PUF ความหนาแน่นต่ำ

ขนาดชิ้นของวัสดุตรึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิก จากการทดลองพบว่าวัสดุตรึงที่มีขนาดเล็กกว่าจะให้ปริมาณกรดกลูโคนิกที่สูง และเร็วกว่า วัสดุตรึงที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนัก หรือปริมาตรต่าง ๆ กัน วัสดุขนาดใหญ่จะมีพื้นที่ผิวน้อยกว่าวัสดุที่มีขนาดเล็ก นอกจากนี้วัสดุตรึงขนาดเล็กก็มีความลึกน้อยกว่าด้วยจึงทำให้มีการส่งผ่านออกซิเจน และอาหารได้มากกว่าวัสดุตรึงที่มีขนาดใหญ่ ดังแสดงในรูปที่ 3 พบว่าปริมาณกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่า จาก PUF ขนาดชิ้น 0.6 และ 0.8 เซนติเมตร ต่างกันคือ PUF ขนาดชิ้น 0.6 เซนติเมตร ให้ปริมาณกรดกลูโคนิก 138.5 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการผลิต ซึ่งสูงกว่า PUF ขนาดชิ้น 0.8 เซนติเมตร ซึ่งให้ปริมาณกรด กลูโคนิก 133.0 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการผลิต และเมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิตกรดกลูโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ระหว่าง PUF ขนาดชิ้น 0.6 และ 0.25 เซนติเมตร พบว่า PUF ขนาดชิ้น 0.25 เซนติเมตร ให้ปริมาณกรดสูง และเร็วกว่า PUF ขนาดชิ้น 0.6 เซนติเมตร คือให้ปริมาณ 45.6 และ 49.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 7) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Vassilev และคณะ (1983) ที่ทำการทดลองเปรียบเทียบขนาดชิ้น ของ PUF ขนาด 1 และ 0.3 เซนติเมตร พบว่า PUF ขนาด 1 เซนติเมตร ให้ปริมาณกรดน้อยกว่า PUF ขนาดชิ้น 0.3 เซนติเมตร นอกจากนี้ Tramper และคณะ (1983) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยเซลล์ตรึงของ *Gluconobacter oxydans* ในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าเม็ดเจลที่มีขนาดใหญ่ จะมีกิจกรรม (activity) ของเซลล์ตรึงน้อยกว่า เม็ดเจลที่มีขนาดเล็ก และสอดคล้องกับการทดลองของ กุลธิรา สู่สุข (2538) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกด้วยวิธีตรึงสายใยในแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้สายพันธุ์ *Aspergillus niger* G153 ที่ใช้ในการทดลองนี้ พบว่าเม็ดเจลที่มีขนาดเล็กจะให้ปริมาณกรดสูง และเร็วกว่าเม็ดเจลที่มีขนาดใหญ่ เช่นกัน

ความหนาแน่นของสปอร์ตรึง เป็นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสายใยตรึง จากการแปรผันความหนาแน่นของสปอร์เป็น 1.0-2.5 X 10^7 1.0-2.5 X 10^8 และ 1.0-2.5 X 10^9 สปอร์ต่อ PUF 1 กรัม พบว่าความหนาแน่นสปอร์ 1.0-2.5 X 10^8 สปอร์ต่อ PUF 1 กรัม ให้ปริมาณกรดสูงสุด 138.58 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการผลิต ซึ่งสูงกว่าที่ความหนาแน่นสปอร์ 1.0-2.5 X 10^9 เล็กน้อย (รูปที่ 4) แต่เมื่อใช้สปอร์ความหนาแน่น 1.0-2.5 X 10^7 สปอร์ พบว่าให้ปริมาณกรดต่ำกว่า ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากปริมาณสปอร์ที่น้อยเกินไป จะให้ปริมาณสายใยตรึงที่น้อยเกินไปทำให้การผลิตกรดช้ากว่าปริมาณสปอร์ที่เหมาะสม ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองของ Vassilev และคณะ (1993) ซึ่งพบว่าถ้าใช้ปริมาณสปอร์ตั้งต้นสูงเกินไป หรือ

ต่ำเกินไปจะให้ปริมาณกรดกลูโคนิกต่ำกว่าปริมาณสปอร์ที่พอเหมาะ อย่างไรก็ตามเมื่อคำนึงถึงความยุ่งยากของการเตรียมสปอร์จำนวนมาก และความประหยัดทั้งแรงงาน และเวลาจะเห็นได้ว่า สปอร์จำนวน 1.0-2.5 X 10^8 เหมาะสมที่สุด

จากผลการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึง เพื่อให้ได้สายใยตรึงประสิทธิภาพสูง พบว่า ช่วงเวลาเหมาะสมที่ให้ปริมาณกรดสูงสุด และรวดเร็ว คือ 40 และ 48 ชั่วโมง ส่วนช่วงเวลา 24 และ 32 ชั่วโมง จะให้ปริมาณกรดต่ำและช้ากว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายใยตรึงที่ได้มีมีปริมาณน้อยกว่า การเจริญเติบโตของสายใยตรึงยังไม่เต็มที่ ทำให้ระบบเอนไซม์ต่าง ๆ ภายในสายใยยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้นปริมาณกรดจึงได้จากสายใยที่น้อยกว่าที่ควร ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Chantarasa-ard และ Kinoshita (1994) ซึ่งได้ศึกษาผลของอายุกล้าเชื้อของสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในพอลิยูรีเทนโฟมต่อการผลิตกรดกลูโคนิก โดยเปรียบเทียบกล้าเชื้ออายุ 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่ากล้าเชื้อสายใยตรึงอายุ 48 ชั่วโมงให้ปริมาณกรดสูง และเร็วกว่า คือให้ปริมาณกรดสูงสุด 99 กรัมต่อลิตรในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองนี้เมื่อคำนึงถึงความคุ้มค่าและการประหยัดทั้งพลังงาน แรงงาน และอื่น ๆ จึงกล่าวได้ว่าสายใยตรึงอายุ 40 ชั่วโมง เป็นอายุที่เหมาะสมที่สุด จะเห็นได้ว่าสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ใด ๆ ก็ตามด้วยสายใยตรึง ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน อายุของกล้าเชื้อมีความสำคัญอย่างยิ่ง ต้องจัดให้เหมาะสมเพื่อให้ได้สายใยที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเสียก่อน จึงนำมาผลิต

การทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่า พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในการผลิต คือ 250 กรัมต่อลิตร โดยให้ปริมาณกรด 240.5 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการผลิต พบตะกอนของแคลเซียมกลูโคเนตในช่วงท้าย ๆ ของการผลิตแต่ยังดำเนินการผลิตได้ เนื่องจากการเขย่าแรง ส่วนการทดลองในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างซึ่งไม่มีการกวน ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว 250 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตรบกวนการผลิต เมื่อลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วเหลือ 150 และ 100 กรัมต่อลิตร ก็ไม่สามารถใช้ได้ ด้วยเหตุผลเดียวกัน แต่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วสูงสุดได้ 50 กรัมต่อลิตรในการผลิต ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากการผลิต กรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่ามีการเขย่าอย่างรุนแรงทำให้ยังคงมีการผสมผสานระหว่างอาหารและอากาศได้ แม้มีตะกอนเกิดขึ้น แต่ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง มีเพียงการให้อากาศเป็นฟองเล็ก ๆ เท่านั้น แตกต่างจากการผลิตในถังหมักที่มีการปั่นกวนด้วย ใบพัด ทำให้การสัมผัสอาหารและอากาศของจุลินทรีย์ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ กุลธิรา สู่สุข (2538) ที่พบว่าเมื่อทำการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ในรูปแคลเซียมกลูโคเนต ปริมาณ

น้ำตาลกลูโคสตั้งต้นที่สามารถผลิตกรดได้โดยไม่มีตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตรบกวนการผลิต คือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งปัญหานี้จะแก้ไขได้โดยผลิตกรดในรูปโซเดียมกลูโคเนต เนื่องจากโซเดียมกลูโคเนตสามารถละลายน้ำได้สูงสุดถึง 590 กรัมต่อลิตร แต่การผลิตในรูปโซเดียม ต้องใช้เครื่องควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วง 6.0-6.5 เนื่องจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ทำให้ต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายสำหรับเครื่องควบคุมดังกล่าว Vassilev และคณะ (1993) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงใน PUF ในรูปโซเดียมกลูโคเนตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง สามารถทำการผลิตโดยใช้ น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตรในการผลิตได้

สำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 จากผลการทดลองในระดับขวดเขย่า พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอกเป็นสายใยตรึงจะต้องมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงไม่จำเป็นต้องมีแหล่งไนโตรเจน ถ้ามีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกจะมีผลทำให้เกิดสายใยอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสายใยอิสระจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อสิ้นสุดการผลิตพบว่าชิ้นวัสดุตรึงรวมกันเป็นก้อนโตไม่สามารถนำไปผลิตซ้ำได้ นอกจากนี้ถ้าทำการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง สายใยอิสระจะทำให้เกิดการอุดตันของที่ให้อากาศและมีการรวมตัวกันของชิ้น PUF เป็นชิ้นใหญ่ทำให้เป็นปัญหาต่อการให้อากาศ มีผลต่อเนื่องถึงการกรองแยกสายใยตรึงออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก ทำให้ต้องเพิ่มต้นทุนเพื่อการกรองในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้การผลิตโดยสายใยตรึงซึ่งไม่ต้องมีการเติมแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต ยังมีข้อดี คือ ลดต้นทุนในการผลิต และผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังมีความบริสุทธิ์สูง การทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Moresi และคณะ (1991) และ Vassilev และคณะ (1993) ซึ่งได้รายงานว่า การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึง ไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต

การผลิตกรดกลูโคนิกเป็นปฏิกริยาออกซิเดชันของน้ำตาล ดังนั้นปริมาณออกซิเจนจึงมีผลโดยตรงต่อการผลิตกรดชนิดนี้ ถ้าให้ปริมาณออกซิเจนมากเพียงพอจะให้ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงและรวดเร็ว (Kubicek, Witteveen and Visser, 1994) ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 5 7 9 และ 11 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เพื่อหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม ให้ปริมาณกรดสูงสุด โดยใช้น้ำหนักเปียกของ PUF ที่มีสายใยตรึง 100 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ผลการทดลองพบว่าถ้าเพิ่มอัตราการให้อากาศจะทำให้ได้ปริมาณสูงขึ้น แต่การเพิ่มก็มีปริมาณจำกัดอยู่ค่าหนึ่ง ถ้ามากกว่านั้นปริมาณจะไม่เพิ่มขึ้น กล่าวคือ พบว่าอัตราการให้อากาศ 9 และ 11 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้ปริมาณ

กรดกลูโคนิกสูงกว่า 5 และ 7 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที และให้ปริมาณกรดสูงสุดใกล้เคียงกัน คือ ให้ปริมาณกรด 54.20 และ 54.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในเวลา 30 ชั่วโมง (รูปที่ 9) ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม้จะเพิ่มอัตราการให้อากาศมากกว่า 9 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ก็ไม่สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นไปได้อีก จึงสันนิษฐานได้ว่า อัตราการให้อากาศ 9 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เป็นปริมาณเหมาะสมที่จะทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายมากและทั่วถึง ทำให้มีการผลิตกรดได้สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ กุลธิรา สู่สุข (2538) ซึ่งพบว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต ในระดับคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 5.5 เซนติเมตร ความสูงของคอลัมน์ 30 เซนติเมตร ปริมาตรการใช้งาน 400 มิลลิลิตร คือ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ซึ่งแม้ว่าจะให้มากกว่านี้ก็จะไม่เพิ่มปริมาณ และสอดคล้องกับการทดลองของ Sakurai และคณะ (1989) ที่ว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศ ปริมาณกรดกลูโคนิกจะเพิ่มขึ้นด้วย แต่การเพิ่มก็มีขีดจำกัด ถ้ามากกว่านั้นผลผลิตจะไม่เพิ่มขึ้น และ Vassilev และคณะ (1993) ได้ทำการทดลองผลิตกรดกลูโคนิกด้วยสายใยตรึงใน PUF ในคอลัมน์ที่มีการให้อากาศด้านล่าง ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4 เซนติเมตร ความสูงของคอลัมน์ 35 เซนติเมตร ปริมาตรการใช้งาน 300 มิลลิลิตร พบว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม ให้ปริมาณกรดกลูโคนิกมากที่สุด คือ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

ต่อมาเมื่อเพิ่ม PUF ที่มีสายใยตรึงเป็น 200 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดเร็วกว่า 100 กรัมต่อลิตร แต่เนื่องจากปริมาณ PUF ที่มีสายใยตรึงที่มากขึ้น อาจจะต้องการปริมาณออกซิเจนที่มากขึ้นด้วย ดังนั้นจึงทดลองเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 11 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที พบว่าการให้อากาศเพิ่มขึ้นไม่สามารถทำให้ปริมาณกรดได้เร็วกว่านี้ อาจเป็นได้ว่าอัตราการให้อากาศ 9 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงพอต่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้ PUF ที่มีสายใยตรึง 200 กรัมต่อลิตร ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 6.5 เซนติเมตร ความสูงของคอลัมน์ 40 เซนติเมตร ปริมาตรการใช้งาน 500 มิลลิลิตร (รูปที่ 9)

เมื่อทำการแปรผันปริมาณ PUF ที่มีสายใยตรึง พบว่าปริมาณที่มากกว่า คือ 200 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จะให้ปริมาณกรดกลูโคนิกเร็วกว่าการใช้ PUF ที่มีสายใยตรึงหนัก 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากปริมาณ PUF ที่มีสายใยตรึงที่มากกว่าย่อมให้ปริมาณสายใยตรึงที่มากกว่าด้วย ดังนั้นการผลิตกรดจึงใช้เวลาน้อยกว่า ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ กุลธิรา สู่สุข (2538) พบว่าปริมาณหัวเชื้อสายใยตรึงที่พอเหมาะ จะให้ปริมาณกรดปริมาณสูง และรวดเร็ว

จะเห็นได้ว่าทุกการทดลองใช้อัตราการให้อากาศสูงมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจากส่วนที่ให้อากาศออกของคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ มีลักษณะที่ไม่เหมาะสม คือ ใช้สำลีซึ่งคลุมด้วยผ้าขาวบางปิดด้านบนของคอลัมน์ ทำให้อากาศกระจายตัวออกจากคอลัมน์อย่างรวดเร็ว อากาศมีเวลาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อย ทำให้การละลายของออกซิเจนน้อย จึงต้องใช้อัตราการให้อากาศที่สูงขึ้น ดังนั้นจึงมีข้อเสนอแนะว่าควรใช้จุกยางที่มีท่ออากาศเล็ก ๆ ปิดคอลัมน์แทน จะทำให้แรงดันในคอลัมน์สูงขึ้น และอากาศถูกกักอยู่ในคอลัมน์ได้นานขึ้น ทำให้ออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้นด้วย

จากการทดลองนี้ ถ้าเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิกที่ได้จากการผลิตโดยสายใยตรึงใน PUF และ แคลเซียมอัลจิเนตซึ่งทดลองโดย กุลธิรา สู่สุข (2538) พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสปอร์ที่ตรึงใน PUF เพื่อให้ได้สายใยตรึงที่มีประสิทธิภาพสูง ใช้เวลา 40 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงสปอร์ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตที่ใช้เวลาถึง 60 ชั่วโมง ที่เป็นเช่นนี้เพราะในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ที่ตรึงใน PUF งอกมีแอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหารทำให้สปอร์งอกสำหรับสายใยตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตจำเป็นต้องลดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลงเหลือ 0.8 กรัมต่อลิตร เพราะจากปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มากเกินไปจะทำให้มีสายใยอิสระเกิดขึ้น ทำให้การตรึงสายใยใน PUF ใช้เวลาในการเตรียมหัวเชื้อน้อยกว่าการตรึงสายใยในแคลเซียมอัลจิเนต อีกประการหนึ่ง PUF มีรูพรุนที่กว้างกว่าแคลเซียมอัลจิเนตมาก เพราะฉะนั้นอาหารและอากาศเข้าออกได้รวดเร็วและสะดวกกว่า ดังนั้นสปอร์ตรึงจึงงอก และเจริญเป็นสายใยตรึงที่มีประสิทธิภาพได้เร็วกว่า เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ระหว่างสายใยที่ตรึงใน PUF กับแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าสายใยตรึงที่ในแคลเซียมอัลจิเนตใช้น้ำหนักเจลสายใยตรึงมากกว่า คือ 300 กรัมต่อลิตร แต่ใช้เวลาในการผลิตน้อยกว่า คือ 18 ชั่วโมง ให้ปริมาณกรด 54.0 กรัมต่อลิตรในขณะที่สายใยตรึงใน PUF ใช้น้ำหนัก PUF ที่มีสายใยตรึง 200 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการผลิต 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณกรด 53.8 กรัมต่อลิตร ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะของ PUF เป็นรูปสี่เหลี่ยมจึงอัดตัวลงในคอลัมน์แก้วได้น้อยกว่า จึงทำให้บรรจุ PUF ที่มีสายใยตรึงในคอลัมน์แก้วได้น้อยกว่าเม็ดเจลสายใยตรึง นั่นคือ มีสายใยตรึงน้อยกว่า ทำให้ใช้เวลาในการผลิตมากกว่า ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงในวัสดุตรึงทั้งสองชนิด ให้ปริมาณไม่แตกต่างกันมากนัก แต่การใช้ PUF ทำให้ขั้นตอนการตรึงลดลง ง่ายขึ้น และมีราคาถูกกว่าการตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตมาก

เมื่อทดลองผลิตกรดกลูโคนิกซ้ำ (รูปที่ 13) พบว่าเมื่อใช้สายใยตรึงซ้ำเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกจำนวน 12 ซ้ำ ปริมาณกรดสูงสุดลดลงเล็กน้อยหลังจากซ้ำที่ 3 ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากในซ้ำหลัง ๆ มีแคลเซียมคาร์บอเนตเข้าไปอุดตันในช่องว่างของ PUF บ้างเล็กน้อยทำให้

การสัมผัสอากาศและอาหารของสายใยไม่ทั่วถึงเท่าซ้ำแรก ๆ จึงมีข้อเสนอแนะว่าควรที่จะแบ่งการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นหลาย ๆ ส่วน แล้วค่อย ๆ เติมลงทีละน้อย ซึ่งอาจแก้ปัญหาได้อันจะส่งผลให้ปริมาณกรดในซ้ำหลังสูงขึ้นเท่า ๆ กับซ้ำแรก ๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ กุลธิรา สู่สุข (2538) ซึ่งทำการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าสามารถทำการผลิตซ้ำได้ถึง 10 ครั้ง โดยปริมาณไล่เลี่ยกัน และผลการทดลองของ Vassilev และคณะ (1993) ที่ทดลองปริมาณกรดกลูโคนิกโดยสายใยของ *Aspergillus niger* ที่ตรึงใน PUF พบว่าสามารถทำการผลิตกรดกลูโคนิกได้ 5 ครั้ง โดยปริมาณลดลงเล็กน้อย การผลิตกรดกลูโคนิกโดยวิธีการตรึงสายใยจะทำให้สามารถผลิตโดยใช้สายใยซ้ำได้นานกว่า ซึ่งการทดลองของ Sukurai และคณะ (1989) ได้ทดลองเปรียบเทียบวิธีการผลิตโดยสายใยตรึง และสายใยอิสระ พบว่าสายใยที่ตรึงบนผ้าที่ทอด้วยเส้นใยสังเคราะห์กับเส้นใยธรรมชาติ สามารถนำมาทำการผลิตซ้ำได้ถึง 14 ซ้ำโดยปริมาณไม่ลดลง ในขณะที่สายใยอิสระสามารถนำมาซ้ำได้เพียง 4 ครั้ง หลังจากนั้นปริมาณก็ลดลง

เมื่อวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดยสายใยตรึงของ*Aspergillus niger* G153 โดยเครื่อง HPLC พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์สูงเป็นกรดกลูโคนิกเพียงชนิดเดียว ไม่ว่าจะตรวจสอบด้วย Zorbox-C8 คอลัมน์ หรือ Spherisorb-C18 คอลัมน์ ผลการทดลองนี้เป็นเครื่องยืนยันว่า *Aspergillus niger* G153 สายพันธุ์ดังกล่าวผลิตกรดกลูโคนิกชนิดเดียว

เมื่อตรวจสอบสายใยตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่าสายใยตรึงจะมีการเจริญอยู่บริเวณผิวของชิ้นวัสดุตรึงและลึกลงไปในชิ้นวัสดุตรึงในระดับหนึ่งเท่านั้น คือ ลึกไม่เกิน 0.80 มิลลิเมตร จากผิววัสดุตรึง ซึ่งอาจเนื่องมาจากบริเวณที่ลึกลงไปจากผิววัสดุตรึงออกซิเจนไม่สามารถผ่านเข้าไปถึงภายในได้ เนื่องจากบริเวณผิวมีการเจริญของสายใยจำนวนมากจึงอุดตันรูของวัสดุตรึง อีกประการหนึ่งออกซิเจนอาจถูกใช้จนหมด เมื่อผ่านเข้ามาบริเวณนี้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tramper และคณะ (1983) Eikmeier และคณะ (1984) Kopp และ Rehm (1987) และ กุลธิรา สู่สุข (2538) ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ที่ตรึงในวัสดุตรึงจะมีการเจริญอยู่บริเวณผิววัสดุตรึง และลึกลงไปจากผิววัสดุตรึงเพียงระดับหนึ่งเท่านั้น ชั้นของสายใยใน PUF ที่มีกล้าเชื้อสายใยตรึง มีความหนาของชั้นการเจริญน้อยกว่า PUF ที่มีสายใยตรึงซึ่งผ่านการผลิต 1 ซ้ำ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากมีแหล่งไนโตรเจนสะสมอยู่ในสายใยบ้างเล็กน้อย ราจึงใช้ในการเจริญต่อในกระบวนการผลิต อีกประการหนึ่ง PUF มีลักษณะที่อุ้มน้ำ ดังนั้นเมื่อทำการชะล้าง PUF ที่มีหัวเชื้อสายใยตรึงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2-3 ครั้ง อาจล้างแหล่งไนโตรเจนได้ไม่หมด ทำให้ยังคงมีแหล่งไนโตรเจนจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกเหลืออยู่ในชิ้น PUF เล็กน้อย เมื่อนำมาทำการผลิตในซ้ำแรกจึงยังคงมีการเจริญของสายใยอยู่อีกเพียงเล็กน้อย แต่ในการผลิตในซ้ำต่อ ๆ มา

จะไม่มีการเจริญของสายใยอีก สังเกตุได้จาก PUF ที่ผ่านการผลิตในซ้ำที่ 3 ความหนาของชั้นการเจริญใกล้เคียงกับ PUF ที่ผ่านการผลิตในซ้ำแรก นอกจากนี้ยังพบว่าสายใยที่เติบโตภายในชิ้น PUF มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ มีลักษณะเป็นปุมปม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ กุลธิรา สู่สุข (2538) ที่ว่าสายใยของ *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตมีลักษณะที่ผิดปกติ คือ มีลักษณะเป็นปุมปม และ Vassilev และคณะ (1993) พบว่าสายใยของ *Aspergillus niger* ที่ตรึงใน PUF มีผิวของสายใยที่ขรุขระ ต่างจากสายใยอิสระซึ่งมีลักษณะเรียบ ที่เป็นเช่นนี้ สันนิษฐานว่า สายใยที่เติบโตอยู่ข้างในชิ้น PUF อาจอยู่ในภาวะที่ผิดปกติไปจากสายใยที่เจริญอยู่รอบนอก กล่าวคือ ขาดแคลนอาหารและอากาศ จึงเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป ซึ่งข้อสันนิษฐานยังไม่มีรายงานยืนยัน

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตกรดกลูโคนิกของสายใยตรึงไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0 3 5 7 และ 9 วัน ก่อนนำมาทำการผลิตกรดกลูโคนิก พบว่าถ้าเก็บไว้นานกว่า 7 วัน ประสิทธิภาพในการผลิตจะลดลง (รูปที่ 21) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ กุลธิรา สู่สุข (2538) ที่ว่าสามารถเก็บสายใยตรึงได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง ก่อนนำมาผลิตโดยพบว่าสามารถเก็บสายใยที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตได้ 5 วัน โดยประสิทธิภาพการผลิตไม่ลดลง ในขณะที่ จินตนา ไกรวัฒนพงศ์ (2536) ซึ่งได้ทดลองเก็บสายใยอิสระไว้ในเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าสามารถเก็บหัวเชื้อสายใยอิสระที่ 6 องศาเซลเซียส ได้เพียง 3 วัน โดยประสิทธิภาพของหัวเชื้อไม่ลดลง ซึ่งจะเห็นได้ว่าสามารถเก็บสายใยตรึงให้ยังคงประสิทธิภาพเช่นเดิมได้นานกว่าสายใยอิสระแม้จะใช้วัสดุตรึงแตกต่างกัน การที่สามารถเก็บไว้ได้นานกว่า อาจเนื่องมาจากสารพาหะตรึงช่วยป้องกันสายใยตรึงจากสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ และสารเคมีบางอย่าง (Chibata et al., 1978)

จากการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่างานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จอย่างมาก เนื่องจากสามารถหาวัสดุตรึงที่มีราคาถูก หาง่าย ขั้นตอนการตรึงไม่ยุ่งยาก มีความคงทนมาทดแทนวัสดุตรึงราคาแพงได้ โดยปริมาณไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังสามารถใช้สายใยตรึงซ้ำได้หลายครั้งโดยปริมาณกรดลดลงเล็กน้อย แต่ก็พบจุดที่จะแก้ไขให้ปริมาณไล่เลี่ยกันทุก ๆ ซ้ำได้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อง่าย ๆ คือ แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว และน้ำประปาทำให้ต้นทุนที่ใช้ในการผลิตถูก และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง อันอาจเป็นแนวทางในการผลิตในระดับโรงงานต้นแบบต่อไป แต่การผลิตในรูปแคลเซียมกลูโคเนตยังคงมีปัญหาการตกตะกอนของแคลเซียมกลูโคเนตรบกวนการผลิต ทำให้ต้องลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นลง คือ ไม่เกิน 50 กรัมต่อลิตร จึงน่าจะมีการทดลองการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตด้วยสายใยตรึง ซึ่งเกลือโซเดียมมีการละลายได้ดีกว่าเกลือแคลเซียมของกรด

ชนิดนี้ เพื่อตัดปัญหาตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตรบกวนการผลิต อันจะทำให้ได้ปริมาณต่อหนึ่งครั้งมากขึ้น เนื่องจากสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย