การใช้แป้งไฮโดรไลเสสเพื่อผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus* sp. G153

นางสาวบาจรีย์ จันทราภาณุกร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 974-583-061-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019442 i17399600

UTILIZATION OF STARCH HYDROLYSATE FOR GLUCONIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus* sp. G153

Miss. Bajaree Jantrapanukorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillments of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-061-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การใช้แป้งไฮโดรไลเสสเพื่อผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus* sp. G153

โดย นางสาวบาจรีย์ จันทราภาณุกร

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ข่าวิวรรธน์)

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

บาจรีย์ จันทราภาณุกร : การใช้แป้งไฮโดรไลเส่ล่เพื่อผลิตกรดกลูโคนิค โดย *Aspergillus* sp. G153 (UTILIZATION OF STARCH HYDROLYSATE FOR GLUCONIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus* sp. G153) อ.ที่ปรึกษา : รศ.กรรณิกา จันทรล่อาด, 100 หน้า. ISBN 974-583-061-5

การทดลองผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus* sp. G153 ในระดับขวดเขย่า พบว่าไม่ล่ามารถใช้น้ำตาลจากการหมักข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคล่บริสุทธิ์ได้ เนื่องจากให้ผลผลิตกรดต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กลูโคล่บริสุทธิ์ แป้งไฮโดรไลเส่ล่ชนิดที่กรองแล้วและมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคล่เท่ากับ 25% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะล่มเช่นเดียวกับกลูโคล่บริสุทธิ์ กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเส่ล่ที่มีไนโตรเจน 20 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงเช่นเดียวกับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะล่มคือแอมโมเนียมซัลเฟต 0.4% ล่ามารถใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุโดยไม่ต้องเติมเฟอร์รัสซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอล่เฟต และแมงกานีส่ซัลเฟตเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค เมื่อทำการผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะล่มคือ แป้งไฮโดรไลเส่ล่ที่มีน้ำตาลกลูโคล่เข้มข้น 20% ล่ามาวะที่เหมาะล่มในการผลิต ได้แก่ อัตราการให้อากาศ 1.50 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 33°ซ. และปริมาณหัวเชื้อ 7%

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต บาจรีย์ จันทราภาณุกร

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตล่าหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา กรรณิกา จันทรล่อาด

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

C225832 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD: GLUCONIC ACID / STARCH HYDROLYSATE

BAJAREE JANTRAPANUKORN : UTILIZATION OF STARCH HYDROLYSATE FOR GLUCONIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus* sp.G153. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. KANNIKA CHANTARASA-ARD, 100 pp. ISBN 974-583-061-5

Laboratory scale production of gluconic acid by *Aspergillus* sp.G153 shows that sugar from fermented rice can not be used as sources of carbon instead of purified glucose because they give lower yield than purified glucose. Starch hydrolysate filtrate containing 25% glucose is the best carbon source as the same as purified glucose. Soybean hydrolysate containing 20 milligrams nitrogen per 100 milliliters of the culture medium gives the same yield as a suitable nitrogen source, 0.4% ammonium sulphate. It is possible to use tap water instead of deionized water without the addition of ferrous sulphate, magnesium sulphate, potassium dihydrogenphosphate, and manganese sulphate for the gluconic acid production. For 5-l production, the suitable carbon source is starch hydrolysate containing 20% glucose. The optimal conditions for production are 1.50 volume per volume medium per minute aeration rate, 500 rpm. agitation speed, 33°C and 7% inoculum.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณประธานกรรมการ และคณะกรรมการทุกท่าน ที่กรุณาตรวจสอบ และแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ

ขอขอบพระคุณบริษัทอายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อแป้งไฮโดรไลเสสให้ใช้ตลอดการทดลอง

ขอขอบคุณคุณเรืองเดช ชงศรี ที่ช่วยวิเคราะห์จุดหลอมเหลวของสารตัวอย่างด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดมาจนบรรลุถึงจุดมุ่งหมายในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติทุกท่าน และคุณสถิต กุลนรัตน์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการเงิน และให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมาจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญรูป..... ฌ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ฑ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 16

3. ผลการวิจัย..... 27

4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย..... 80

เอกสารอ้างอิง..... 88

ภาคผนวก..... 97

ประวัติผู้เขียน..... 100

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดกลูโคนิค	3
2	ผลผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 25% เป็นแหล่งคาร์บอน	32
3	องค์ประกอบของข้าวสาร	82

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของกรดกลูโคนิค.....	1
2	ขั้นตอนการเกิดกรดกลูโคนิคจากน้ำตาลกลูโคส.....	2
3	ผลผลิตกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 25% ที่ได้จากการหมักข้าวด้วย *Rhizopus oryzae* เป็นแหล่งคาร์บอน.....	35
4	ผลผลิตกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 25% ที่ได้จากการหมักข้าวด้วย *Aspergillus niger* เป็นแหล่งคาร์บอน.....	36
5	ผลผลิตกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 25% ที่ได้จากการหมักข้าวด้วย *Aspergillus oryzae* เป็นแหล่งคาร์บอน.....37	
6	เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน.....38	
7	ปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งไฮโดรไลเสสชนิดที่ผ่านการกรอง.....	39
8	ปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งไฮโดรไลเสสชนิดที่ไม่ได้ผ่านการกรอง.....40	
9	เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคที่สร้างขึ้นโดย *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้แป้งไฮโดรไลเสส และน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....41	
10	เทอร์โมแกรมของเกลือแคลเซียมกลูโคเนตที่สร้างโดย *Aspergillus* sp. G153 และของเกลือแคลเซียมกลูโคเนตมาตรฐาน.....42	
11	HPLC โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ที่สร้างโดย *Aspergillus* sp. G153 และกรดกลูโคนิคมาตรฐาน.....43	
12	ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 20% เป็นแหล่งคาร์บอน.....44	
13	ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 25% เป็นแหล่งคาร์บอน.....45	
14	ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 30% เป็นแหล่งคาร์บอน.....46	

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

15 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิค เมื่อแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสในแป้งไฮโดรไลเสสต่าง ๆ กัน.....47

16 ผลผลิตกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน.....48

17 ผลผลิตกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสสที่มีไนโตรเจน 10 มก.ต่อ 100 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแหล่งไนโตรเจน.....49

18 ผลผลิตกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสสที่มีไนโตรเจน 15 มก.ต่อ 100 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแหล่งไนโตรเจน.....50

19 ผลผลิตกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสสที่มีไนโตรเจน 20 มก.ต่อ 100 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแหล่งไนโตรเจน.....51

20 ผลผลิตกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสสที่มีไนโตรเจน 25 มก.ต่อ 100 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแหล่งไนโตรเจน.....52

21 ผลผลิตกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสสที่มีไนโตรเจน 55 มก.ต่อ 100 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแหล่งไนโตรเจน.....53

22 ผลผลิตกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสสที่มีไนโตรเจน 85 มก.ต่อ 100 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแหล่งไนโตรเจน.....54

23 เปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิค เมื่อใช้กากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน กับแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณที่เหมาะสม.....55

24 ปริมาณกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....56

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

25 ปริมาณกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุ ไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$..... 57

26 ปริมาณกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุ ไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$ และ $MgSO_4.7H_2O$..... 58

27 ปริมาณกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุ ไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$ $MgSO_4.7H_2O$ และ KH_2PO_4..... 59

28 ปริมาณกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุ ไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$ $MgSO_4.7H_2O$ KH_2PO_4 และ $MnSO_4.4H_2O$..... 60

29 ปริมาณกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำปลอดประจุ และมีธาตุที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อครบ..... 61

30 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิค เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมโดยน้ำประปาและน้ำปลอดประจุ..... 62

31 ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคส 20% เป็นแหล่งคาร์บอน..... 63

32 ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคส 15% เป็นแหล่งคาร์บอน..... 64

33 ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีน้ำตาลกลูโคส 10% เป็นแหล่งคาร์บอน..... 65

34 เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิค ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในแป้งไฮโดรไลเสสต่าง ๆ กัน..... 66

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
35	ปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร อัตราการให้อากาศ 1.25 ลิตร/ลิตรอาหาร/นาที	67
36	ปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร อัตราการให้อากาศ 1.50 ลิตร/ลิตรอาหาร/นาที	68
37	ปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคจาก *Aspergillus* sp. G153 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร อัตราการให้อากาศ 1.75 ลิตร/ลิตรอาหาร/นาที	69
38	เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อแปรผันอัตราการ ให้อากาศค่าต่าง ๆ กัน	70
39	ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้อัตราการกวน 400 รอบ/นาที	71
40	ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้อัตราการกวน 500 รอบ/นาที	72
41	ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้อัตราการกวน 600 รอบ/นาที	73
42	เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคที่ผลิตโดย *Aspergillus* sp. G153 เมื่อแปรผัน อัตราการกวนต่าง ๆ กัน	74
43	ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้หัวเชื้อ 5%	75
44	ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้หัวเชื้อ 7%	76
45	ปริมาณกรดกลูโคนิค น้ำตาลกลูโคส และการเติบโตของ *Aspergillus* sp. G153 เมื่อใช้หัวเชื้อ 10%	77
46	เปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อแปรผันปริมาณ ของหัวเชื้อ *Aspergillus* sp. G153 ต่าง ๆ กัน	78

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

47 เปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิค ในระดับขวดเขย่าและในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะต่างๆที่เหมาะสมที่สุด..... 79

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

°ช.	=	องศาเซลเซียส
มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
กก.	=	กิโลกรัม
ลบ.ม.	=	ลูกบาศก์เมตร
มม.	=	มิลลิเมตร
ซม.	=	เซนติเมตร
ID.	=	Inner diameter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย