การผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงในพอลิยูรีเทนโฟม

นายนิติพงษ์ จิระวรานันท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-729-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19840425

GLUCONIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus niger* G153 IMMOBILIZED IN POLYURETHANE FOAM

Mr. Nitipong Jiravaranun

A thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1996

ISBN 974-634-729-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงในพอลิยูรีเทนโฟม
โดย	นาย นิติพงษ์ จิระวรานันท์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นิติพงษ์ จิระวรานันท์ : การผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงในพอลิยูรีเทนโฟม (GLUCONIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus niger* G153 IMMOBILIZED IN POLYURETHANE FOAM) อ.ที่ปรึกษา : รศ.กรรณิกา จันทรสอาด, 87 หน้า. ISBN 974-634-729-2

ชนิดของพอลิยูรีเทนโฟมที่เหมาะสมสำหรับการตรึงสปอร์ของ *Aspergillus niger* G153 เพื่อผลิตกรดกลูโคนิก คือ ชนิดโครงสร้างเปิด ความหนาแน่นสูง สายใยตรึงที่มีประสิทธิภาพสูง เตรียมได้โดยตรึงสปอร์ความหนาแน่น $1.0-2.5\times10^{8}$ สปอร์ต่อพอลิยูรีเทนโฟมหนัก 1 กรัม แล้วเพาะเลี้ยงนาน 40 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก ที่มีน้ำตาลกลูโคส 250 กรัมต่อลิตร โดยไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนใด ๆ เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่า สำหรับการผลิตในระดับคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิต คือ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร และน้ำประปา อัตราการให้อากาศ 9 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ความหนาแน่นของพอลิยูรีเทนโฟม 200 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถทำการผลิตกรดโดยใช้สายใยตรึงซ้ำได้ 12 ซ้ำ โดยผลผลิตกรดสูงสุดในแต่ละซ้ำลดลงเล็กน้อย เมื่อตรวจการเติบโตของสายใยตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่ามีสายใยตรึงเจริญอยู่เฉพาะบริเวณผิวของฟองพอลิยูรีเทนโฟม และลึกลงไปจากผิวเพียง 0.45-0.8 มิลลิเมตร สามารถเก็บสายใยตรึงที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยความสามารถในการผลิตกรดกลูโคนิกยังคงเดิม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

C626241 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: *Aspergillus niger*, GLUCONIC ACID, IMMOBILIZED MYCELIA, POLYURETHANE FOAM
NITIPONG JIRAVARANUN : GLUCONIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus niger* G153 IMMOBILIZED IN POLYURETHANE FOAM. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF. KANNIKA CHANTARASA-ARD, 87 pp. ISBN 974-634-729-2

The appropriate kind of polyurethane foam for immobilization of *Aspergillus niger* G153 spores is high density and open structure foam. The high efficiently immobilized mycelia can be prepared by cultivating $1.0\text{-}2.5\times10^{8}$ immobilized spores per 1 gram of polyurethane foam for 40 hours. The production medium containing 25 grams of glucose per 1 liter without adding any nitrogen source is suitable for gluconic acid production in shaking culture. In bubble column, the suitable conditions for the production are : the production medium containing 50 g/l of glucose in starch hydrolysate and tap water, 9 vvm aeration rate, 200 g. of polyurethane foam per 1 liter of the production medium. It is possible to make 12 repeated batches with slightly decreasing in the yield of each batch. The examination of the mycelia growth by scanning electron microscope shows that mycelia grow at the suface of polyurethane foam and 0.45-0.8 mm. depth from the surface. The immobilized mycelia can retained thier activities after storing at $6^{\circ}C$ for 7 days.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จนสมบูรณ์ จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ประธานกรรมการ และคณะกรรมการทุกท่านที่กรุณาตรวจสอบและแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ชินอิจิ คิโนชิตะ (Prof. Dr. Shinishi Kinoshita) แห่งมหาวิทยาลัย ฮ็อกไกโด ประเทศญี่ปุ่นที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์บางอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณบริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วให้ใช้ตลอดการทดลอง

ขอขอบคุณ คุณรุจิพร ประทีปเสน ที่ช่วยให้คำแนะนำ และถ่ายภาพสายใยตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

ขอขอบคุณ คุณสุนันท์ รังษีกาญจน์ส่อง ที่ช่วยให้คำแนะนำ และทำการวิเคราะห์กรดกลูโคนิกโดยเครื่อง HPLC

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนเพื่อน ๆ พี่ น้อง ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจเป็นอย่างมากในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่านที่ให้กำลังใจ และทุนทรัพย์อย่างดียิ่งจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 19

3. ผลการวิจัย 32

4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย 65

รายการอ้างอิง 75

ภาคผนวก 81

ประวัติผู้เขียน 87

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. มูลค่า และปริมาณการนำเข้าประเทศไทยของกรดกลูโคนิก อนุพันธ์ และเอสเทอร์ของกรด 2
2. ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิก 4
3. ตัวอย่างวัสดุตรึงที่ใช้ในการตรึงเซลล์โดยวิธีการกักขังเซลล์ 8
4. ตัวอย่างวัสดุตรึงชนิดต่าง ๆ ที่นิยมใช้ตรึงเซลล์ หรือสายใยรา 9
5. ตัวอย่างการใช้จุลินทรีย์ที่ตรึงในพอลิยูรีเทนโฟมโดยวิธีทำให้เซลล์ หรือสายใยเจริญเพื่อผลิตสารผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ 11
6. เปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิก การพบสายใยอิสระ เมื่อแปรผันเวลาในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด 40
7. ปริมาณกรดกลูโคนิก และเวลาที่พบตะกอนแคลเซียมกลูโคเนต เมื่อผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 เมื่อแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลเสตต่างกัน 44

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. ขั้นตอนการเกิดกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลกลูโคส 1
2. การผลิตกรดกลูโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง 23
3. การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 เมื่อ แปรผันขนาดชิ้น PUF 2 ขนาด คือ 0.6 และ 0.8 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 34
4. การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 เมื่อ ตรึงสปอร์ความหนาแน่นต่าง ๆ กัน ใน PUF น้ำหนัก 1 กรัม เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 36
5. การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 เมื่อ แปรผันเวลาที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อสายใยตรึง ต่าง ๆ กัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 38
6. เปรียบเทียบการเติบโตของ *Aspergillus niger* G153 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน เมื่อแปรผันหัวเชื้อสายใยตรึงอายุต่าง ๆ กัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 39
7. การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 เมื่อ แปรผันความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ต่าง ๆ กัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 42
8. การผลิตกรดกลูโคนิกจากสายใยตรึงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อแปรผันขนาดชิ้นของ PUF เป็น 0.25 และ 0.6 เซนติเมตร อัตราการให้อากาศ 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที น้ำหนักเปียก PUF ที่มีสายใยตรึง 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำตาลกลูโคสในแป้งไฮโดรไลเสต เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร 45
9. การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างเมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศต่าง ๆ กัน 47
10. การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อแปรผันน้ำหนักเปียก PUF ที่มีสายใยตรึงต่าง ๆ กัน อัตราการให้อากาศเท่ากับ 9 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที 49

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

11. การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 9 และ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที น้ำหนักเปียก PUF ที่มีสายใยตรึงหนัก 200 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 50
12. เปรียบเทียบการผลิตกรดกลูโคนิกภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยสายใยตรึงที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต และ PUF 52
13. การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ทำการผลิตโดยใช้สายใยตรึงซ้ำ 12 ซ้ำ 54
14. HPLC โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ เมื่อใช้ Zorbox-C8 คอลัมน์ 56
15. HPLC โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์เมื่อใช้ Spherisorb-C18 คอลัมน์ 56
16. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของ PUF ขนาดชิ้น 0.25 เซนติเมตร มีกล้าเชื้อสายใยตรึงเจริญอยู่ กำลังขยาย 22 เท่า 58
17. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของ PUF ขนาดชิ้น 0.25 เซนติเมตร ที่มีสายใยตรึงซึ่งผ่านการผลิตกรดกลูโคนิก 1 ซ้ำ กำลังขยาย 22 เท่า .. 59
18. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของชิ้น PUF ขนาดชิ้น 0.25 เซนติเมตร กำลังขยาย 180 เท่า 60
19. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของ PUF ขนาดชิ้น 0.25 เซนติเมตร ผ่าเป็นแว่น กำลังขยาย 35 เท่า 61
20. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของ PUF ขนาดชิ้น 0.25 เซนติเมตร ที่ผ่านการผลิตกรดกลูโคนิก 3 ซ้ำ กำลังขยาย 1000 เท่า 62
21. การผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 เมื่อเก็บ PUF ที่มีสายใยตรึงไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ก่อนนำมาทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 64