หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

กรดกลูโคนิค (Gluconic acid, $C_6H_{12}O_7$) เป็นกรดอินทรีย์ที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่นของกลูโคสด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Casida,1968) ดังสมการนี้

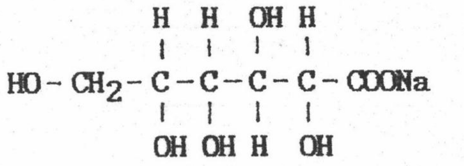
$$2\ C_6H_{12}O_6 + O_2 \xrightarrow{Gox} 2\ C_6H_{12}O_7$$

รูปที่ 1 การเกิดกรดกลูโคนิคจากน้ำตาลกลูโคส

Gox : glucose oxidase

ปัจจุบันการผลิตกรดกลูโคนิคในทางการค้า นิยมผลิตโดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *Gluconobacter suboxydans* การผลิตกรดนิยมทำในรูปเกลือ ซึ่งอาจเป็นเกลือโซเดียม หรือเกลือแคลเซียม (Casida,1968)

โซเดียมกลูโคเนต (Sodium gluconate, $C_6H_{12}NaO_7$) เป็นเกลือของกรดรูปหนึ่งที่นิยมผลิตกันมาก มีองค์ประกอบของธาตุต่าง ๆ ดังนี้ คือ ธาตุคาร์บอน 33.04 % ไฮโดรเจน 5.08 % โซเดียม 10.54 % และออกซิเจน 51.54 % มีน้ำหนักโมเลกุล 218.13 มีกลิ่นหอม ละลายได้ดีในน้ำอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณ 100 มิลลิลิตรได้ 59 กรัม ละลายได้เล็กน้อยในอัลกอฮอล์ แต่ไม่ละลายในอีเธอร์ (Merck, 1989)



รูปที่ 2 สูตรเคมีของโซเดียมกลูโคเนต

<u>ประโยชน์ของโซเดียมกลูโคเนต</u>

1. ใช้ในอุตสาหกรรมเส้นใยและสิ่งทอ โดยโซเดียมกลูโคเนตจะเป็นสารป้องกันไม่ให้มีการปนเปื้อนของเหล็ก ในกระบวนการย้อมผ้า(Prescott และคณะ,1953) และป้องกันการเกาะติดของเกลือที่ปะปนอยู่ในน้ำกระด้างบนผ้า (Underkofler, 1953)
2. ใช้ในอุตสาหกรรมย้อมสีหนัง โดยป้องกันการตกตะกอนของไฮดรอกไซด์ของโลหะบางชนิดที่ใช้ในกระบวนการย้อมสีหนัง (Prescott และคณะ,1953)
3. ใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาทำความสะอาดโลหะ ป้องกันสนิม โดยเฉพาะในกรณีที่ใช้น้ำกระด้างซึ่งจะเกิดสนิมได้ง่าย ใช้ทำความสะอาดแก้ว ภาชนะต่าง ๆ และเป็นองค์ประกอบของน้ำยาทำความสะอาดผนัง (Lookwood,1979)
4. ใช้ในอุตสาหกรรมปูนซีเมนต์ เป็นตัวป้องกันไม่ให้ปูนซีเมนต์แข็งตัวเร็ว (Milsom และ Meers,1985)
5. ใช้ในอุตสาหกรรมภาพถ่าย โซเดียมกลูโคเนตจะช่วยให้สารเคมีที่ใช้มีความเสถียรและป้องกันการตกตะกอนของโลหะออกไซด์ในถังบรรจุต่าง (Prescott และคณะ, 1953)

<u>ประวัติความเป็นมาของการผลิตกรดกลูโคนิค ในรูปแคลเซียมกลูโคเนตและโซเดียมกลูโคเนต</u>

Hlasiwetz และ Habermann เป็นคนแรกที่พบกรดกลูโคนิค เมื่อปี ค.ศ.1870 (อ้างโดย Milsom และ Meers, 1985) การผลิตกรดกลูโคนิคในระยะเริ่มแรกใช้วิธีการหมักบนอาหารแข็ง โดย May และคณะ (1927) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคจากเชื้อรากลุ่ม *Penicillium lutium purpurogenum* พบว่าให้ผลผลิตกรดสูงสุด 55-65 % ในปี ค.ศ. 1928 Screyer ได้รายงานถึงผลการศึกษาที่พบว่า การหมักในอาหารเหลว มีการให้อากาศ และการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นการเพิ่มผลผลิตกรดให้สูงขึ้น (อ้างโดย Milsom และ Meers, 1985) หลังจากนั้น มีรายงานการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสม ต่อการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปแคลเซียมกลูโคเนตว่า การเพิ่มความดันอากาศเป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้ได้ผลผลิตแคลเซียมกลูโคเนตสูง (May และคณะ ,1934) นอกจากนี้ ในปี ค.ศ.1938 Gastrock และคณะ

ได้ทดลองผลิตแคลเซียมกลูโคเนตในระดับโรงงานต้นแบบ โดยศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมหลายประการ ได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใช้ อุณหภูมิใน การเลี้ยงเชื้อ การให้อากาศและการกวน รวมทั้งทดลองนำสายใย *Aspergillus niger* สายพันธุ์ 67 มาใช้ซ้ำด้วย ต่อมา ในปี ค.ศ.1952 Blom และคณะทดลองผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต ในระดับโรงงานต้นแบบ เป็นครั้งแรก จากเชื้อ *Aspergillus niger* NRRL 3 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นสารควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อแทนการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่า สามารถผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนตได้สูงเกือบ 100 % ในปี ค.ศ.1969 Ziffer และคณะ ได้ทดลองศึกษาถึงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และ ช่วงเวลาในการเติมสารอาหารในระหว่างการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ต่อผลผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต พบว่า สามารถใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสได้สูงถึง 42 % โดยพบผลผลิตกรด 94.3 % ในปี ค.ศ.1976 Ghose และ Mukhopadhyay ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนตจากเชื้อ *Pseudomonas ovalis* B 1468 โดยศึกษาถึงกลไกและสภาวะทางกายภาพต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิค ในปี ค.ศ.1977 Su และคณะได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนตจากเชื้อ *Pullulalia pullulans* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ใช้แป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลเสสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 97 % ในปีเดียวกันนี้ บริษัท Fujisawa Pharmaceutical ได้ผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนตด้วยวิธีการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) ให้ผลผลิตกรดมากกว่า 95 % (Yamada,1977) ในปีต่อมา Ghosh และ Ghose ศึกษาถึงผลของออกซิเจนต่อการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต พบว่า อัตราการผลิตกรดกลูโคนิคขึ้นอยู่กับอัตราการนำออกซิเจนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้ ในปี ค.ศ.1980 Nyests และคณะได้เสนอแบบจำลอง (model)ของถังหมัก และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนตจากเชื้อ *Acetobacter suboxydans* ATCC 621 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ในปี ค.ศ.1989 Sakurai และคณะ ประสบความสำเร็จในการตรึงสายใยของเชื้อ *Aspergillus niger* IAM 2094 สามารถใช้สายใยซ้ำได้ถึง 14 ครั้ง โดยผลผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนตไม่ลดลง นอกจากนี้ Moresi และคณะ (1991)ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของออกซิเจน ต่อการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยการตรึงสายใยของเชื้อ *Aspergillus niger*

<u>ความเป็นมาของการใช้สายใยซ้ำ</u>

ในปี ค.ศ.1938 Gastrock และคณะได้ทดลองผลิตแคลเซียมกลูโคเนตในระดับโรงงานต้นแบบ โดยศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต พบว่า สามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้ในปริมาณสูงถึง 97 % จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 15 % (คิดจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น) และ ได้พยายามลดเวลาในการผลิตโดยให้กลูโคสเปลี่ยนไปเป็นกรดกลูโคนิค อย่างรวดเร็ว จึงทดลองใช้สายใย *Aspergillus niger* สายพันธุ์ 67 มาผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำในการทดลองต่อไป ใช้สภาวะในการเลี้ยงเชื้อเช่นเดิม พบว่า สามารถใช้สายใยที่กรองจากการผลิตครั้งก่อนซ้ำได้ถึง 3 ครั้ง โดยผลผลิตกรดไม่ลดลง และสามารถลดระยะเวลาในการผลิตลง 14.5 และ 8.5 ชั่วโมง ตามลำดับ แต่ทั้งนี้ต้องระมัดระวังเกี่ยวกับปัญหาการปนเปื้อนซึ่งจะเกิดขึ้นได้ง่าย ต่อมา ในปี ค.ศ. 1940 Porges และคณะ ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้สายใยซ้ำแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสายใยเจริญอยู่มาผลิตกรดซ้ำโดยไม่กรอง พบว่า สามารถผลิตกรดซ้ำถึง 13 ครั้ง โดยผลผลิตไม่ลดลง แต่สามารถลดระยะเวลาในการผลิตและต้นทุนการผลิตลงได้ ในปี ค.ศ.1941 Porges และคณะ ทดลองใช้สายใยซ้ำ โดยออกแบบอุปกรณ์กรองสายใยจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีความสะดวกและหลีกเลี่ยงปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ดี โดยสามารถนำสายใยมาใช้ซ้ำได้ปริมาณมากถึง 75 % (ปริมาตร/ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม) และใช้สายใยซ้ำได้ถึง 9 ครั้ง โดยผลผลิตกรดกลูโคนิคไม่ลดลงและลดระยะเวลาในการผลิตลงเช่นกัน

ปี ค.ศ. 1972 Hatcher ได้ทดลองนำสายใย *Aspergillus niger* มาใช้ซ้ำ ในการผลิตกรดกลูโคนิค โดยแยกสายใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้ผลิตกรดซ้ำในอาหารใหม่ที่มีกลูโคสเพียงอย่างเดียว ไม่มีสารอาหารอื่น จนกว่าความสามารถในการผลิตกรดของเชื้อลดลงจึงเพิ่มสารอาหารบางชนิดที่เพิ่มความสามารถของเชื้อลงไป คือ แหล่งไนโตรเจนและแมกนีเซียม ด้วยวิธีนี้ทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตลงได้

<u>กระบวนการทางชีวเคมีของการผลิตกรดกลูโคนิค</u>

การผลิตกรดกลูโคนิค จากน้ำตาลกลูโคส เป็นกระบวนการออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคส โดยมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (β- D-Glucose 1-oxidoreductase ,E.C.1.1.3.4.) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการนี้

1. Glucose + FAD-Gox-FAD $\longrightarrow$ FAD-Gox-$FADH_2$ + D-glucono-δ-lactone

2. D-glucono-δ-lactone + H_2O $\longrightarrow$ gluconic acid

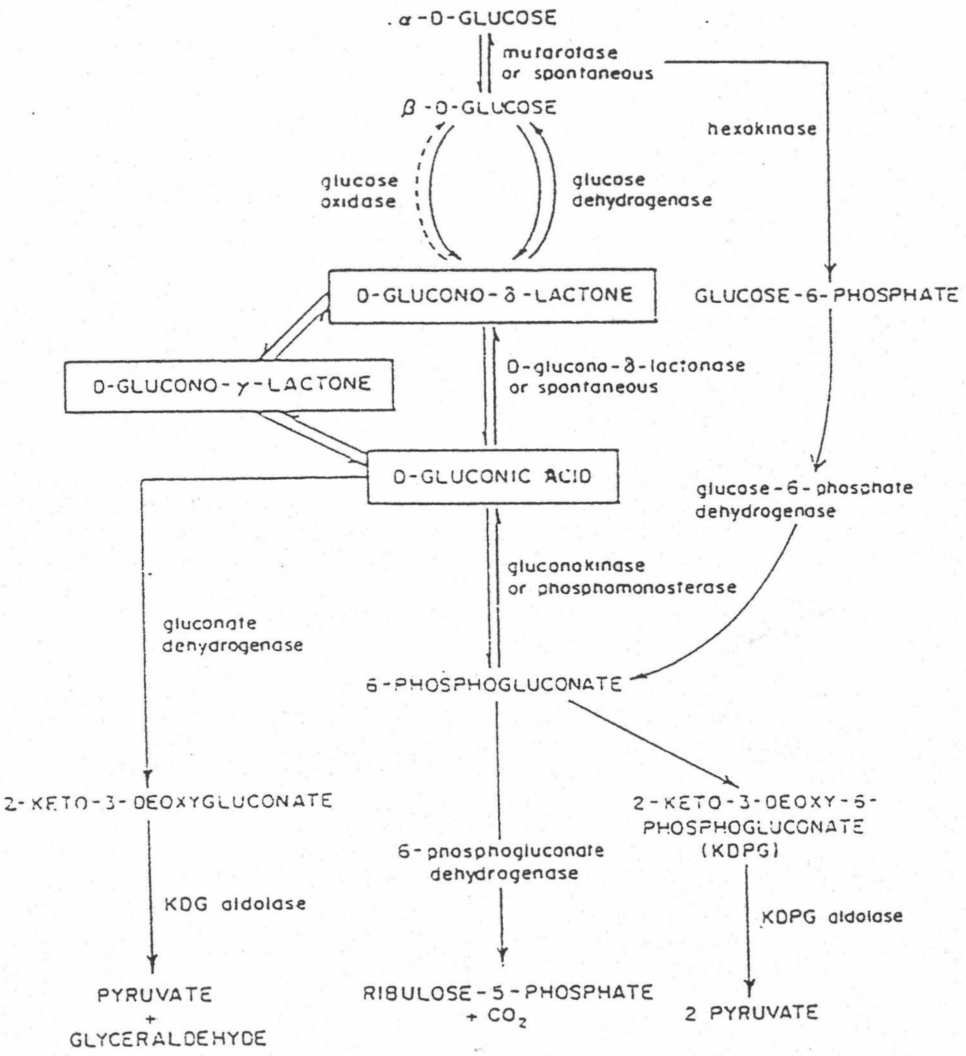
3. FAD-Gox-$FADH_2$ + O_2 $\longrightarrow$ FAD-Gox-FAD + H_2O_2

4. H_2O_2 + Catalase $\longrightarrow$ H_2O + O_2

รูปที่ 3. ขั้นตอนการเกิดกรดกลูโคนิค

จากสมการที่ 1. เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีฟลาวินอาดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Flavine Adenine Dinucleotide , FAD)เป็นโคเอนไซม์ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะดึงอะตอมของไฮโดรเจน ออกจากน้ำตาลกลูโคส แล้วได้เป็นดีกลูโคโนเดลต้าเลคโตน (D-glucono-δ-lactone) หลังจากนั้น มีการไฮโดรไลซ์กลูโคโนเดลต้าแลคโตนต่อได้เป็นกรดกลูโคนิคซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ การสะสมกลูโคโน-เดลต้าแลคโตน เป็นสารมัธยันต์ (intermediate)จะทำให้อัตราการออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคสลดลง ดังนั้น ถ้าในจุลินทรีย์มีการสร้างเอนไซม์เลคโตเนส (lactonase) ก็จะช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้น (สมการที่ 2.) ส่วนเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่เปลี่ยนรูปไป จะไปรวมกับออกซิเจน ได้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (สมการที่ 3.) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ที่สร้างขึ้นเองจากเซลจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดกลูโคนิค ได้เป็นออกซิเจนกับน้ำ (สมการที่ 4.) (Milsom และ Meers,1985)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4. ความสัมพันธ์ของกรดกลูโคนิคกับวัฏจักรต่าง ๆ ในจุลินทรีย์ (Milsom และ Meers,1985)

ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิค

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

จุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตกรดกลูโคนิค โดยเฉพาะเชื้อราและแบคทีเรีย เป็นจุลินทรีย์ที่มีผู้สนใจและมีการศึกษาเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคกันอย่างมาก กระทั่งสามารถพัฒนาขึ้นถึงระดับอุตสาหกรรม ในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดกลูโคนิคอาศัยหลักการเดียวกัน คือ ต้องมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดกลูโคนิคเพียงชนิดเดียว และ ผลิตในปริมาณสูง ให้ผลผลิตสม่ำเสมอและไม่กลายพันธุ์ง่าย

2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิค

2.1 แหล่งคาร์บอน

ในการผลิตกรดกลูโคนิค ปริมาณผลผลิตกรดจะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ โดยทั่วไปนิยมใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นกรดกลูโคนิคได้โดยตรง นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมด้วย เพราะหากใช้ปริมาณมากเกินไปจะทำให้การผลิตกรดต่ำ เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่สามารถทนต่อน้ำตาลสูงได้ โดยทั่วไปนิยมใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ 15 % (น้ำหนักต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จนถึง 30 % ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและวิธีการผลิตด้วย ดังในปี ค.ศ. 1975 Qadeer และคณะ ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคในรูปแคลเซียมกลูโคเนต จากเชื้อ *Aspergillus niger* WRL-51 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร พบว่า กลูโคสเข้มข้น 15 % เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด ส่วนการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต จากเชื้อ *Aspergillus niger* NRRL 3 พบว่า น้ำตาลกลูโคส 30 % เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมากที่สุด (Blom และคณะ,1952) การผลิตกรดกลูโคนิคในรูปแคลเซียมกลูโคเนต จากเชื้อ *Aspergillus* sp. G 153 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ ในปริมาณ 25 % (น้ำหนักต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) (รติกร กัณฑพงศ์ ,2534)

การลดต้นทุนการผลิตกรดกลูโคนิค เป็นสิ่งจำเป็น จึงได้มีความพยายามใช้แหล่งคาร์บอนทดแทน ซึ่งวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ทดแทนมีหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1.

ตารางที่ 1. วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยจุลินทรีย์

แหล่งคาร์บอน	เอกสารอ้างอิง
กลูโคส	Gastrock และคณะ (1938)
(glucose)	Moyer และคณะ (1940)
	Blom และคณะ (1952)
	Yamada (1977)
	Takao และ Sasaki (1964)
	รติกร กัณฑพงศ์ (2534)
แป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลเสส	Su และคณะ (1977)
(starch hydrolysate)	มาจรีย์ จันทราภาณุกร (2536)
แป้งข้าวโพดไฮโดรไลเสส	Moresi และคณะ (1991)
(corn starch hydrolysate)	
แป้งข้าวโพดป่น	Ziffer และคณะ (1969)
(corn meal)	
มอลโตส	Cho และคณะ Bailey (1977)
(maltose)	

2.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการผลิตกรดกลูโคนิคนั้น โดยทั่วไปจะใช้ในรูปที่เป็นอนินทรีย์ไนโตรเจนมากกว่าอินทรีย์ไนโตรเจน เช่นเกลือแอมโมเนียมในรูป $(NH_4)_2SO_4$ (รติกร กัณฑพงศ์ ,2534) NH_4NO_3 (Qadeer และคณะ,1975) $(NH_4)_2HPO_4$ (Moyer และคณะ,1940) นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนแล้ว ปริมาณที่ใช้ก็มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิคเช่นเดียวกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ควรมีแหล่งไนโตรเจนมากนัก เพราะจะทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตมาก การผลิตกรดน้อยลง (Milsom และ Meers,1985) ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วย มีรายงานการผลิตกรดกรดกลูโคนิคโดย *Pullulalia pullulans* พบว่า $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 0.05 % เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (Su และคณะ,1977) ส่วนเชื้อ *Aspergillus niger* พบว่า แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตกรดสูง (Rohr ,1982) เชื้อ *Penicillium janthinellum* แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (Mandal และ Chatterjee,1985)

3. แร่ธาตุ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิค ต้องการแร่ธาตุหลายชนิด เช่น แมกนีเซียม (Mg^{++}) แมงกานีส(Mn^{++}) และ เหล็ก (Fe^{++}) (Milsom และ Meers,1985) แร่ธาตุเหล่านี้เมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้ผลผลิตกรดสูงขึ้น และไม่มีการผลิตกรดชนิดอื่นปน โดยมีรายงานว่า ถ้าไม่เติมแมงกานีสลงไป จะทำให้มีการผลิตกรดมะนาว และ กรดออกซาลิกร่วมด้วย (Lookwood ,1979) การผลิตกรดกลูโคนิคจากเชื้อ *Aspergillus* sp.สายพันธุ์ G 153 พบว่า ต้องมีการเติมธาตุ แมงกานีส และเหล็กในปริมาณที่เหมาะสมจึงจะทำให้ผลผลิตกรดสูงขึ้น (กรรณิกา จันทรสอาด, 2533) นอกจากนี้ พบว่าถ้ามีธาตุบางชนิดเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus* sp. แล้วจะยับยั้งการผลิตกรด ได้แก่ เงิน ปรอท และ ทองแดง (Nakamura และ Ogura ,1968; กรรณิกา จันทรสอาด,2533)

ได้มีความพยายามใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุ ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อลดต้นทุนการผลิต และลดขั้นตอนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีรายงาน การผลิตกรด

กลูโคนิคจาก เชื้อ *Aspergillus* sp. NRRL 3 โดยใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุ และมีการ เติมธาตุบางชนิดในอาหาร เลี้ยง เชื้อ พบว่า ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูง (Blom และคณะ, 1952) และนอกจากนี้ มีการใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุ และ โดยไม่เติมธาตุใด ๆ พบว่า ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงเช่นกัน (Yasin และคณะ ,1969 ;Jantrapanukorn และ Chantarasa-ard, 1992)

4. <u>ความเป็นกรดด่างของอาหาร เลี้ยง เชื้อ</u>

ในระหว่างการผลิตกรดกลูโคนิค จำเป็นต้องมีการ เติมสารควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหาร เลี้ยง เชื้อให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม เพราะถ้าความเป็นกรดด่างมีค่าต่ำจะยับยั้งการผลิตกรด (Prescott ,1959 ; กรรณิกา จันทรสอาด ,2530) จึงมีการ เติมสาร เพื่อควบคุมความเป็นกรดด่าง สารที่นิยม ได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต และโซเดียมไฮดรอกไซด์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการช่วงความเป็นกรดด่างของอาหาร เลี้ยง เชื้อที่เหมาะสมแตกต่างกัน จากรายงานการผลิตกรดกลูโคนิคโดยเชื้อ *Aspergillus niger* ถ้าหากในกระบวนการผลิตมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 3 แล้วเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะไม่ทำงาน และมีการสร้างกรดมะนาวออกมาแทน (Rohr, 1982) จึงต้องมีการควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหาร เลี้ยง เชื้อให้เหมาะสม โดย Blom และคณะ (1952) ผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนตจาก เชื้อ *Aspergillus niger* ควบคุมความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 6.0-6.5 Sakurai และคณะ (1989) ผลิตกรดกลูโคนิคจาก เชื้อ *Aspergillus niger* เช่นกัน ควบคุมความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 6.0 กรรณิกา จันทรสอาด (2530) และ รติกร กัณฑพงศ์(2534) ผลิตกรดกลูโคนิคในรูปแคลเซียมกลูโคเนตจาก เชื้อ *Aspergillus* sp.G 153 ควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหาร เลี้ยง เชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 6-6.5

5. <u>อุณหภูมิ</u>

การควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการ เลี้ยง เชื้อ มีความสำคัญต่อการ เจริญ และการผลิตกรดกลูโคนิคของจุลินทรีย์ ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงความเหมาะสมในการทำงานของ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ซึ่งมีรายงานว่าสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 35-50 องศาเซลเซียส (Godfley และ Riechelt,1983) แต่ต้อง เหมาะสมต่อการ เจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และ นอกจากนี้ ยังต้อง

พิจารณาถึงความคุ้มค่าในการใช้พลังงานในการควบคุมอุณหภูมิด้วย สำหรับเชื้อรา *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิค คือ 30-33 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงถึง 37 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตต่ำลงอย่างชัดเจน (กรรณิกา จันทรสอาด,2530 ;รติกร กัณฑพงศ์ ,2534)

6. <u>ออกซิเจน</u>

เนื่องจากกรดกลูโคนิคเกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่น (oxidation) ของน้ำตาลกลูโคส ดังนั้น ปริมาณออกซิเจนจึงเป็นสิ่งสำคัญต่ออัตราการหมัก การให้อากาศ และการกวนจะทำให้การผลิตกรดรวดเร็วขึ้น จากการทดลองศึกษาผลของการให้อากาศ และการกวนต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ของเชื้อ *Aspergillus niger* 1026/5 พบว่า นอกจากการให้อากาศแล้วการกวน ก็มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และ การเจริญของจุลินทรีย์ โดยเมื่อให้อากาศที่อัตรา 1 ลิตร/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ/นาที แล้วเพิ่มอัตราการกวนจาก 460 รอบต่อนาที เป็น 700 รอบต่อนาที พบว่า มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และมีการผลิตเอนไซม์ที่สูงขึ้น (Zetelaki และ Vas ,1968) บาจรีย์ จันทราภาณุกร(2536) ศึกษาการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปแคลเซียมกลูโคเนต ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดย *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ G 153 พบว่า อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตร/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ/นาที อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที เหมาะสมต่อการผลิตโดยทำให้ผลผลิตกรดสูงสุดถึง 95.64 % ภายในเวลา 36 ชั่วโมง

นอกจากนี้ออกซิเจนยังเป็นตัวช่วยทำให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ที่เปลี่ยนรูปไปหลังจาก ทำปฏิกริยากลับคืนสู่สภาพเดิม เพื่อเร่งปฏิกริยาได้อีก (Milsom และ Meers,1985)

<u>ข้อดีของการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต</u>

1. <u>ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส</u>

การผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต สามารถใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสได้สูง ทำให้ผลผลิตที่ได้แต่ละครั้งมีปริมาณมาก ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของวิธีนี้ และไม่มีปัญหา

ในการตกตะกอนของเกลือโซเดียมกลูโคเนต เหมือนการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปแคลเซียมกลูโคเนต ดังเช่นผลการทดลองของ บาจรีย์ จันทราภาณุกร(2536) พบว่า ถ้าใช้แป้งไฮโดรไลเสสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 25 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปแคลเซียมกลูโคเนต โดย *Aspergillus* sp. G 153 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แล้วจะมีตะกอนของแคลเซียมกลูโคเนตในถังหมักปริมาณมาก จนรบกวน และต้องหยุดการผลิต แต่เมื่อใช้แป้งไฮโดรไลเสส ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 20 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าเหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยเชื้อดังกล่าว ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาว่า การเติมโบรอนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะสามารถใช้ความเข้มข้นของกลูโคสได้สูงขึ้น(Moyer และคณะ,1940) แต่ยังคงมีปัญหาในเรื่องการเก็บเกี่ยว (Miall ,1970) และ ความทนทานต่อปริมาณโบรอนของจุลินทรีย์ (Casida,1968) อย่างไรก็ตาม การผลิตในรูปโซเดียมกลูโคเนตนั้น ก็ต้องใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลให้เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ ทั้งนี้การคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ก็เป็นสิ่งสำคัญประการหนึ่ง เนื่องจากเชื้อบางชนิดมีความสามารถทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงได้ จากการรายงานของ Blom และ คณะ(1952) พบว่า สามารถใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้สูงถึง 35 % แต่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมให้ผลผลิตโซเดียมกลูโคเนตสูงสุด คือ 30 % และ บริษัท Fujisawa Phamaceutical (1977) พบว่า สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 35 % ในการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดยให้ผลผลิตสูงถึง 95 % (Yamada,1977)

2. <u>การควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

การผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นสารควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยค่อย ๆ เติมลงไปในระหว่างที่เพาะเลี้ยงเพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรด และการเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดนั้น ข้อได้เปรียบของการควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อวิธีนี้ คือ สามารถควบคุมให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมตลอดการทดลอง แต่การผลิตในรูปแคลเซียมกลูโคเนต ที่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารควบคุมโดยเติมลงไปเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อเพียงครั้งเดียว ดังนั้น จึงต้องมีการศึกษาถึงปริมาณที่เหมาะสมเพราะความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเชื้อผลิตกรดมากขึ้น ถ้าปริมาณน้อยเกินไปจะทำให้ผลผลิตกรดต่ำ (Takao และ Sasaki, 1964) นอกจากนี้ Das และ Kundu (1987) พบว่า ถ้าใช้ปริมาณแคลเซียมกลูโคเนตมากเกินไป ก็จะทำให้จุลินทรีย์ ลดกิจกรรมลงและสายใยอาจตายได้

3. <u>ปริมาณออกซิเจน</u>

การเขย่าในการผลิตกรดกลูโคนิคระดับขวดเขย่า หรือการให้อากาศและการกวนในระดับถังหมัก เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีผลโดยตรงต่อการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต ซึ่งมีความสามารถในการละลายได้ดีกว่าในรูปแคลเซียมกลูโคเนต (Lookwood ,1979) สามารถจัดอัตราการให้อากาศและอัตราการกวน ในถังหมักได้สูงโดยไม่รบกวนการผลิต แตกต่างจากการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปแคลเซียมกลูโคเนต ที่เมื่อให้อัตราการกวนสูง ๆ ใบพัดจะตีตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งใช้เป็นสารสะเทิน และแคลเซียมกลูโคเนตซึ่งเป็นผลผลิตไปติดบริเวณข้างถังหมัก ทำให้ไม่สะดวกในการเก็บเกี่ยวและการวิเคราะห์ผลผลิตกรดผิดพลาดได้ นอกจากนี้ ยังนิยมใช้การผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต ในการศึกษาเกี่ยวกับการให้อากาศและการกวนในอัตราเร็วสูง เพื่อศึกษาผลของอากาศที่มีต่อการผลิตกรดกลูโคนิค (Zetelaki และ Vas,1968) และการศึกษาเกี่ยวกับกลไกของการผลิตกรดกลูโคนิค (Humphrey และ Reilly,1965 ; Ghose และ Ghosh ,1976) เนื่องจากไม่มีปัญหาดังกล่าว

<u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

1. เพื่อศึกษาถึงปัจจัยบางประการ เพื่อการเพิ่มผลผลิต และลดต้นทุนในการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต ระดับขวดเขย่า และในถังหมักขนาด 5 ลิตร
2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดกลูโคนิค ในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยใช้สายใยซ้ำ

<u>ขอบเขตการวิจัย</u>

1. ทดลองหาสภาวะและวิธีการที่เหมาะสม ในการใช้แอมเบอร์ไลท์ ไอ-อาร์ 120 พี ในการดูดซับโซเดียมอิออนออกจากโซเดียมกลูโคเนตมาตรฐาน เพื่อตรวจหาปริมาณกรดกลูโคนิค
2. ศึกษาปัจจัยที่สำคัญบางประการ ในการเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิคในระดับขวดเขย่า
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการ เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร
4. ทดลองนำสายใยของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดกลูโคนิคแล้ว มาใช้ซ้ำในการผลิตครั้งต่อไป