บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันมีการนำกรดอินทรีย์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์มาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยกรดอินทรีย์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายได้แก่ กรดซิตริก กรดมาลิก กรดแลกติก กรดกลูโคนิก และกรดทาร์ทาลิก ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 (Bigelis และ Tsai, 1995)

สำหรับกรดกลูโคนิก (Gluconic acid, $C_6H_{12}O_7$) หรือกรดเพนตะไฮดรอกซีคาโปรอิก (Pentahydroxycaproic acid) เป็นกรดอินทรีย์จำพวกอะลิกฟาติกไฮดรอกซี (Aliphatic hydroxy acids) ที่ได้จากการเติมออกซิเจนให้กับโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส (Prescott และ Dunn ,1959 ; Casida,1968)

การผลิตกรดกลูโคนิกสามารถผลิตได้โดยวิธีทางเคมีหรือวิธีการหมักด้วยจุลินทรีย์ แต่ในปัจจุบันไม่นิยมวิธีทางเคมี ทั่วโลกมีความต้องการใช้กรดกลูโคนิกและอนุพันธ์ของกรดประมาณ 50000 ตันต่อปี (Hinman, 1994; Bigelis และ Tsai, 1995) สำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมใช้วิธีการหมักด้วยจุลินทรีย์ได้แก่รา *Aspergillus niger* หรือแบคทีเรีย *Gluconobacter oxydans* ปัจจุบันการผลิตกรดกลูโคนิกและอนุพันธ์ของมันส่วนใหญ่ใช้วิธีการหมักในอาหารเหลวด้วย *Aspergillus niger* (อ้างถึงใน Moksia และคณะ, 1996) และนิยมผลิตในรูปแคลเซียมกลูโคเนต และโซเดียมกลูโคเนต (Blom และคณะ, 1952)

สำหรับในประเทศไทยปัจจุบันยังไม่มีโรงงานผลิตกรดกลูโคนิกจึงอาศัยการนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งข้อมูลแสดงปริมาณการนำเข้ากรดกลูโคนิกและมูลค่าการนำเข้าแสดงในตารางที่

ตารางที่ 1 ชนิดกรดอินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรม ผู้ผลิตรายสำคัญและวิธีการผลิต (Bigelis และ Tsai, 1995)

Acidulant	Production Method,[a, b]	Main Producers
Citric acid	F 100%	Haarmann & Reimer-Bayer AG (Springfield, NJ)
		ADM (Decatur, IL)
		Cargill (Minneapolis, MN)
Lactic acid	F 50%	Sterling Chemical (Houston, TX)
	C 50%	Purac (Gorinchem, The Netherlands)
		ADM (Decatur, IL)
		Cargill (Minneapolis, MN)
		Ecochem-Conagra/Dupont (Adell, Wl)
Gluconic acid และ	F 67%	Akzo Chemic (Amersfoort, The Netherlands)
δ- glucono-lactone	C 33%	Pfizer (New York)
		Roquette-Frere (Lille, France)
		Fujisawa (Japan)
		PMP Fermentation Products (Peoria, IL)
Malic acid	C 70%	Miles-Bayer AG (Duluth, MN)
	E 30%	Bartek (Burlington, Ontario)
		Tanabe Seiyaku (Tanabe, Japan)
Fumaric acid	C 100%	Miles-Bayer AG (Duluth, MN)
		Pfizer (Terre Haute, IN)
		Monsanto (St. Louis)
		Kalama Chemical (Garfield, NJ)
		Fleischmann Yeast Co. (New York)
		H. J. Heinz
Acetic acid	F 100%	Richter Vinegar (Manitowoe, Wl) Hood Vinegar
(vinegar)		(Baltimore, MD)
		Lyndonville Vinegar (Lyndonville, NY)
		National Vinegar (Baltimore, MD)

ตารางที่ 1 ชนิดกรดอินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรม ผู้ผลิตรายสำคัญและวิธีการผลิต (Bigelis และ Tsai, 1995) (ต่อ)

Acidulant	Production Method,[a,b]	Main Producers
Tartaric acid	F 100%,	Tartaric Chemicals (New York) Nippon Shokubai (Japan) NOF (Japan) Takeda Chemical (Takeda, Japan)

[a] Percentage of total production for food applications

[b] F, fermentation; C, chemical synthesis; E, enzymatic synthesis.

[c] By product of wine making.

ตารางที่ 2 ข้อมูลการใช้กรดอินทรีย์บางชนิดและมูลค่าของกรดในปี คศ. 1992 (Bigelis และ Tsai, 1995)

Acidulant	Food Consumption (million lb)	Value in Food Applications (million $)
Acetic acid (vinegar)	2,500.0	128.0
Citric acid	410.0	328.0
Tartaric acid	30.0	88.5
Malic acid	16.0	13.0
Lactic acid	9.0	8.4
Fumaric acid	6.0	4.6
Gluconic acid และ δ-gluconolactone	6.0	2.9
Total	2977.0	573.4

. Based on consumption in million of pounds และ millions of dollars in 1992.

ตารางที่ 3 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าประเทศไทยของกรดกลูโคนิก เกลือของกรด และเอสเทอร์ของกรด (ข้อมูลจาก กองบริหารข้อมูล กรมศุลกากร กระทรวงการคลัง, 2542)

ประเทศ	พ.ศ. 2539		พ.ศ. 2540		พ.ศ. 2541		พ.ศ. 2542	
	ก.ก.	บาท	ก.ก.	บาท	ก.ก.	บาท	ก.ก.	บาท
NETHERLAND	208,000	6,882,100	160,250	5,842,908	5,000	1,014,461	340,861	16,557,482
JAPAN	143,925	5,796,908	105,130	5,842,908	98,100	4,835,608	99,519	5,047,195
GERMANY	49,281	2,536,057	6,733	1,006,006	1,887	232,613	2,363	443,428
U.S.A.	23,949	1,264,195	50,140	2,652,274	19,224	1,044,689	6,079	213,852
ITALY	19,975	683,055	50	25,352	34,925	1,894,192	-	-
INDIA	7,000	684,735	17,030	2,185,874	4,980	725,169	3,625	3,921,180
CHINA	3,000	234,057	3,000	285,227	-	-	6,000	471,834
SWITZERLAND	4	2,943	8	7871	36	17,495	1,725	896,595
FRANCE	-	-	17,500	840,444	17,775	1,291,440	37,500	1,715,657
S. KOREA	-	-	15,000	507,780	15,000	678,130	18,000	630,291
TAIWAN	-	-	-	-	2,000	166,473	-	-
N. KOREA	-	-	-	-	250	26,931	-	-
IRELAND	-	-	-	-	-	-	20,000	554,190
TOTAL	455,134	17,984,050	374,841	17,813,781	200,177	12,020,865	340,861	16,557,482

คุณสมบัติของกรดกลูโคนิกและอนุพันธ์ของกรดกลูโคนิก

กรดกลูโคนิก ($C_6H_{12}O_7$) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 196.16 ประกอบด้วยคาร์บอน 36.74% ไฮโดรเจน 6.17% ออกซิเจน 57.10% ละลายได้ดีในน้ำและละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ ไม่ละลายในอีเธอร์และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ในทางการค้านิยมผลิตในรูปสารละลาย 50% มีสีเหลืองอ่อนและกลิ่นคล้ายน้ำส้มสายชู (Merck, 1989)

แคลเซียมกลูโคเนต (C_{12} H_{22} CaO_{14}) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 430.38 ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 33.49 % ไฮโดรเจน 5.16 % แคลเซียม 9.31 % และออกซิเจน 52.05 % ละลายในน้ำเย็นได้เล็กน้อยประมาณ 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และในน้ำเดือดประมาณ 20 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไม่ละลายในแอลกอฮอล์และตัวทำละลายอื่นๆ ไม่มีสี กลิ่นและรส (Kundu และ Das, 1987; Merck, 1989)

โซเดียมกลูโคเนต (C_6 H_{12} Na O_7) มวลโมเลกุลเท่ากับ 218.13 ประกอบด้วยคาร์บอน 33.04% ไฮโดรเจน 5.08 % โซเดียม 10.54 % และออกซิเจน 51.34 % มีกลิ่นหอม ละลายได้ดีในน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ แต่ไม่ละลายในอีเทอร์ (อ้างถึงใน Lockwood, 1979; Merck, 1989)

การค้นพบและการศึกษาเกี่ยวกับกรดกลูโคนิก

ในปี คศ. 1870 มีการค้นพบกรดกลูโคนิกโดย Hlasiwetz และ Habermann (อ้างถึงใน Milsom และ Merrs,1985) ต่อมาในปี คศ. 1878 พบว่าจุลินทรีย์ *Mycoderma aceti* (*Acetobacter aceti*) สามารถผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลกลูโคส (อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959) และในปีคศ. 1880 Boutroux ได้แยกเกลือแคลเซียมออกจากการหมักน้ำตาลกลูโคสในภาวะที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตโดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Mycoderma aceti* ต่อมาในปี 1922 Molliard แสดงให้เห็นว่ากรดกลูโคนิกสามารถสร้างได้โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Sterigmatocystis niger* (*Aspergillus niger*) ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสและปราศจากไนโตรเจน (อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959; Milsom และ Merrs,1985) ในปีคศ. 1924 Bernhauer พบว่าในการผลิตกรดซิตริกโดยการหมักด้วย *Aspergillus niger* จะได้กรดกลูโคนิกเป็นผลผลิตร่วม และต่อมาในปีคศ. 1928 Bernhauer สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ของ *A. niger* ที่สร้างเฉพาะกรดกลูโคนิกภายใต้ภาวะที่จำเพาะ (อุณหภูมิต่ำ , มีไนโตรเจนน้อย) (อ้างถึงใน Milsom และ Merrs,1985) ขณะที่ในปีคศ. 1927 May และคณะได้ศึกษาเชื้อราหลายชนิดที่สามารถผลิตกรดกลูโคนิกได้และพบว่า *Penicilium leteum purpurogenum group* สามารถผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลเดกโตรสโดยปราศจากผลผลิตร่วม

และศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักแบบผิวหน้า และต่อมาในปีคศ. 1929 Mayและคณะก็ได้ศึกษาการหมักกรดกลูโคนิกด้วย *Penicilium leteum purpurogenum* ในถังหมักระดับโรงงานต้นแบบที่ทำจากอลูมินัมคุณภาพสูงและได้ผลผลิตของกรดกลูโคนิคเป็นร้อยละ 57 ของน้ำตาลตั้งต้นใน 11 วัน (อ้างถึงใน Milsom และ Merrs, 1985) ปีคศ. 1931 Currie และคณะเริ่มใช้ถังหมักที่มีการกวนและให้อากาศในการผลิตกรดกลูโคนิก ต่อมาคศ. 1932 Verhave ศึกษาการให้อากาศแก่จุลินทรีย์ใน 2 ลักษณะคือ ให้อากาศปริมาณน้อยสำหรับการเจริญและให้อากาศปริมาณมากสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายพันธุ์ *Acetobacter suboxydans* ต่อมาในปีคศ. 1936 Moyer และคณะศึกษาหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดกลูโคนิกได้ดีขึ้นและได้เลือกสายพันธุ์ *P. chrysogenum* จากการทดสอบ *Penicilia* 50 สายพันธุ์ นำไปเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะการหมักในอาหารเหลวในภาชนะแก้วขนาดเล็ก และปรับภาวะให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์โดยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตและเพิ่มความดันอากาศ ในคศ. 1937 Well และคณะใช้ถังหมักแบบกลองหมุน (rotation drum fermentor) และปรับปรุงการให้อากาศให้เพียงพอต่อความต้องการเพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณสูง ใช้เวลาสั้น มีการใช้จุลินทรีย์ *Aspergillus niger* (NRRL 67) แทน *P. chrysogenum* รวมทั้งการใช้สปอร์เป็นหัวเชื้อ ต่อมา Gastrock และคณะ(1938) ผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมักระดับโรงงานต้นแบบโดยใช้อาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (150 kg m^{-3}) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลผลิตเป็นร้อยละ 95 ของน้ำตาลตั้งต้น ในคศ. 1940 Porges และคณะใช้วิธีการหมักในอาหารเหลวโดยใช้สายใยของ *Aspergillus niger* เป็นหัวเชื้อและสามารถนำสายใยกลับมาใช้ซ้ำในกระบวนการผลิตกึ่งต่อเนื่องได้ (semicontinuous production) ต่อมา Blom และคณะ (1952) ผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมักที่มีการกวนและใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นสารควบคุมความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ได้กรดกลูโคนิกในรูปเกลือโซเดียมกลูโคเนต ซึ่งวิธีนี้ยังเป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบันและได้มีการศึกษาการผลิตโดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆอีกด้วย ในคศ. 1980 Nyeste และคณะ ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกด้วยวิธีการหมักโดย *Acetobacter suboxydans* ATCC621 และต่อมา คศ. 1983 Oosterhuis และคณะแสดงถึงปัจจัยทางกายภาพที่มีผลในการหมักด้วย *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H วัน (อ้างถึงใน Milsom และ Merrs,1985)

ประโยชน์ของกรดกลูโคนิก อนุพันธ์ของกรดและเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

1. **ทางการแพทย์**

แคลเซียมกลูโคเนต ใช้ตรวจและรักษาผู้ป่วยที่ขาดแคลเซียมในร่างกาย (Ward,1967 ; Casida ,1968 ; Milsom และ Meers,1985; Bigelis และ Tsai, 1995)

โซเดียมกลูโคเนต ใช้ละลายก้อนเลือดที่แข็งตัว (Ward ,1967)

เฟอรัสกลูโคเนต ใช้รักษาโรคโลหิตจางและใช้ในเคมีบำบัด (Prescott และ Dunn ,1959 ; Casida ,1968 ; Milsom และ Meers ,1985)

กรดกลูโคนิก ช่วยเพิ่มจำนวนของเชื้อ Bifidobacterium ในลำไส้ (จดหมายข่าวอายิโนะโมะโต๊ะ , 2536)

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ใช้ในการตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดและปัสสาวะ นิยมใช้ตรวจเบาหวาน (Ward, 1967; Merck, 1989; Caridis และคณะ, 1991; Wilson และ Turner, 1992)

2. **ผลิตภัณฑ์อาหาร**

ผสมกรดกลูโคนิกในหมากฝรั่งเพื่อป้องกันการตกผลึกของน้ำตาลซอร์บิทอล ซึ่งเป็นสารให้ความหวานในหมากฝรั่ง (Pederson และ Sonder, 1981)

ผสมกรดกลูโคนิก และกลูโคโนเดลตาแลคโตนในเต้าหู้ เพื่อช่วยทำให้เต้าหู้แข็งตัวและมีรสเปรี้ยว นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวน *Bifidobacterium* sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้มนุษย์และยับยั้งการเจริญของ *Clostridium perfringen* นอกจากนี้ยังพบอีกว่ากรดกลูโคนิกสามารถถูกใช้ได้ใน *Bifidobacterium adolescentis* group *Clostridium clostridiiforme* *Clostridium innocum* *Propionibacterium acnes* *Megasphaera elsdenii* *Enterococcus faecium* และ *Klebsiella pnemoniae* (จดหมายข่าวอายิโนะโมะโต๊ะ, 2536; Asano และคณะ, 1994; Asano และคณะ, 1995)

กรดกลูโคนิก ใช้เติมลงในเนื้อบรรจุหีบห่อเพื่อทำให้เกิดสีแดงน่ารับประทานและเก็บไว้ได้นาน (Ward, 1967; Zepeda และคณะ, 1994)

แคลเซียมกลูโคเนต ใช้ผสมในอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ปีกทำให้เปลือกไข่แข็งขึ้น (Das และ Kundu, 1987)

โซเดียมกลูโคเนต ใช้ป้องกันการตกตะกอนของนมและเบียร์ (Ward, 1967; Su และคณะ,1977)

แลมด้ากลูโคโนแลกโตน - ใช้ในการทำขนมปัง , ช่วยควบคุมความเป็นกรดและสีในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และใช้ปรับปรุงการผลิตเนยแข็งโดยจะทำหน้าที่เป็นตัวก่อภาวะกรดเพื่อทำให้นมเกิดการจับตัว (Ward,1967; Rohr, 1983; Bigelis และ Tsai, 1995)

กลูโคโนเดลตาแลคโตน ใช้เป็นส่วนผสมของผงฟูในการทำขนมปัง เนื่องจากเมื่อใส่กลูโคโนเดลตาแลคโตนลงไปในแป้งทำขนมปังจะช่วยควบคุมการปลดปล่อยของคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้ขนมปังฟูสม่ำเสมอ (Prescott และ Dunn, 1959; Ward, 1967; Milsom และ Meer, 1985; Das และ Kundu, 1987; Markwell และคณะ, 1989)

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ใช้ป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นของอาหาร (กำจัดออกซิเจน) เนื่องจากออกซิเจนอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสของอาหารบางชนิดได้ จึงมีการใส่เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เพื่อลดออกซิเจนในอาหารและเครื่องดื่ม ได้แก่ น้ำส้ม เบียร์ สาเก ไวน์ มายองเนส น้ำแต่งสลัด และอาหารแห้ง อีกทั้งยังใช้ในการบรรจุอาหารแบบปราศจากออกซิเจน (Ward, 1967; Richter, 1983)

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ใช้กำจัดกลูโคส เพื่อป้องกันการเกิดสีน้ำตาลและกลิ่นในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีโปรตีนสูงเช่น ไข่ผง แป้งสาลี ในกรณีนี้อาจใช้ร่วมกับเอนไซม์คะตะเลสหรือไม่ก็ได้ เนื่องจากในปฏิกิริยาของกลูโคสออกซิเดสจะให้ผลผลิตเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งอาจจะก่อกลิ่นแปลกปลอมได้ถ้ามีปริมาณสูง ในบางผลิตภัณฑ์ก็ไม่มีความจำเป็นต้องกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกด้วยเอนไซม์คะตะเลส ทั้งนี้เพราะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535; Ward, 1967; Merck, 1989; Hatzinikolao และ Macris, 1995)

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและเอนไซม์คะตะเลส มีผลยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas fluorescens* *Hansenula polymorpha* และ *Acinetobacter calcoaceticus* ส่วน *Corynebacter aguaticum* จะถูกยับยั้งการเจริญโดยกรดกลูโคนิกซึ่งจุลินทรีย์ที่กล่าวมาเป็นจุลินทรีย์ที่มักพบในกุ้ง (Kantt และ Torres, 1993)

3. **ทางด้านอุตสาหกรรม**

แคลเซียมกลูโคเนต ใช้เป็นตัวแยกโลหะที่ดีในสารละลายด่าง เช่น แยกเหล็ก อะลูมิเนียม , คอปเปอร์ และอื่นๆ (Casida ,1968)

กรดกลูโคนิก แอมโมเนียมกลูโคเนต ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยากรด (acid catalyse) หรือตัวเร่งการเกิดกรด (acid forming catalyse) (Prescott และ Dunn,1959)

โซเดียมกลูโคเนต สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ดังนี้

- ใช้ในอุตสาหกรรมเส้นใยสิ่งทอ โดยโซเดียมกลูโคเนตจะเป็นสารป้องกันไม่ให้มีการปนเปื้อนของเหล็กในกระบวนการย้อมผ้า (Blom และคณะ, 1952) และป้องกันการเกาะติดของเกลือที่ปะปนอยู่ในน้ำกระด้างบนผ้า

- ใช้ในอุตสาหกรรมย้อมสีหนัง ป้องกันการตกตะกอนของไฮดรอกไซด์ของโลหะบางชนิดที่ใช้ในกระบวนการย้อมสีหนัง (Prescott และ Dunn, 1959; Bucke, 1983)

- ใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาทำความสะอาดโลหะ ป้องกันสนิม โดยเฉพาะในกรณีที่ใช้น้ำกระด้างซึ่งจะเกิดสนิมได้ง่าย ใช้ทำความสะอาดแก้วภาชนะต่างๆ และเป็นองค์ประกอบของน้ำยาทำความสะอาดหนัง (Lockwood, 1979; Milsom และ Meer, 1985)

- ใช้ในอุตสาหกรรมปูนซีเมนต์ โดยการเติมไปในปูนซีเมนต์จะควบคุมระยะเวลาการแข็งตัวของปูนซีเมนต์ เพิ่มความแข็งแรงของปูนซีเมนต์และลดปริมาณน้ำที่ใช้ในการผสม (Ward, 1967; Lockwood, 1979; Milsom และ Meer, 1985; Biagini และคณะ, 1988)

- ใช้ในอุตสาหกรรมภาพถ่ายช่วยให้สารเคมีที่ใช้มีความเสถียรและป้องกันการตกตะกอนของโลหะออกไซด์ในถังบรรจุด่าง (Prescott และ Dunn, 1959; Ward, 1967)

สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิก

เนื่องจากกรดกลูโคนิกมีประโยชน์มากดังกล่าวข้างต้น จึงมีผู้สนใจทำการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตกรดกลูโคนิกและได้จดสิทธิบัตรไว้มากมาย ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิก

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Herbert (1972)	US 3669840	Gluconic acid production
Bergmeyer และ Jaworek (1976)	US 3935017	Process for the conversion of glucose into gluconic acid
Muller และคณะ (1980)	US 4242245	Process for the simultaneous production of fructose and gluconic acid from glucose-fructose mixtures (เป็นการใช้วิธีทางเคมี)

ตารางที่ 4 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิก (ต่อ)

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Hartmeier (1987)	US 4460686	Glucose oxidation with immobilized glucose oxidase-catalase
Scopes, Rogers และ Leigh (1988)	US 4755467	Method for the production of sorbitol and gluconate
Bringer-Meyer และ Sahn (1991)	US 5017485	Process for obtaining sorbitol and gluconic acid by fermentation, and cell material suitable for this purpose
Rehr และ Sahm (1991)	EP 0427150	Process for production of sorbitol and gluconic acid or gluconate and biomass therefor
Rehr และ Sahm (1992)	US 5102795	Process for obtaining sorbitol and gluconic acid or gluconate
Rehr และ Sahm (1993)	US 5190869	Process for obtaining sorbitol and gluconic acid or gluconate using *Zymomonas mobilis*
Yu และคณะ (1996)	US 5677340	Method of using gluconic acid or gluconolactone for treating wrinkles
Vroemen และ Beverini (1999)	US 5897995	Enzymatic production of gluconic acid or its salts
Savas และคณะ	US 5962286	Process for the production of gluconic acid with a strain of Aureobasidium pullulans (debary) Arnaud

ตารางที่ 4 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิก (ต่อ)

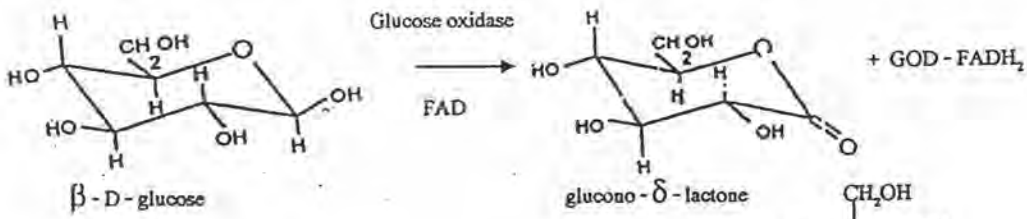
ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Oreste และ Jayarama (1999)	US 5998179	Process for the preparation of gluconic acid and gluconic acid produced thereby

กระบวนการทางชีวเคมีในการผลิตกรดกลูโคนิก

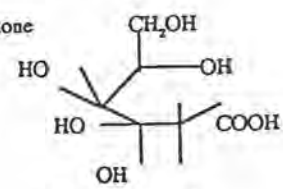
การผลิตกรดกลูโคนิกโดยจุลินทรีย์ เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคส ไปเป็นกรดกลูโคนิกโดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสซึ่งจะเปลี่ยนหมู่อัลดีไฮด์ไปเป็นหมู่คาร์บอกซี (Rogalski และคณะ, 1988; Markwell และคณะ, 1989; Caridis และคณะ, 1991; Wilson และ Turner, 1992; Velizarov, และ Beschkov, 1994) ดังสมการต่อไปนี้

รูปที่ 1 ขั้นตอนการเกิดกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลกลูโคส (Bucke, 1983; Das และ Kundu, 1987; Kubicek และคณะ, 1994)

1.



2. glucono - δ - lactone + H_2O —glucono-δ-lactonase→



gluconic acid

3. glucose oxidase-$FADH_2$ + O_2 ⟶ H_2O_2

4. H_2O_2 —catalase→ H_2O +1/2 O_2

5. สมการรวม

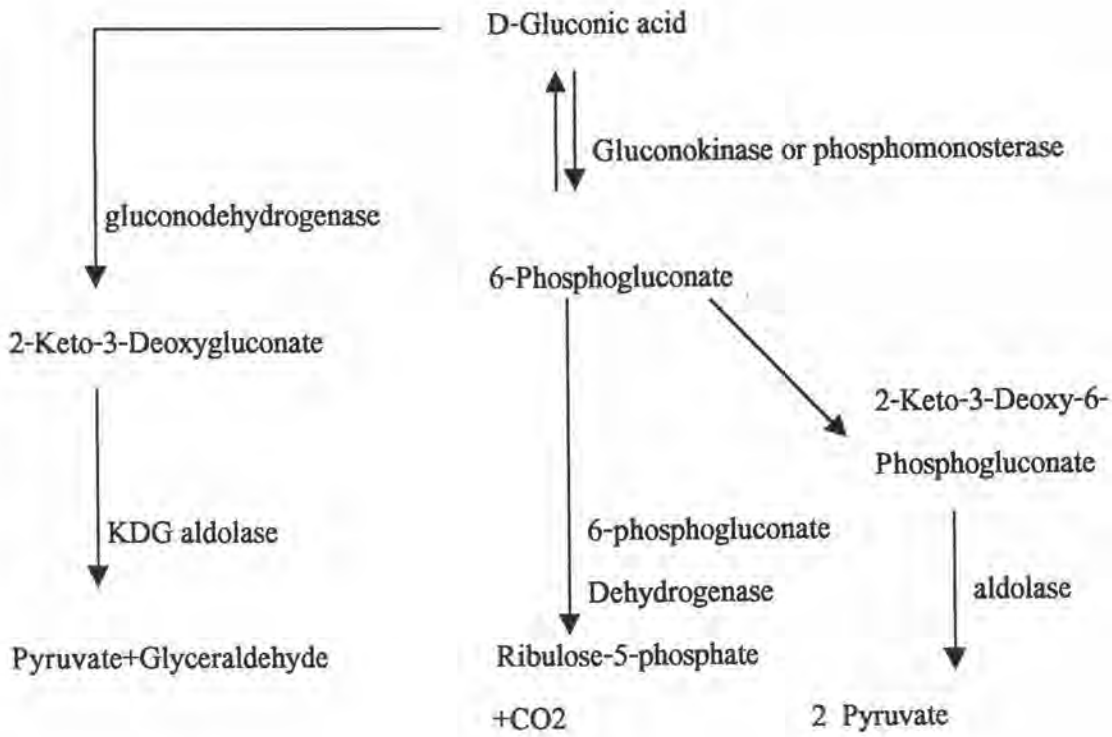
β - glucose + O_2 + H_2O ⟶ gluconic acid + H_2O +1/2 O_2

จากสมการที่ 1 เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (β-D-glucose : oxygen -1- oxidoreductase, E.C.1.1.3.4) เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนกลูโคส (เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะไปดึงอะตอมไฮโดรเจน 2 อะตอมออกมาจากน้ำตาลกลูโคส) ให้เป็นดี-กลูโคโนเดลตาแลคโตน (D-glucono-δ-actone)โดยมีฟลาวินอาดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Flavine adenine dinucleotide, FAD) เป็นเอนไซม์ร่วม (Coenzyme) (Bucke, 1983; Milsom และ Meers, 1985; Wilson และ Turner, 1992) หลังจากนั้นมีการไฮโดรไลซ์ดี-กลูโคโนเดลตาแลคโตนต่อได้เป็นกรดกลูโคนิก

โดยปกติดี-กลูโคโนเดลตาแลคโตนจะเปลี่ยนเป็นกรดกลูโคนิกได้เองตามธรรมชาติโดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ แต่ถ้ามีเอนไซม์แลคโตเนส (lactonase) จะช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้น (สมการ 2) ส่วนเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่เปลี่ยนรูปไปจะรวมตัวกับออกซิเจนได้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (สมการ 3) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส แต่ในจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดกลูโคนิกได้เช่น *Aspergillus niger* จะมีเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ซึ่งสามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำกับออกซิเจนได้ (สมการ 5) (Van Dijken และ Veenhuis, 1980; Rohr และคณะ, 1983; Milsom และ Meers, 1985; Millsom, 1986; Das และ Kundu,1987; Witteveen และคณะ, 1992; Hellmuth และคณะ, 1995)

ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมกรดกลูโคนิกที่ได้จาก *Aspergillus niger* หรือจุลินทรีย์อื่นๆมักถูกสะสมไว้ในปริมาณมากโดยไม่มีการนำมาใช้ แต่จริงๆแล้วจุลินทรีย์สามารถนำเอากลูโคเนตมาใช้ได้ เช่น ในปี 1969 Laskshminarayana และคณะได้รายงานว่า *Aspergillus niger* สามารถเจริญโดยใช้กลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอนได้เมื่อเจริญที่ค่าความเป็นกรดค่างต่ำ (อ้างถึงใน Milsom และ Meers, 1985) และได้มีการรายงานถึง pathway ต่างของจุลินทรีย์ในการนำกรดกลูโคนิกไปใช้ดังในรูปที่ 2 (Milsom และ Meers, 1985; Mattey,1992) นอกจากนี้ยังพบว่า *Zymomonas mobilis* สามารถเปลี่ยนกรดกลูโคนิกเป็นเอทานอลได้โดยใช้ Entner Doudoroff pathway (Chun และ Rogers, 1988)

รูปที่ 2 แผนภาพแสดงการนำกรดกลูโคนิกไปใช้ (Milsom และ Meers, 1985; Mattey,1992)



เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตกรดกลูโคนิก

1. เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (β-D- glucose : oxygen -1 - oxidoreductase, E.C.1.1.3.4)

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นที่รู้จักกันมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1904 โดยสกัดได้จาก *Aspergillus niger* เพื่อนำไปใช้ออกซิไดส์กลูโคส (อ้างถึงใน Bucke, 1983) พบเอนไซม์นี้ได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น *Aspergillus niger Penicillum notatum Penicillum amagasakiense Penicillum glaucum Penicillum purpurogenum* แต่การเตรียมเอนไซม์เพื่อนำมาใช้มักเตรียมมาจาก *Aspergillus niger* ซึ่งจากการศึกษาเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เกาะอยู่ภายในเซลล์ (cell bound enzyme) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160,000 มีโคเอนไซม์คือ FAD 2 หน่วยและมีคาร์โบไฮเดรต 16% เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจนไปยังออกซิเจน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาคือ กลูโคโนเดลตาแลคโตน เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมีความจำเพาะกับน้ำตาลกลูโคสในรูปบีต้า (β form) สูง (O'Malley และ Weaver, 1972; Bucke, 1983; Hartmeier และ Doppner, 1983; Hatzinikolaou และ Macris, 1995; Chu และคณะ, 1997) แต่น้ำตาลกลูโคสที่อยู่ในรูปอัลฟา (α-form) สามารถเปลี่ยนเป็นรูปบีต้าได้โดยการเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรืออาศัยเอนไซม์มิวทาโรเทส (Mutarotase;aldose1-epimerase, E.C.5.1.3.3)

ซึ่งพบได้ในจุลินทรีย์ บางชนิด เช่น *Aspergillus niger* (Milsom และ Meers, 1985) นอกจากนี้ในการทำงานของกลูโคสออกซิเดสนั้นอาจถูกยับยั้งได้ถ้ามี เงิน ปรอท และทองแดง (Nukamura และ Ogura, 1968; Wilson และ Turner, 1992; Hatzinikolaou และ Macris, 1995) และในปี 1996 Lu และคณะ ได้ทดลองผลิตเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจากสายใยที่เหลือทิ้ง (waste mycelium) จากการผลิตโลหะกลูโคเนต พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือสูงๆ โลหะคลอไรด์และโลหะกลูโคเนตจะยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของกลูโคสออกซิเดส

2. เอนไซม์กลูโคโนแลคโตเนส (glucono - δ - lactonase E.C.3.1.1.17)

เอนไซม์กลูโคโนแลคโตเนสมีบทบาทต่อกลูโคโนเดลตาแลคโตนซึ่งเป็นสารมัธยันต์ในการผลิตกรดกลูโคนิค โดยปกติกลูโคโนเดลตาแลคโตนจะเปลี่ยนเป็นกรดกลูโคนิกได้เองตามธรรมชาติโดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ แต่ถ้ามีการสะสมกลูโคโนเดลตาแลคโตนมากจะทำให้มีผลยับยั้งการออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคส ดังนั้นถ้ามีเอนไซม์แลคโตเนส (lactonase) ก็จะช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้น ซึ่งเอนไซม์นี้พบใน *Aspergillus niger* ด้วย (Su และคณะ, 1977; Milsom และ Meers, 1985; Wilson และ Tuner, 1992; Hellmuth และคณะ, 1995)

3. เอนไซม์คะตะเลส (H_2O_2 : oxidoreductase, E.C.1.11.1.6)

เอนไซม์คะตะเลสพบใน *Aspergillus niger* ซึ่งมักจะพบเอนไซม์คะตะเลสร่วมกับกลูโคสออกซิเดส นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ชนิดนี้ใน *Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae* และ *Bacillus subtilis* (Hartmeier และ Doppner, 1983; Caridis และคณะ, 1991) เอนไซม์คะตะเลสสามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตกรดกลูโคนิกให้เป็นออกซิเจนกับน้ำได้ เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นเป็นพิษต่อเซลล์มีผลทำให้เซลล์ตาย ทั้งยังพบว่าเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสไวต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของเอนไซม์ได้ (Kleppet, 1966; Casida, 1968; Milsom และ Meers, 1985; Millsom, 1986)

วิธีการผลิตกรดกลูโคนิก

การผลิตกรดกลูโคนิก สามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมีและวิธีการหมักด้วยจุลินทรีย์

1. **วิธีทางเคมี** เป็นการเปลี่ยนกลูโคสเป็นกลูโคโนเดลตาแลกโตนโดยการให้อากาศหรือออกซิเจนในภาวะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเช่น แพลตินั่มเป็นต้นหรือใช้วิธีอิเล็กโตรเคมิคอลออกซิเดชั่นในภาวะที่มีโบร์ไมด์อิออน (Prescott และ Dunn, 1959; Muller, 1980; Milsom และ Meers, 1985)

2.**วิธีการหมัก** จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์สามารถผลิตกรดกลูโคนิกได้เช่น *Aspergillus niger* *Acetobacter (Gluconobacter) suboxydan* *Pseudomonas ovalis* *Pseudomonas fluoresence* *Morexella sp.* *Tetracoccus sp* *Pullularia sp.* *Micrococcus sp.* *Enterobacter sp.* *Scopulariopsis sp.* *Gonatobotrys sp.* *Endomycopsis sp.* โดยความสามารถในการผลิตและภาวะที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไปดังเช่นตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 5 ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้วิธีการหมักในอาหารเหลวด้วยจุลินทรีย์ *Aspergillus niger* หรือ *Gluconobacter suboxydan* โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูง สามารถแยกกรดกลูโคนิกออกจากน้ำหมักได้ง่าย แต่ในการผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Gluconobacter suboxydan* จะได้กรดคีโตกลูโคนิกปนมาด้วยจึงไม่เหมาะสม (Milsom และ Meers, 1985; Seiskari และคณะ, 1985)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการผลิตกรดกลูโคนิกและเกลือกลูโคเนตโดยใช้วิธีการหมักโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	อุณหภูมิ (°C)	วิธีการหมัก	ช่วงเวลาที่ใช้ในการหมัก	ผลผลิตหลัก	เอกสารอ้างอิง
Penicillium chrysogenum	30	หมักบนผิวหน้าอาหารหรือหมักในอาหารเหลว	8-10 วัน	กรดกลูโคนิกและแคลเซียมกลูโคเนต	อ้างถึงใน Prescoot และ Dunn, 1959
Aspergillus niger NRRL67	30	หมักในอาหารเหลว	9-18 ชั่วโมง	กรดกลูโคนิกและแคลเซียมกลูโคเนต	อ้างถึงใน Prescoot และ Dunn, 1959
Aspergillus niger NRRL67	33-34.4	หมักในอาหารเหลว	หลัง 40 ชั่วโมง	โซเดียมกลูโคเนต	อ้างถึงใน Prescoot และ Dunn, 1959
Pullularia pullulans	26	หมักในอาหารเหลว	35 ชั่วโมง	โซเดียมกลูโคเนต	Su และคณะ, 1977

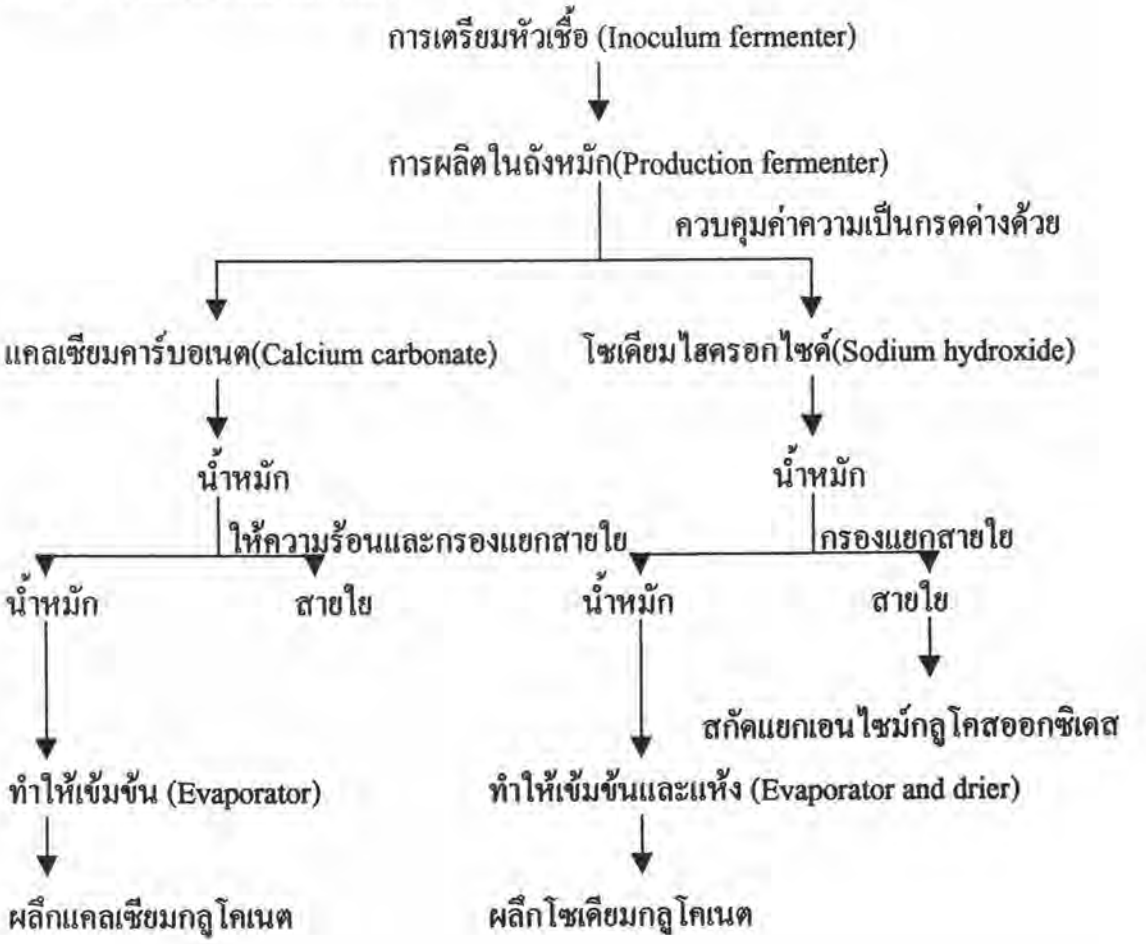
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการผลิตกรดกลูโคนิกและเกลือกลูโคเนตโดยใช้วิธีการหมักโดยจุลินทรีย์ (ต่อ)

จุลินทรีย์	อุณหภูมิ (°C)	วิธีการหมัก	ช่วงเวลาที่ใช้ในการหมัก	ผลผลิตหลัก	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus niger CCM8004	30	หมักในอาหารเหลว	40 ชั่วโมง	กรดกลูโคนิก	Rosenbergและคณะ, 1992
Aspergillus niger G-3	30	หมักในอาหารเหลว	65-70 ชั่วโมง	กรดกลูโคนิก	Vassilev และคณะ, 1993
Aspergillus niger ATCC9029	30	หมักในอาหารเหลว	120 ชั่วโมง	กรดกลูโคนิก	Dronawat และคณะ, 1995
Aspergillus niger NRRL3, 567, 599	33.5	หมักในอาหารเหลว	200 ชั่วโมง	กรดกลูโคนิก	Moksia และคณะ, 1996

แต่ในระหว่างการผลิตด้วยวิธีการหมัก พบว่าเมื่อมีการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปกรดอิสระออกมาในอาหาร จะส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารลดลงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งภาวะที่มีความเป็นกรดสูงมีผลยับยั้งการหมักและทำลาย สายใยทำให้ไม่สามารถนำสายใยมาใช้ซ้ำได้ จึงมีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Prescoot และ Dunn, 1959; Casida, 1968; Milsom และ Meers, 1985; Das และ Kundu,1987; Zidwick, 1992; Bigelis และ Tsai, 1995) ในการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ผลิตภัณฑ์ในรูปแคลเซียมกลูโคเนต และใช้ความเข้มข้นของกลูโคสประมาณ 13-15% เพื่อป้องกันการเกิดผลึกของแคลเซียมกลูโคเนตซึ่งอาจจะส่งผลยับยั้งการหมักได้ (Gastrock และ Porges, 1938; Prescoot และ Dunn, 1959; Das และ Kundu,1987) หากต้องการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสทำโดยเติมโบรอน (boron) ในรูป dry boric acid หรือโบแรก (borax) เพื่อช่วยในการละลายของแคลเซียมกลูโคเนต ซึ่งพบว่าสามารถใช้ความเข้มข้นของกลูโคสได้ถึง 35% เมื่อเติมโบรอน 2500 ppm ซึ่ง

เป็นปริมาณที่ศึกษาแล้วว่าอยู่ในระดับที่เหมาะสมโดยการเติมจะทำหลังจากเริ่มกระบวนการหมักไปแล้วระยะหนึ่งเพื่อป้องกันไม่ให้โบรอนที่เติมไปยับยั้งการหมัก ผลผลิตที่ได้จะอยู่ในรูปแคลเซียมโบโรกลูโคเนต (Calcium borogluconate) การผลิตในรูปนี้ยุ่งยากในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (Prescoot และ Dunn, 1959; Ward, 1967; Casida, 1968; Das และ Kundu,1987; Rohr,1983; Zidwick, 1992) สำหรับการผลิตในรูปโซเดียมกลูโคเนตใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 6.0-6.5 (Blom และคณะ, 1952) เมื่อสิ้นสุดการหมักน้ำหมักที่ได้จะถูกนำไปกรองหรือปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสายใยและของเหลวออกจากกันโดยเก็บส่วนของเหลวไว้ใช้ในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวต่อไป ส่วนสายใยนำไปสกัดแยกเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเพื่อขายต่อไปได้อีกด้วย สรุปขั้นตอนการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปเกลือแคลเซียมกลูโคเนตและเกลือโซเดียมกลูโคเนตโดยวิธีการหมักได้ ดังแสดงในรูปที่ 3

รูปที่3 ขั้นตอนการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตและโซเดียมกลูโคเนต (Rohr, 1983; Milsom และ Meers, 1985)



ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมนั้นเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงจึงต้องมีการควบคุมปัจจัยต่างๆในกระบวนการผลิตเช่น ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณออกซิเจน ปริมาณหัวเชื้อให้เหมาะสม เป็นต้น ซึ่งจะเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตอีกด้วย การลดต้นทุนการผลิตอาจทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สายใยอิสระซ้ำ (จินตนา ไกรวัฒนพงศ์, 2536; Hatcher, 1972) การใช้สายใยตรึง (กุลธิรา สู่สุข, 2538; นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539; เยาวภา ทองอร่าม, 2540; Vassilev และคณะ, 1993) นำสปอร์มาใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิกเพื่อลดขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอกเป็นการประหยัดเวลาและอาหารเลี้ยงเชื้อ (Moksia และคณะ, 1996) การเลือกใช้วัตถุดิบที่หาง่ายและราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอนเช่น แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้ว (บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536; Su และคณะ, 1977; Kundu และ Das, 1982) แป้งข้าวโพดที่ย่อยแล้ว (Vassilev และคณะ, 1993) แป้งข้าวโพดป่น (Ziffer และคณะ, 1969) น้ำตาลซูโครส (Rosenberg และคณะ, 1992; Novak และคณะ, 1996) มอลโทส (Cho และ Bailey, 1977)

การเลือกใช้แหล่งคาร์บอน

สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดกลูโคนิกได้หลายชนิดเช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโทส น้ำเชื่อมน้ำตาลเดกโทรส และแป้งชนิดต่างๆที่ผ่านกระบวนการย่อยสลาย (Cho และ Bailey, 1977; Su และคณะ, 1977; Milsom และ Meers,1985; Rosenberg และคณะ, 1992; Vassilev และคณะ, 1993; Novak และคณะ, 1996) ซึ่งจากงานวิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือแป้งชนิดต่างๆที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายและน้ำตาลซูโครส

น้ำตาลกลูโคส

เป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ดีและเป็นที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิกได้โดยตรงในทันที แต่น้ำตาลชนิดนี้มีราคาสูงซึ่งจะส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงตามไป

แป้งชนิดต่างๆที่ผ่านกระบวนการย่อยสลาย

แป้งก็เป็นแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้ทดแทนน้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดกลูโคนิกได้เช่น แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้ว (บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536; Su และคณะ, 1977; Kundu และ Das, 1982) แป้งข้าวโพดที่ย่อยแล้ว (Vassilev และคณะ, 1993) แป้งข้าวโพดป่น (Ziffer และคณะ, 1969) เนื่องจากโครงสร้างของแป้งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,4 (α1,4)และแอลฟา 1,6 (α1,6) เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสก็จะได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำมาผลิตกรดกลูโคนิกได้ (Bigelis,1992) แม้ว่าแป้งจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกกว่าน้ำตาลกลูโคสแต่ในการนำแป้งมาใช้จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการย่อยก่อน

น้ำตาลซูโครส

น้ำตาลซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เชื่อมต่อกับน้ำตาลฟรักโทส 1 โมเลกุลด้วยพันธะ 1,2 ไกลโคซิดิก พบในอ้อยและหัวบีท มีรสหวาน สามารถสลายพันธะดังกล่าวซึ่งทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรักโทสได้โดยการใช้กรดอ่อนหรือการใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสซึ่งพบได้ในจุลินทรีย์จำนวนมาก น้ำตาลชนิดนี้ใช้เป็นสารให้ความหวานที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในอาหารและอุตสาหกรรมต่างๆ (Merck, 1989)

มีการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆเช่น เอทานอล บิวทานอล กลีเซอรอล กรดซิตริก กรดกลูโคนิก กรดอิทาโคนิก โอลิโกฟรักโทส ซอลบิทอล ลีแวน เป็นต้น (Viikari, 1984; Chun และ Rogers, 1988; Roukas และ Harvey, 1988; Hirayama และคณะ, 1989;Kautola และคณะ,1989; Merck, 1989; Doelle และคณะ,1990; Zidwick, 1992; Rosenberg และคณะ, 1992; Novak และคณะ, 1996)

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยน้ำตาลซูโครส

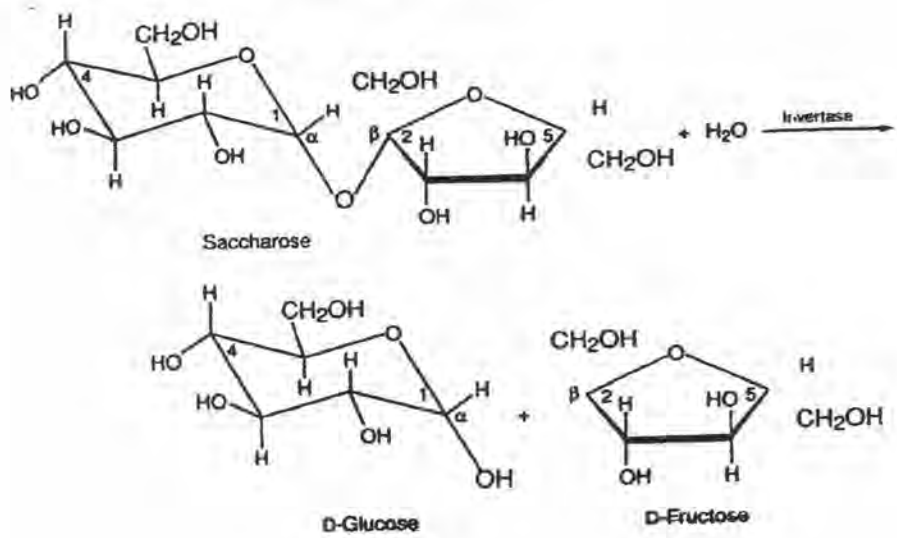
เอนไซม์อินเวอร์เทส (EC3.2.1.26)

เป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายพันธะไกลโคซิดิกระหว่างกลูโคสกับฟรักโทสในโมเลกุลซูโครส แยกเอนไซม์นี้ได้ครั้งแรกจากยีสต์ในปี 1860 โดย Berthelot จากนั้นก็ได้มีการนำมาศึกษากันอย่างแพร่หลาย พบเอนไซม์นี้ได้ในพืช และจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น อัลฟาลฟา (alfalfa) guar

beans, green coffee beans, *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces carlsbergensis* และ *Aspergillus niger* เป็นต้น (Merck, 1989; Barker และ Shirley, 1980; Helmut, 1998) อินเวอร์เทสเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) สกัดออกมาได้โดยการทำลายผนังเซลล์ ปัจจุบันการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้เพื่อใช้ในทางการค้าจะผลิตจากยีสต์ (Helmut, 1998)

เอนไซม์อินเวอร์เทสทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลซูโครสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรักโทสโดยจะตัดพันธะไกลโคซิดิกที่เชื่อมระหว่างคาร์บอนตัวที่ 1 ของกลูโคสกับคาร์บอนตัวที่ 2 ของฟรักโทส (Merck, 1989; Barker และ Shirley, 1980; Helmut, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 4

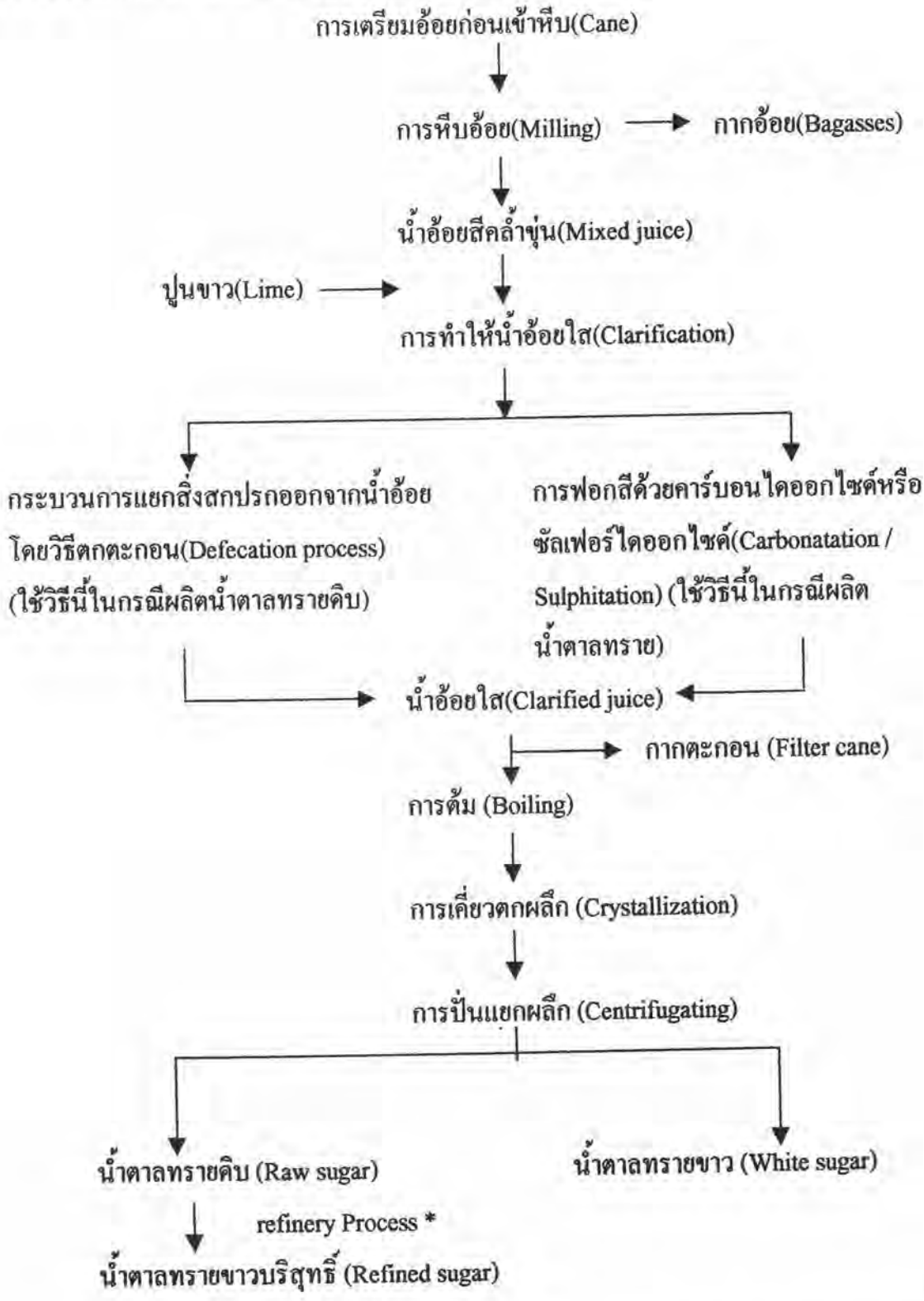
รูปที่ 4 การทำงานของอินเวอร์เทส (Helmut, 1998)



น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (refined cane sugar)

คือผลึกน้ำตาลซูโครสที่มีความบริสุทธิ์สูงมาก สีขาว สะอาด มีกากน้ำตาลติดอยู่เป็นส่วนน้อยที่สุด ผลิตจากน้ำอ้อยแล้วทำให้ได้น้ำตาลทรายดิบ จากนั้นนำน้ำตาลทรายดิบมาล้างคราบกากน้ำตาลและสิ่งสกปรกที่หุ้มรอบผลึกออกด้วยน้ำเชื่อมหรือกากน้ำตาลคุณภาพ ปานกลาง ซึ่งทำให้ร้อนแล้วปั่นแยกผลึกน้ำตาล นำผลึกมาละลายเป็นน้ำเชื่อมดิบ จากนั้นนำมาผ่านเข้ากรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์และฟอกสีด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเรซินแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange resin) หรือใช้ปูนขาวกับกรดฟอสฟอริคและเรซินแลกเปลี่ยนประจุ (ภัทรา จันทราทิตย์, 2542)

กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย (ภัทรา จันทราทิตย์, 2542)



*** = ทำให้บริสุทธิ์และฟอกสีด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเรซินแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchangeresin) หรือใช้ปูนขาวกับกรดฟอสฟอริคและไอออนเอกเชนจ์]**

น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์เป็นน้ำตาลที่นิยมใช้ในครัวเรือนเพื่อการประกอบอาหาร หรือใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆเช่น ผลิตภัณฑ์ลูกกวาดและขนม เครื่องดื่ม นม ผลไม้อบแห้ง ผลไม้กระป๋อง เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณการซื้อขายน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ ของอุตสาหกรรมต่างๆและผู้ค้าส่ง ระหว่างปี 2538-2541 (ฝ่ายวิทยาศาสตร์น้ำตาลทราย, 2542)

ประเภทอุตสาหกรรม	ปริมาณการซื้อขาย (กระสอบ)			
	2538	2539	2540	2541
เครื่องดื่ม	1378535.50	1354823.50	1667470.40	1936579.50
ขนมปัง (รวมสุราและเบียร์)	476325.10	515146.00	733100.10	216537.00
อาหาร (รวมอาหารกระป๋อง)	399359.50	469706.50	681491.50	2121258.50
ผลิตภัณฑ์นม	738809.00	799508.70	982033.50	1500712.00
ลูกกวาด	38191.00	73297.00	86131.50	226145.50
ยาและอื่นๆ	369594.20	543583.00	795959.50	1069053.50
รวมปริมาณซื้อของอุตสาหกรรม	3400814.30	3756064.70	4946186.50	7070286.00
ผู้ค้าส่ง	11833275.95	12044372.77	12170144.84	9910950.82
รวมทั้งสิ้น	15234090.25	15800437.47	17116331.34	16981236.82

หน่วย : กระสอบ (1 กระสอบ=100 กก.)

(ข้อมูลล่าสุดที่จัดทำโดยสำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล)

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการใช้น้ำตาลทรายเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกและน้ำตาลฟรักโทส คือได้ผลิตภัณฑ์ทั้งสองในการผลิตครั้งเดียว จึงรวบรวมข้อมูลและประโยชน์ของน้ำตาลฟรักโทสไว้ดังต่อไปนี้

น้ำตาลฟรักโตส

เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ($C_6H_{12}O_6$) มีน้ำหนักโมเลกุล 180.16 มักพบในผลไม้และน้ำผึ้ง สามารถเตรียมได้จากอินูลินโดยการย่อยด้วยกรด หรือซูโครสโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ พบได้ทั้งที่อยู่ในรูปฟูราโนส (furanose) หรือไพราโนส (pyranose) การละลายน้ำของฟรักโทสมีค่าสูงกว่ากลูโคสและซูโครสขณะที่ความหนืดที่เกิดขึ้นจากการละลายต่ำกว่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลอื่นๆเช่นที่อุณหภูมิ 20 °C (อ้างถึงในกล้าณรงค์ ศรีรอด, 2531; Merck, 1989; Mayer, 1993)

	ความสามารถในการละลายน้ำ (น้ำหนัก/น้ำหนักน้ำ 100 กรัม)	ความหนืดของสารในรูปสารละลาย (poise)
ฟรักโทส	78.94 (374.78กรัมต่อน้ำ 100 กรัม)	1.76
กลูโคส	66.60 (66.60กรัมต่อน้ำ 100 กรัม)	10.36
น้ำตาลทราย	47.11 (199.4กรัมต่อน้ำ 100 กรัม)	4.82

น้ำตาลฟรักโทสอาจเกิดการเปลี่ยนรูปไปมาระหว่างน้ำตาลกลูโคส ฟรักโทส และแมนโนสได้ในสภาพเป็นกรดอ่อนๆ (กล้าณรงค์ ศรีรอด, 2531) หรือเปลี่ยนรูปจากฟรักโทสเป็นกลูโคสในลำไส้และตับ (Mayer,1993) หรือเปลี่ยนรูปไปมาระหว่างกลูโคสกับฟรักโทสผ่านรูปซอลบิทอล (Mahler และ Corder, 1971)

ความนิยมใช้น้ำตาลฟรักโทสมีมากขึ้นตามลำดับเนื่องจากสมบัติเด่นบางประการเมื่อเทียบกับน้ำตาลซูโครสดังนี้ (กล้าณรงค์ ศรีรอด, 2532; Hyvonen และ Koivistoinen, 1982)

1. กระตุ้นกลิ่นรส เช่นในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ มีการใช้น้ำเชื่อมฟรักโทสแทนน้ำตาลซูโครสเนื่องจากเชื่อกันว่าน้ำตาลซูโครสทำให้กลิ่นเปรี้ยวของผลไม้หายไป
2. ให้ความหวาน น้ำตาลฟรักโทสเป็นสารที่ให้ความหวานสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลทั่วๆไปดังเช่นที่น้ำหนักเท่ากันแล้ว เมื่อเทียบให้ความหวานของซูโครสเท่ากับ 100 จะได้ค่าความหวานของกลูโคสเท่ากับ 70-80 ฟรักโทสเท่ากับ 140 มอลโทสเท่ากับ 30-50 แลกโทสเท่ากับ 20 ซอลบิทอลเท่ากับ 50 ส่วนน้ำเชื่อมฟรักโทสชนิด 90% มีความหวานในช่วง 120-160 น้ำเชื่อมฟรักโทสชนิด 55% มีความหวานมากกว่า 100 และน้ำเชื่อมฟรักโทสชนิด 42% มีความหวานเท่ากับ 100 จะเห็นว่าสามารถใช้น้ำตาลฟรักโทสในปริมาณที่น้อยกว่า แต่ให้ความหวานเท่ากัน
3. ให้ความดันออสโมติกสูง ซึ่งจะช่วยควบคุมการเน่าเสียที่เกิดจากจุลินทรีย์ได้
4. ลดจุดเยือกแข็งของระบบอาหารให้ต่ำลง ถ้าสารมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมากขึ้น

จุดเยือกแข็งจะลดลงไปเรื่อยๆ ดังนั้นการมีฟรักโทสจำนวนมากในระบบอาหาร (food system) จะทำให้ระบบอาหารมีจุดเยือกแข็งต่ำลงมากกว่าระบบที่มีน้ำตาลซูโครสเพียงอย่างเดียว ทำให้สามารถเก็บอาหารไว้ได้นาน

5. เพิ่มเนื้อสัมผัสและลักษณะปรากฏ ช่วยเพิ่มรสชาติให้กับเครื่องดื่มหรือทำให้ผลไม้กระป๋องมีลักษณะมันวาว

มีการนำน้ำตาลฟรักโทสไปใช้ในกระบวนการผลิตอาหารและเครื่องดื่มต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ขนมปัง แยม เยลลี่ พุดดิ้ง ไอสครีม ชอกโกเลต โยเกิร์ต น้ำผลไม้ นม ปราศจากจุลินทรีย์ (UHT-sterilised milk) และอาหารลดน้ำหนัก (dietetic foods) (Ward, 1967; Hyvonen และ Koivistoinen, 1982) อีกทั้งการย่อยฟรักโทสเป็นไปอย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์หรือฮอร์โมนในร่างกายมนุษย์จึงถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานแก่ผู้ป่วยที่อยู่ในอาการช็อคต้องการแหล่งพลังงานอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะผู้ขาดอินซูลิน (Ward, 1967)

มีการใช้น้ำตาลฟรักโทสทดแทนน้ำตาลทรายมากขึ้นโดยตลาดผู้บริโภครายใหญ่คือสหรัฐ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆดังตัวอย่างข้อมูลในตารางที่ 7 ซึ่งได้รวบรวมโดยฝ่ายวิชาการธนาคารกสิกรไทยเมื่อปี พ.ศ. 2532 และการนำน้ำตาลฟรักโทสมาใช้มักอยู่ในรูปน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลในปริมาณต่างๆกันดังตัวอย่างข้อมูลในตารางที่ 8 ซึ่งรวบรวมไว้เมื่อปี พ.ศ. 2528

ตารางที่ 7 แสดงการใช้น้ำเชื่อมฟรักโทสความเข้มข้นสูง (HFS) ทดแทน น้ำตาลทรายในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ(ฝ่ายวิชาการธนาคารกสิกรไทย, 2532)*

ชนิดอุตสาหกรรม	ความสามารถในการเข้าแทนที่น้ำตาลทรายของ HFS (%)
เครื่องดื่ม	90-100
ขนมอบ	25
อาหารกระป๋อง	60-70
นมและผลิตภัณฑ์นม	35
ขนมลูกกวาด	5
อาหารอื่นๆที่ให้ความหวานทั่วไป	40

หมายเหตุ HFS (High Fructose Syrup) = น้ำเชื่อมฟรักโทสความเข้มข้นสูง

* = เป็นข้อมูลล่าสุดที่ค้นได้

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบและการใช้งานของน้ำเชื่อมฟรักโทสความเข้มข้นสูง (High Fructose Syrup, HFS) (ฝ่ายวิชาการธนาคารกสิกรไทย, 2528)*

ชนิดของน้ำเชื่อมฟรักโทส	ส่วนประกอบ	การใช้งาน
ความเข้มข้น 42%	42% ฟรักโทส 52% เดกซ์โทรส 6% น้ำตาลอื่นๆ	ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำหวาน น้ำอัดลม น้ำผลไม้ อาหารกระป๋อง ขนมปัง ขนมหวาน นมและผลิตภัณฑ์นม ไอศกรีม เป็นต้น
ความเข้มข้น 55%	55% ฟรักโทส 42% เดกซ์โทรส 3% น้ำตาลอื่นๆ	
ความเข้มข้น 90%	90% ฟรักโทส 9% เดกซ์โทรส 1% น้ำตาลอื่นๆ	ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทจำกัดพลังงาน อาหารสุขภาพและอาหารสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน

* = เป็นข้อมูลล่าสุดที่ค้นได้

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิก

1. แหล่งคาร์บอน

ในการผลิตกรดกลูโคนิกสามารถเลือกใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งการเลือกใช้ชนิดแหล่งคาร์บอนจะขึ้นอยู่กับแหล่งของวัตถุดิบ นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้ว ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิก โดย Das และ Kundu (1987) รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นมากกว่า 15% จะทำให้เกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการหมัก และ Rohr และคณะ (1983) ได้รายงานว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Aspergillus niger* อยู่ระหว่าง 110-250 กรัมต่อลิตร (11-25%) สำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลซูโครสนั้นมีรายงานการใช้ความเข้มข้นของซูโครสในช่วง 25-30% ดังนี้ Rosenberg และคณะ (1992) ได้ทำการทดลองโดยใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 30% และต่อมา Novak และคณะ (1996) ใช้ น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 25% ในการผลิตกรดกลูโคนิกได้ผลผลิตกรดกลูโคนิกร่วมกับโอลิโกฟรุกโทไซด์

2. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตกรดกลูโคนิก โดยทั่วไปจะใช้ทั้งในรูปอนินทรีย์ไนโตรเจนและอินทรีย์ไนโตรเจน เช่นเกลือแอมโมเนียมไนเตรต (Moresi และคณะ, 1991) แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Vassilev และคณะ, 1993; Dronawat และคณะ, 1995) ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) (Seiskari และคณะ, 1985; Sakurai และคณะ, 1989; Shiraishi และคณะ, 1989) นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนแล้ว ปริมาณที่ใช้ก็มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิกเช่นกัน สำหรับการผลิตโดยสายใยอิสระควรมีแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมถ้ามีมากเกินไปจะทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตมาก การผลิตกรดจะน้อยลง (Lockwood, 1979; Ward, 1979; Milsom และ Meers, 1985) นอกจากนี้อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะทำให้ได้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงและประหยัดแหล่งไนโตรเจนอีกด้วย โดยการเลือกใช้อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจะขึ้นกับวัตถุประสงค์ของอาหารคืออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญของควรมีปริมาณแหล่งคาร์บอนต่ำแต่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนสูง เมื่อได้สายใยจุลินทรีย์ที่มากพอก็ย้ายมาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่สูง (Milsom และ Meers, 1985) รติกร กัณฑะพงศ์ (2534) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยอิสระของ *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่ใช้ในการทดลองนี้และมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 250:4

3. แหล่งแร่ธาตุ

แหล่งแร่ธาตุก็เป็นองค์ประกอบอีกส่วนหนึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อ จำเป็นต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมและเพียงพอจะช่วยเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิก แร่ธาตุที่ควรมีเติมในการผลิตกรดเพื่อเพิ่มผลผลิตได้แก่ แมกนีเซียม (Mg^{++}) แมกกานีส (Mn^{++}) และ เหล็ก (Fe^{++}) (กรรณิกา จันทรสอาด, 2533; Milsom และ Meers, 1985) นอกจากนี้ได้มีรายงานว่าสามารถใช้น้ำประปาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกเพื่อทดแทนการเติมแหล่งแร่ธาตุได้ (Blom และคณะ, 1952; Hatcher, 1972) สำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถใช้น้ำประปาแทนการเติมแร่ธาตุลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกได้เช่นกัน (บาจรีย์ จันทรานุกร, 2536; กุลธิรา สู่สุข, 2538; นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539; เยาวภา ทองอร่าม, 2540)

4. ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมากในการผลิตกรดกลูโคนิก เนื่องจากกรดกลูโคนิกเกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคส ไม่ว่าจะเป็นการผลิตในรูปแคลเซียมหรือโซเดียมกลูโคเนตก็ตาม ในปี 1937 Well และคณะศึกษาผลของอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนที่มีต่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Aspergillus niger* พบว่าเมื่ออัตราการให้อากาศและอัตราการกวนเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ผลผลิตกรดเพิ่มขึ้นด้วย อีกทั้งเวลาที่ใช้ในการหมักก็ลดลง Moresi และคณะ (1991) ศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ (dissolved oxygen) ต่อการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดย *Aspergillus niger* ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถใช้น้ำตาลตั้งต้นเพื่อการผลิตกรดดังกล่าวได้มากขึ้น Vassilev และคณะ (1993) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* ในพอลิยูรีเทนโฟมในระดับขวดเขย่า พบว่าความเร็วของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมคือ 220 รอบต่อนาที และการผลิตระดับขยายส่วนในคอลัมน์ที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจะมีผลเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิก โดยอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้ผลผลิตกรดสูงสุด 143.8 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 150 กรัมต่อลิตร Dronawat และคณะ (1995) ศึกษาผลของการกวนและให้อากาศที่มีต่อการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดย *Aspergillus niger* ATCC 9029 ในการทดลอง ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มการปั่นกวนและอัตราการให้อากาศสูงขึ้นผลผลิตกรดกลูโคนิกจะเพิ่มสูงขึ้น บาจรีย์ จันทรานุกร (2536) ทำการทดลองผลิตแคลเซียมกลูโคเนตในถังหมักที่มีการกวนและการให้อากาศโดย *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ พบว่าเมื่อมีการเพิ่มอัตราการกวนและการให้อากาศจะให้ได้ผลผลิตกรดสูงขึ้นและใช้เวลาสั้นลง ขณะเดียวกันจินตนา ไกรวัฒนพงศ์ (2536) ได้ผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยสายใยอิสระของ *Aspergillus niger* G153 เช่นกัน ในถังหมักที่มีการกวน พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนจะส่งผลให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงขึ้น เวลาที่ใช้ในการผลิตจะลดลงด้วยเช่นกัน

5. หัวเชื้อ

ขนาดและอายุของหัวเชื้อสายใยมีความสำคัญต่อการผลิตกรดกลูโคนิก โดยจะช่วยลดเวลาที่ใช้ในการผลิตและเพิ่มปริมาณกรดที่ได้ มีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการใช้หัวเชื้อ

แบบสปอร์และแบบสปอร์งอกในการผลิตกรดกลูโคนิกโดย Moyer และคณะ (1937) กับ Gastrock และ Porges (1938) พบว่าการใช้หัวเชื้อแบบสปอร์งอกให้ผลดีกว่าหัวเชื้อแบบสปอร์ เนื่องจากกำจัดช่วง lag phase ออกไปทำให้เวลาที่ใช้ในการหมักลดลง Blom และคณะ(1952) รายงานว่าปริมาณหัวเชื้อ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ของ *Aspergillus niger* NRRL3 เป็นปริมาณที่เหมาะสมเนื่องจากทำให้เกิดการหมักอย่างรวดเร็ว บาจรีย์ จันทรานุกร (2536) ทดลองผลิตแคลเซียมกลูโคเนตในถังหมักที่มีการกวนและการให้อากาศโดย *Aspergillus niger* G153 พบว่าปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดในถังหมักขนาด 5 ลิตรคือ 7% (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)

6. ค่าความเป็นกรดด่าง

ในระหว่างการผลิตกรดกลูโคนิกด้วยวิธีการหมัก พบว่าเมื่อมีการผลิตกรดกลูโคนิกออกมาในรูปกรดอิสระจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารต่ำลงมากส่งผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีภาวะความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งภาวะที่มีความเป็นกรดสูงนี้มีผลยับยั้งการหมักและทำลายสายใยทำให้จุลินทรีย์มีกิจกรรมการผลิตต่อไปไม่ได้และสายใยเสียสภาพไปไม่สามารถนำสายใยมาใช้ซ้ำได้ (Prescoot และ Dunn, 1959; Casida, 1968; Milsom และ Meers, 1985; Das และ Kundu, 1987;) และยังพบว่าเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะไม่ทำงานที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 3 แต่จะพบการผลิตกรดซิตริกแทน (Rohr, 1983) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมคือเท่ากับช่วง 6.0-6.5 จะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยควบคุมให้จุลินทรีย์ผลิตกรดกลูโคนิกเพียงชนิดเดียว Roukas และ Harvey (1988) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตกรดกลูโคนิกและกรดซิตริกจาก beet molasses โดย *Aspergillus niger* พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับเอนไซม์ผลิตกรดซิตริกคือ 4.0 ส่วนเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยอื่นๆที่รายงานค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในการผลิตกรดกลูโคนิกไว้ในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 5.0-7.0 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Bucke, 1983; Rosenberg, 1992) นอกจากนี้ค่าความเป็นกรดด่างยังมีผลต่อการเปลี่ยนกลูโคโนเดลต้าแลกโตนเป็นกรดกลูโคนิกคือที่ค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่า 5.8 การเปลี่ยนรูปตามธรรมชาติเกิดได้เร็ว ขณะที่ถ้าค่าความเป็นกรดด่างต่ำการเปลี่ยนรูปต้องอาศัยเอนไซม์แลกโตเนสช่วยเร่งปฏิกิริยา (Milsom และ Meers, 1985) ซึ่งการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตกรดกลูโคนิกจะใช้แคลเซียมคาร์บอเนตหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ และได้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปแคลเซียมกลูโคเนตหรือโซเดียมกลูโคเนตตามลำดับ

การเก็บเกี่ยวและการวิเคราะห์

ในระหว่างการหมักควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดการหมักผลผลิตสุดท้ายจะได้ในรูปเกลือคือแคลเซียมกลูโคเนตหรือโซเดียมกลูโคเนต ตามลำดับ ซึ่งเกลือเหล่านี้สามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูปกรดกลูโคนิก หรือนำไปใช้ในทางการค้า (Milsom และ Meers, 1985) โดยวิธีที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวกรดกลูโคนิกขึ้นอยู่กับคุณภาพและลักษณะการใช้งานของกรดกลูโคนิกที่ต้องการ วิธีเก็บเกี่ยวแคลเซียมกลูโคเนตและโซเดียมกลูโคเนตโดยทั่วไปทำดังนี้

การเก็บเกี่ยวแคลเซียมกลูโคเนต

ทำโดยนำอาหารหมักไปทำให้เป็นกลางด้วยปูนขาว เพื่อให้กรดอิสระทั้งหมดมาอยู่ในรูปเกลือแคลเซียมกลูโคเนต ให้ความร้อนจนแคลเซียมกลูโคเนตละลาย กรองและทำให้ส่วนน้ำที่มีเกลือแคลเซียมกลูโคเนตเข้มข้นขึ้นโดยอาศัยความร้อนจนสารละลายมีความเข้มข้นของแคลเซียมกลูโคเนตประมาณ 15-20% นำไปทำให้เย็นเพื่อให้เกิดการตกผลึกของแคลเซียมกลูโคเนต [$Ca(C_6H_{11}O_7)2\ H2O$] เนื่องจากความสามารถในการละลายของแคลเซียมกลูโคเนตมีเพียง 3% ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แยกผลึกออกมาล้างด้วยน้ำเย็นหลายๆครั้ง จากนั้นทำให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส (Ward, 1967; Rohr, 1983)

การเก็บเกี่ยวโซเดียมกลูโคเนต

นำอาหารไปกรองและทำให้เข้มข้นขึ้นโดยมีความเข้มข้นของของแข็งประมาณ 42-45% ปรับสารละลายให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบกลองหมุน (Drum drier) จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของแข็งหรือถ้าต้องการให้เกลือโซเดียมกลูโคเนตมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นก็ตกตะกอนซ้ำด้วยน้ำหรือแอลกอฮอล์ (Ward, 1967; Rohr, 1983)

การวิเคราะห์แคลเซียมกลูโคเนตและโซเดียมกลูโคเนต

การวิเคราะห์แคลเซียมกลูโคเนต (Ward, 1967; Takao, 1965; Sasaki และ Takao, 1967) นำน้ำหมักไปตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียซึ่งจะทำให้แคลเซียมอยู่ในรูปออกซาเลต กรองแยกตะกอนออก ล้างนำไปละลายในกรดซัลฟูริกและไตเตรตด้วยสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนสมาตรฐาน

การวิเคราะห์โซเดียมกลูโคเนต (Ward, 1967) วิเคราะห์โดยวิธีการแลกประจุ นำสารละลายไหลผ่านสารที่เป็นตัวแลกประจุเพื่อเปลี่ยนเกลือให้เป็นกรด สารแลกเปลี่ยนประจุที่ใช้เช่น แอมเบอร์ไลท์ไอาร์-120 (Amberlite IR-120 resin) ทำการชะกรดกลูโคนิกออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เก็บไปไตเตรตด้วยสารละลายด่างมาตรฐาน โดยมีฟีนอลทาลีนเป็นตัวบ่งชี้ และให้ความร้อนประมาณ 50 องศาเซลเซียสในระหว่างการไตเตรต

รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Aspergillus niger* G153

รติกร กัณฑะพงศ์ (2534) ผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟต 0.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ส่วนชนิดของแหล่งคาร์บอนพบว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดโดยให้กรดกลูโคนิกประมาณ 74% คิดจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น รองลงมาคือน้ำตาลซูโครสและมอลโทส ตามลำดับ ขณะที่น้ำตาลฟรักโทสให้ผลผลิตกรดต่ำสุด โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมเท่ากับ 25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างกลูโคสต่อต่อแอมโมเนียมที่เหมาะสมเท่ากับ 125:2 หัวเชื้อที่ดีที่สุดคือสปอร์ที่ได้ทำให้งอกในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกับที่ใช้ผลิตกรดดังกล่าวเป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่มีความหนาแน่น 2.5-5.0x10^7 สปอร์ต่อมิลลิลตรปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใช้เป็นสารควบคุมความเป็นกรดด่างเท่ากับ 24% (น้ำหนักต่อน้ำหนักกลูโคสตั้งต้น)

บาจรีย์ ขันทราภานุกร (2536) ผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนต จาก *Aspergillus niger* G153 โดยใช้แป้งที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้กลูโคสบริสุทธิ์ โดยความเข้มข้นของแป้งที่ผ่านการย่อยชนิดกรองแล้วที่เหมาะสมต่อการผลิตคือมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนแหล่งไนโตรเจนพบว่ากากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยแล้วที่มีไนโตรเจน 20 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงเช่นเดียวกับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือแอมโมเนียมซัลเฟต 0.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) อีกทั้งสามารถใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุโดยไม่ต้องเติมเฟอร์รัสซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมงกานีสซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยง

เชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกได้ เมื่อขยายขนาดการผลิตลงในถังหมัก 5 ลิตร พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 15-20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตได้แก่ อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที อัตรการกวน 500 รอบต่อนาที และปริมาณหัวเชื้อ 7% (ปริมาตรต่อปริมาตร)

จินตนา ไกรวัฒนพงศ์ (2536) ผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดย *Aspergillus niger* G153 พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตรและสามารถใช้แป้งที่ผ่านการย่อยแล้วที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสบริสุทธิ์ได้ ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมัก 5 ลิตรคือ อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และสามารถใช้สายใยซ้ำได้ 4 ครั้งโดยผลผลิตกรดกลูโคนิกไม่ลดลง แต่ลดระยะเวลาในการผลิตลง และสามารถเก็บสายใยที่กรองเพื่อใช้ซ้ำไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยยังคงมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดกลูโคนิกสูง

กุลธิรา สู่สุข (2538) ผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงสปอร์และการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงที่เหมาะสมคือ การใช้สปอร์ความหนาแน่น 1.0 - 2.5 x 10^9 สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 100 มิลลิลิตร ขนาดเม็ดเจลสปอร์ตรึง 3.5 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงนาน 66 ชั่วโมง ส่วนภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดในระดับขวดเขย่าคือ ใช้เม็ดเจลสายใยตรึง 40 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ที่มีน้ำตาลกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟต 250 และ 0.2 กรัม ตามลำดับ ให้ผลผลิตกรดสูงสุด 252.4 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการผลิต สำหรับการผลิตในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นในแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้ว 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ภาวะเหมาะสมคืออัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ความหนาแน่นเม็ดเจลสายใยตรึง 300 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรด 54 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 18 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดโดยใช้สายใยตรึงซ้ำได้ 10 ซ้ำ โดยผลผลิตกรดไม่ลดลง และสามารถเก็บเม็ดเจลสปอร์ตรึงและสายใยตรึงไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 และ 5 วัน ตามลำดับ โดยความสามารถในการผลิตกรดกลูโคนิกยังคงเดิม

นิติพงษ์ จิระวรานันท์ (2539) ผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนต โดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในพอลิยูรีเทนโฟม พบว่าชนิดของ PUF ที่ เหมาะสมสำหรับการตรึงสายใยของ *Aspergillus niger* G153 เป็นชนิดโครงสร้างเปิดความหนาแน่นสูง ขนาดชิ้น 0.25 เซนติเมตร ส่วนภาวะที่เหมาะสมในการตรึงสายใยของ *A. niger* G153 คือ ใช้สปอร์ความหนาแน่น 1.0 - 2.5 x 10^8 สปอร์ต่อพอลิยูรีเทนโฟม 1 กรัม เพาะเลี้ยงเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอกนาน 40 ชั่งโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดระดับขวดเขย่าคือ 250 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดได้สูงสุด 240.5 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการผลิต สำหรับการผลิตในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นที่เหมาะสมคือ 50 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 9 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ได้ปริมาณกรดสูงสุด 53.8 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ของการผลิต สามารถผลิตกรดโดยสายใยตรึงซ้ำได้ 12 ซ้ำ โดยผลผลิตกรดลดลงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังสามารถเก็บชิ้นพอลิยูรีเทนโฟมที่มีสายใยตรึงเจริญอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยความสามารถผลิตกรดกลูโคนิกยังคงเดิม

เยาวภา ทองอร่าม (2540) ศึกษาการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตด้วย สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในชิ้นและแผ่นพอลิยูรีเทนโฟม พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างคือใช้สปอร์ความหนาแน่นเท่ากับ 1.0-2.5x10^8 สปอร์ต่อพอลิยูรีเทนโฟม 1 กรัม ใช้แป้งที่ผ่านการย่อยแล้วที่มีความเข้มข้นของกลูโคสตั้งต้นเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 15 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที และใช้น้ำหนักแห้งของกล้าเชื้อสายใยตรึง 9.125 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิตกรดกลูโคนิก 31.5.54 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 74 ส่วนภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกด้วยสายใยตรึงของ *A. niger* G153 ในแผ่นพอลิยูรีเทนโฟมคือ ใช้สปอร์ความหนาแน่นเท่ากับ 5.0-12.5x10^6 สปอร์ต่อพอลิยูรีเทนโฟม 1 กรัม หนัก 0.05 กรัม ใช้แป้งที่ผ่านการย่อยแล้วที่มีความเข้มข้นของกลูโคสตั้งต้นเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 20 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที และใช้น้ำหนักแห้งของกล้าเชื้อสายใยตรึง 2.87 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิตกรดกลูโคนิก 296.7 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 80 ของการผลิต

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลซูโครส

สำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นยังไม่เคยมีรายงานใดกล่าวถึงการผลิตกรดกลูโคนิกร่วมกับน้ำตาลฟรักโทสในปริมาณมากทั้งสองชนิดจากน้ำตาลซูโครสโดยวิธีการหมัก แต่มีรายงานที่ใช้วิธีทางเคมี ส่วนวิธีการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์อื่นๆ ร่วมด้วยเช่น

Holstein และ Holsing (1962) (อ้างถึงใน Casida, 1964) ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตลีวูโรส (levulose) โดยวิธีการหมัก พบว่าในการผลิตมีกรดกลูโคนิกปนมาด้วย

Muller และคณะ (1980) ได้ใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในภาวะที่มีตัวเร่ง ซึ่งเป็นวิธีทางเคมีเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิก แต่ฟรักโทสที่ผสมอยู่ด้วยยังคงรูปเดิมไม่ได้ถูกเปลี่ยนเป็นกรดกลูโคนิก

Chun และ Rogers (1988) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกและซอลบิทอลโดย *Zymomonas mobilis* จากสารละลายน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ (สารละลายน้ำตาลประกอบด้วยกลูโคสและฟรักโทส) พบว่าที่สารละลายน้ำตาล 60% (กลูโคส 300 กรัมต่อลิตรและฟรักโทส 300 กรัมต่อลิตร)ได้ซอลบิทอล 290 กรัมต่อลิตรและกรดกลูโคนิก 283 กรัมต่อลิตรในเวลา 15 ชั่วโมงและการแยกผลผลิตซอลบิทอลและกรดกลูโคนิกออกจากกันใช้วิธีการแลกเปลี่ยนประจุบวก

Rosenberg และคณะ (1992) ทดลองหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้ *Aspergillus niger* CCM8004 จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 300 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนโดยแบ่งค่าความเป็นกรดด่างที่ใช้ออกเป็น 2 ช่วง คือช่วงแรกเป็นค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะต่อการย่อยน้ำตาลคือ 4.5 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 5.5 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิก พบว่าสามารถลดเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิกลงได้

Yun และ Song (1993) ใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์ฟรักโทซิลทรานเฟอเรส (fructosyltransferase) และกลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) อย่างละ 10 ยูนิตต่อกรัมซูโครส

สำหรับการผลิตโอลิโกฟรุกโทไซด์จากน้ำตาลซูโครส 40% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังหมักที่มีการกวน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 5.5 เป็นเวลา 25 ชั่วโมง ได้ผลผลิต 2 ชนิดคือโอลิโกฟรุกโทไซด์และกรดกลูโคนิกซึ่งสามารถแยกจากกันได้โดยการแลกเปลี่ยนประจุ (cationic ion-exchange resin column)

Sievers และคณะ (1995) ใช้ Tea fungus (ประกอบด้วย Acetobacter xylinum และ Zygosaccharomyces sp.) ปริมาณหัวเชื้อ 10% เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นซูโครส 67.5 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วันพบว่าซูโครสจะถูกย่อยหมดใน 23 วัน ได้เป็นกลูโคสและฟรักโทส ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงจาก 3.75 เป็น 2.42 ผลผลิตที่ได้ประกอบด้วย เอธานอล กรดอะซิติก กรดกลูโคนิก และคาร์บอนไดออกไซด์

Novak และคณะ (1996) พบว่าในการผลิตกรดกูลโคนิกโดยใช้น้ำตาลซูโครส 250 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนจาก *Aspergillus niger* An10a ในถังหมัก 2 ลิตร พบว่าในระหว่างการผลิตมีการสร้างโอลิโกฟรุกโทไซด์ชนิดคีสโทสและนีสโทสเป็นผลผลิตร่วมกับกรดกลูโคนิก และในช่วงท้ายมีน้ำตาลฟรักโทสปนมาบ้าง

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตโดย *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นราสายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้ทำมาแล้วอย่างกว้างขวางโดยทราบถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรด ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตทั้งระดับขวดเขย่าและในถังหมัก (รติกร กัณฑะพงศ์, 2534; บาจรีย์ จันทรานุภากร,2536) รวมทั้งการผลิตกรดกลูโคนิกโดยการใช้ *Aspergillus niger* G153 ในรูปสายใยตรึง (กุลธิรา สู่สุข,2538; นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539) และจากผลการทดลองของรติกร กัณฑะพงศ์ ในปีพศ. 2534 พบว่าน้ำตาลซูโครสก็เป็นแหล่งคาร์บอนอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ผลิตกรดกลูโคนิกได้ และอุษา ปิยะบงการ (2538) ก็ได้ทำการทดลองยืนยันว่าน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิตกรดกลูโคนิกได้ดี นอกจากนี้การทดลองเบื้องต้นของผู้วิจัยเกี่ยวกับการผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าจะมีน้ำตาลฟรักโทสเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองในปริมาณมาก เมื่อค้นหาข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตกรดกลูโคนิกและน้ำตาลฟรักโทสจากน้ำตาลซูโครส พบว่าไม่มีผู้ใดรายงานไว้เลย แม้ว่าการใช้น้ำตาลซูโครสจะต้องมีขั้นตอนการย่อยน้ำตาลซูโครสเช่นเดียวกับการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนก็ตาม แต่ขั้นตอนการย่อยไม่ยุ่งยากซับซ้อนเท่ากับการย่อยแป้ง อีกทั้งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อย

น้ำตาลซูโครสได้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ใช้น้ำตาลซูโครสได้ดี จึงเลือกใช้น้ำตาลทราย (refined cane sugar) ซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรในประเทศเป็นแหล่งคาร์บอน

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ทดลองหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิกโดยมีน้ำตาลฟรักโทสเป็นผลิตภัณฑ์ที่สองในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตโดยมีน้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วม ด้วย *Aspergillus niger* G153 จากน้ำตาลทรายในระดับขวดเขย่า และในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ขอบเขตการวิจัย

1. หาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตโดยมีน้ำตาลฟรักโทสเป็นผลผลิตร่วมจากน้ำตาลทราย โดยเชื้อ *Aspergillus niger* G153 ในระดับขวดเขย่า

2. ขยายส่วนผลผลิตในถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตรที่มีการกวนและการให้อากาศโดยศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิต