บทที่ 1

บทนำ

คำนำ

กรดกลูโคนิค (Gluconic acid , $C_6H_{12}O_7$) เป็นกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรมชนิดหนึ่งและมีการผลิตขายกันอย่างกว้างขวาง กระบวนการเกิดกรดกลูโคนิคเป็นกระบวนการออกซิเดชั่น (oxidation) ของน้ำตาลกลูโคส (1,2,3,4)

$$\beta\text{-D-Glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{Gox}} \delta\text{-Gluconolactone} + H_2O_2$$

$$\delta\text{-Gluconolactone} \xrightarrow{H_2O} \text{Gluconic acid}$$

Gox : Glucose oxidase

รูปที่ 1 ขั้นตอนการเกิดกรดกลูโคนิคจากน้ำตาลกลูโคส

การผลิตกรดกลูโคนิคอาจทำโดยใช้วิธีการทางเคมีหรือใช้วิธีการหมักด้วยจุลินทรีย์ก็ได้ (4) แต่ในปัจจุบันการผลิตเพื่อเป็นการค้านิยมทำด้วยวิธีการหมักโดยจุลินทรีย์ วัตถุดิบที่นิยมใช้คือน้ำตาลกลูโคส

มีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ทั้งที่เป็นแบคทีเรีย ราและยีสต์ สามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 (2,5,6)

ในปัจจุบันจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดกลูโคนิคได้ในปริมาณสูงมากและนิยมใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ เชื้อรา Aspergillus niger และแบคทีเรีย Gluconobacter suboxydans (2,6,7)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดกลูโคนิค

ชนิดของจุลินทรีย์		
แบคทีเรีย	รา	ยีสต์
Acetobacter sp.	Aspergillus sp.	Candida sp.
Gluconobacter sp.	Penicillium sp.	Endomycopsis sp.
Pseudomonas sp.	Mucor sp.	
Phytomonas sp.	Fusarium sp.	
Achromobacter sp.	Polyporus sp.	
Aerobacter sp.	Pullularia sp.	
Neisseria sp.	Gliocadium sp.	
Moraxella sp.	Scopulariopsis sp.	
Mycoderma sp.	Gonatobotrys sp.	

ประโยชน์ของกรดกลูโคนิคและอนุพันธ์ของกรด

1. ใช้ในทางการแพทย์

- แคลเซียมกลูโคเนต(Calcium gluconate) และเฟอร์รัสกลูโคเนต (Ferrous gluconate) ใช้เป็นยาเพื่อรักษาอาการขาดธาตุแคลเซียมและเหล็ก ตามลำดับ (1,2,4,6)

- เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) ใช้ในการตรวจหาระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของผู้ป่วย (8,9) ใช้ร่วมกับ แอนติอิมมูโนโกลบูลินซีรัม (anti-immunoglobulin serum) ในการตรวจสอบ แอนติทิชชูแอนติบอดี (anti-tissue antibody) (10)

2. ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

- กลูโคโนเดลตาแลคโตน (Glucono-δ-lactone) ใช้ในการทำขนมให้ฟู (1,4,6)
- เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ใช้ป้องกันการเปลี่ยนสีและรสชาดของอาหารระหว่างการผลิตและเก็บรักษาเช่น อาหารแห้ง มายองเนส เป็นต้น (2,9,11)

3. ประโยชน์อื่นๆ

ใช้ผสมในน้ำยาทำความสะอาดโลหะ (1,2,6) ใช้ในอุตสาหกรรมพิมพ์ลายผ้า ถ่ายภาพ ฟอกหนัง และใช้ผสมในปูนซิเมนต์เพื่อให้แข็งเร็ว (1,2,4,6)

คุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญบางประการของกรดกลูโคนิคและอนุพันธ์ของกรด

กรดกลูโคนิค ($C_6H_{12}O_7$) ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 36.74% ไฮโดรเจน 6.17% และออกซิเจน 57.10% มีน้ำหนักโมเลกุล 196.16 มีรสจืด ละลายน้ำได้ดีและละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ ไม่ละลายในอีเธอร์รวมทั้งตัวทำละลายอื่นๆ ในทางการค้าอยู่ในรูปสารละลาย 50% สีเหลืองอ่อน มีกลิ่นคล้ายน้ำส้มสายชู (12)

กลูโคโนเดลตาแลคโตน ($C_6H_{10}O_6$) ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 40.45% ไฮโดรเจน 5.66% และออกซิเจน 53.89% มีน้ำหนักโมเลกุล 178.14 มีรสหวาน ละลายได้ดีในน้ำและละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ ไม่ละลายในอีเธอร์ (12)

แคลเซียมกลูโคเนต ($C_{12}H_{22}CaO_{14}$) ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 33.49% ไฮโดรเจน 5.16% แคลเซียม 9.31% และออกซิเจน 52.05% มีน้ำหนักโมเลกุล 430.38 ไม่มีกลิ่นและรส ละลายได้ในน้ำแตกต่างกันโดยในน้ำเย็นละลายได้ 30 ส่วน แต่ในน้ำร้อนละลายได้ 5 ส่วน ไม่ละลายในแอลกอฮอล์และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ (12)

โซเดียมกลูโคเนต ($C_6H_{11}NaO_7$) ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 33.04% ไฮโดรเจน 5.08% โซเดียม 10.54% และออกซิเจน 51.34% มีน้ำหนักโมเลกุล 218.13 มีกลิ่นหอม ละลายได้ในน้ำอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ได้ 59 กรัม ละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์แต่ไม่ละลายในอีเธอร์ (12)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิคโดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง เมื่อได้ปรับองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะบางอย่างให้เหมาะสม อันจะเป็นแนวทางในการตัดสินใจที่จะศึกษาถึงการผลิตในถังหมักขนาดใหญ่ต่อไป

2. เพื่อทราบถึงความเป็นไปได้ที่จะนำวัตถุดิบที่มีราคาถูกมาใช้เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคซึ่งอาจทำให้ได้พบวิธีเพิ่มคุณค่าของวัตถุดิบอีกวิธีหนึ่ง

ขอบเขตการวิจัย

1. หาปริมาณองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงสุด

2. ทดลองหาสภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลผลิตกรดสูง

3. ตรวจการเปลี่ยนแปลงภายในขวดเขย่าในระหว่างการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค

4. ทดลองใช้ข้าวที่แปรรูปแล้วเพื่อแทนแหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์

การสำรวจงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การค้นพบกรดกลูโคนิค

Hlasiwetz และ Habermann เป็นคนแรกที่พบกรดกลูโคนิคเมื่อปี ค.ศ.1870 (4) ในปี ค.ศ.1878 Boutroux เป็นคนแรกที่พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตกรดนี้ จุลินทรีย์ที่เขาพบคือ Mycoderma aceti (Acetobacter aceti) (1) ซึ่งขณะนั้นเขาคิดว่าเป็นกรดแลกติก (Lactic acid) อีก 2 ปีต่อมาจึงพบว่าเป็นกรดกลูโคนิค นอกจากนี้ในปีเดียวกันนี้เอง เขาก็สามารถแยกเอาเกลือแคลเซียมของกรดดังกล่าวออกจากการหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยเชื้อ Mycoderma aceti ที่ได้เติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปด้วย (1,4) ในปี ค.ศ.1922 Molliard พบว่ากรดกลูโคนิคเป็นผลผลิตที่เกิดจากการหมัก (fermentation) เช่นเดียวกับกรดมะนาว (Citric acid) และ กรดออกซาลิก (Oxalic acid) และได้รายงานว่าเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิสม (metabolism) ของราเป็นคนแรก และพบว่า Sterigmatocystis nigra

(Aspergillus niger) ก็สามารถสร้างกรดดังกล่าวนี้ได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีแหล่งไนโตรเจนปริมาณน้อย (1,2,3,4,6) ต่อมาในปี ค.ศ.1924 Bernhauer พบว่าในการผลิตกรดมะนาวด้วย Aspergillus niger จะสร้างกรดกลูโคนิคออกมาร่วมด้วย และยังพบ Aspergillus niger สายพันธุ์ที่ผลิตกรดกลูโคนิคเพียงชนิดเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต นอกจากนี้ยังพบอีกว่า จุลินทรีย์จะสร้างกรดกลูโคนิคได้ดีเมื่อมีอุณหภูมิและปริมาณแหล่งไนโตรเจนค่อนข้างต่ำ โดยถ้าทั้งสองปัจจัยดังกล่าวนี้สูงขึ้นก็จะมีการสร้างกรดมะนาวร่วมด้วยมากขึ้น (1,4)

วิวัฒนาการของการผลิตกรดกลูโคนิค

ในปี ค.ศ.1927 May และคณะ ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดกลูโคนิคโดยมีผลผลิตอื่นร่วมด้วยน้อยมาก พบว่ากลุ่ม Penicillium luteum purpurogenum มีคุณสมบัตินี้เมื่อใช้น้ำตาลเดกซ์โตรสเป็นแหล่งคาร์บอนและยังได้ทำการปรับสภาวะต่างๆให้เหมาะสมกับการหมักแบบให้จุลินทรีย์เจริญบนผิวหน้าอาหาร(surface fermentation)(4) ต่อมาในปี ค.ศ.1928 Schreyer ได้แสดงให้เห็นว่า การกวน (agitation) การให้อากาศ (aeration) และการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต จะเพิ่มปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคได้ 4-6 เท่าของที่ไม่ได้ให้อากาศเมื่อผลิตโดยใช้รา Aspergillus fumaricus (1,13) ปี ค.ศ.1929 May และคณะ ได้ทำการผลิตกรดกลูโคนิคในระดับโรงงานต้นแบบ (pilot plant scale) ด้วยวิธีการหมักในถาด (shallow pan method) ซึ่งทำด้วยอลูมิเนียม โดยใช้เชื้อรา Penicillium luteum purpurogenum ได้กรดกลูโคนิค 57% ใน 11 วัน (4) ต่อมาในปี ค.ศ.1930 Thies ได้ทำการทดลองเหมือนกับ Schreyer และพบว่าการให้ออกซิเจนแบบเป็นฟองอากาศ (air bubble) แทนการกวนก็ให้ผลดีเช่นกัน(1) อีก 2 ปีถัดมา Verhave ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคด้วย Acetobacter suboxydans โดยแบ่งการให้อากาศออกเป็น 2 ช่วง โดยให้อากาศปริมาณน้อยขณะที่มีการเจริญและให้อากาศปริมาณมากสำหรับการผลิตกรด(4) ในปีค.ศ.1933 Currie Kane และ Finlay ได้รายงานว่า เมื่อเลี้ยงราให้เจริญในอาหารเหลวและมีอากาศมากเพียงพอจะได้กรดกลูโคนิคสูงถึง 90% ซึ่งปีต่อมา May และคณะได้ทดลองเลี้ยง Penicillium chrysogenum ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 20% ได้กรดกลูโคนิค 80-87% (6) ต่อมา Herrick และคณะได้ทดลองใช้ถังหมักแบบกลองหมุน (rotary drum fermentor)ในการผลิตกรดกลูโคนิคและใช้สปอร์ที่ได้ทำให้งอกแล้วของ Penicillium chrysogenum เป็นหัวเชื้อ พบว่าได้ผลผลิตกรดดังกล่าวสูง 80% ใน 56

ชั่วโมงซึ่งเป็นการลดระยะเวลาการผลิตลง(1,6) ต่อมาได้ทดลองใช้ Aspergillus niger NRRL 67 แทน Penicillium chrysogenum เนื่องจากต้องการปริมาณสปอร์มากพอสำหรับเป็นหัวเชื้อโดยทำในถังหมักแบบกลองหมุนก็ให้ผลผลิตสูงขึ้นในเวลาอันสั้น ซึ่งปี ค.ศ.1937 Moyer และคณะ ได้ทำการปรับปรุงวิธีการและใช้ถังขนาดใหญ่ขึ้นได้ผลผลิตกรดมากกว่า 95% ใน 24 ชั่วโมง เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 150 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรเป็นวัตถุดิบ (4) ปีถัดมา Porges และคณะ ได้พัฒนาวิธีการผลิตโดยทดลองผลิตกรดกลูโคนิคแบบกึ่งต่อเนื่อง (semicontinuous) โดยใช้สายใยของ Aspergillus niger ที่เจริญในอาหารเหลว (4,6) ปีค.ศ.1952 Blom และคณะได้ทดลองผลิตโซเดียมกลูโคเนตโดยใช้ถังหมักที่มีการให้อากาศพร้อมทั้งการกวน(stirred aerated tank fermentor) ซึ่งปรับความเป็นกรดด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และได้ผลผลิต 100% ใน 19 ชั่วโมง (4) ปี ค.ศ.1980 Nyeste และคณะ ได้เสนอแบบจำลอง (model) และปรับปรุงการหมักเพื่อผลิตกรดกลูโคนิคเมื่อใช้ Acetobacter suboxydans ATCC 621 (14) และปี ค.ศ.1983 Oosterhuis และคณะได้ทดสอบหาผลกระทบทางกายภาพต่อการหมักด้วย Gluconobacter oxydans ATCC 621H (15)

กรรมวิธีในการผลิตกรดกลูโคนิคมี 3 วิธีใหญ่ๆ (1) คือ:-

1. การผลิตโดยการหมักในถาด (shallow pan method)
2. การผลิตโดยให้จุลินทรีย์เจริญในอาหารเหลว (submerged culture method)
3. การผลิตโดยใช้ถังหมักแบบกลองหมุน (rotary drum method)

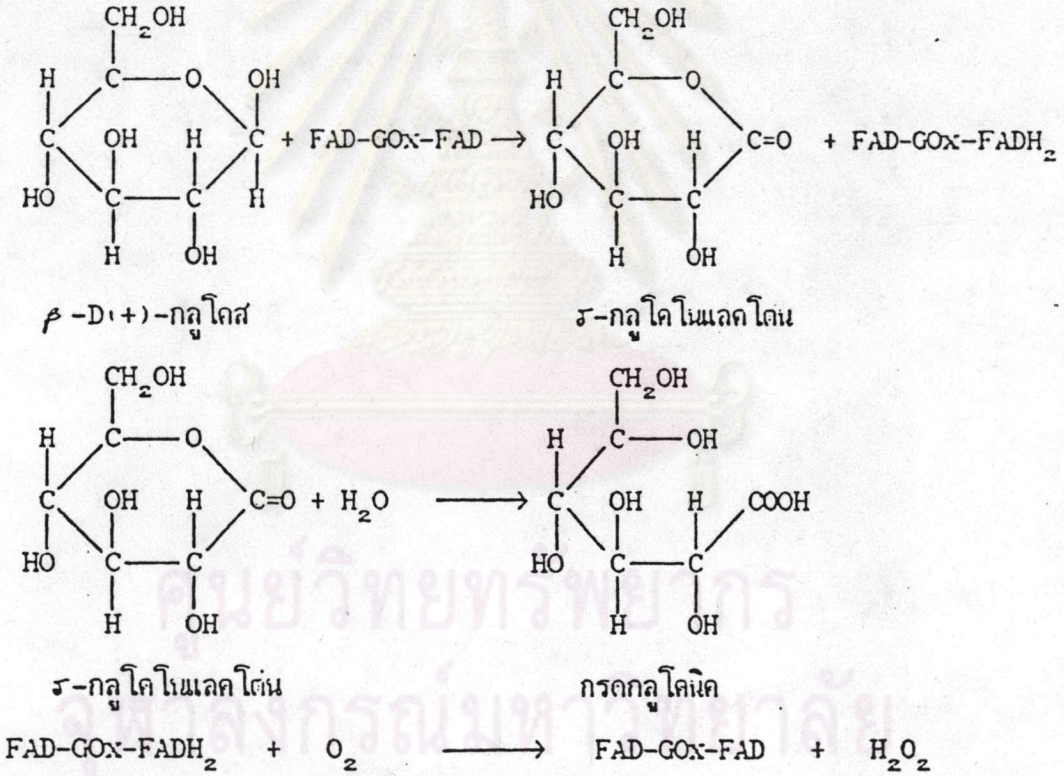
ในปี ค.ศ.1959 Grays พบข้อได้เปรียบของการใช้วิธีที่ 2 (13) คือ

1. สามารถผลิตกรดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณมากๆได้ในคราวเดียว
2. ขจัดปัญหาด้านค่าใช้จ่ายแรงงาน
3. ฆ่าเชื้อเครื่องมือได้ง่าย
4. อัตราการหมักเร็วกว่าวิธีที่ 1

ในปัจจุบันการผลิตกรดกลูโคนิคในระดับอุตสาหกรรมทำโดยใช้วิธีให้จุลินทรีย์เจริญในอาหารเหลวแบบกึ่งต่อเนื่อง ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ได้รับการพัฒนาโดย Porges และคณะ (1,2,4,6) เป็นการนำเอาสายใยของจุลินทรีย์มาใช้ใหม่ซึ่งอาศัยเอนไซม์ที่อยู่ภายในสายใยนั่นเอง ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในระดับอุตสาหกรรมจึงเป็นข้อที่ดีกว่าการหมักแบบครั้งเดียว (batch culture)(6) วัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิคเช่นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำเชื่อมเดกซ์โตรส แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เกลือแอมโมเนียม ยูเรีย(4)

กระบวนการทางชีวเคมีของการผลิตกรดกลูโคนิคด้วยจุลินทรีย์

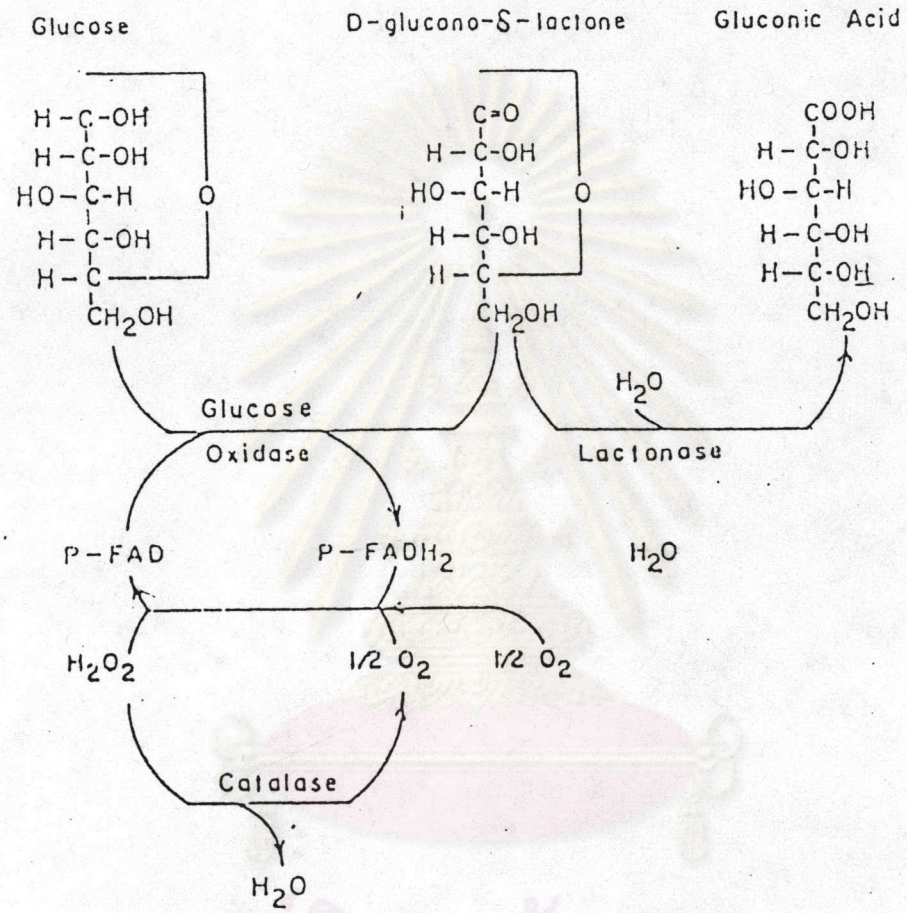
ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า กรดกลูโคนิคเป็นกรดอินทรีย์ที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่น (oxidation) ของน้ำตาลกลูโคส (1,4,6) โดยจะมีการดึงเอาอะตอมของไฮโดรเจนออกจากน้ำตาลกลูโคสแล้วได้เป็น ดี-กลูโคโนเดลตาแลคโตน (D-Glucono-δ-lactone) ในขั้นนี้มีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase ; β-D-Glucose:Oxygen 1 oxidoreductase ,E.C.1.1.3.4) (16) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้น ดี-กลูโคโนเดลตาแลคโตนจะถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyse) ต่อได้เป็นกรดกลูโคนิค (3,4,6)



Gox : Glucose oxidase

รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างและขั้นตอนการเกิดกรดกลูโคนิค

ในขณะที่ได้กลูโคโนเดลตาแลคโตน เป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) แล้ว ในระบบจะมีผลผลิตอีกชนิดหนึ่งเกิดขึ้นร่วมด้วยคือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ ดังแสดงในรูปที่ 1 , 2 และ 3 การกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต้องใช้เอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์นั้นเอง (2,6)



Overall Reaction: 2 Glucose + O_2 $\xrightarrow[\text{Catalase}\ \text{Lactonase}]{\text{P-FAD}}$ 2 Gluconic Acid

P-FAD ----- Flavoprotein

รูปที่ 3 การทำงานของระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตกรดกลูโคนิคจากจุลินทรีย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตกรดกลูโคนิค

1. เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เกาะติดอยู่ภายในเซล (cell bound enzyme) (8,16,17) เป็นไกลโคโปรตีนมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบร่วมประมาณ 16% (8) เอนไซม์นี้ที่ได้จาก Aspergillus niger เป็นไดเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 186,000 มีโคเอนไซม์คือ ฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Flavine Adenine Dinucleotide ,FAD) 2 โมลต่อไดเมอร์ติดอยู่อย่างหนาแน่นกับเอนไซม์ (8,18,19) เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการส่งผ่านอะตอมของไฮโดรเจนจากกลูโคสไปยังออกซิเจนและจากการศึกษาด้วยโพลารีมิเตอร์พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าวคือกลูโคโนเดลตาแลคโตนซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวนี้มีความจำเพาะเจาะจงสูงมากกับดี(+)-กลูโคสรูปเบตา (8,18,19) โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาของดี(+)-กลูโคสรูปเบตาเร็วกว่ารูปแอลฟาประมาณ 157 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 2 (20)

ตารางที่ 2 อัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ดี(+)กลูโคสรูปเบตาและน้ำตาลชนิดอื่นกับออกซิเจนโดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

สารตั้งต้น	อัตราการเกิดปฏิกิริยาสัมพัทธ์ (ร้อยละ)
β-D-Glucose	100
2-Deoxy-D-Glucose	25
6-Deoxy-6-Fluoro-D-Glucose	3
6-Methyl-D-Glucose	2
4,6-Dimethyl-D-Glucose	1
D-Mannose	1
D-Xylose	1
∝-D-Glucose	0.6
Treharose	0.3
น้ำตาลอื่นๆอีก 80 ชนิด	0.0

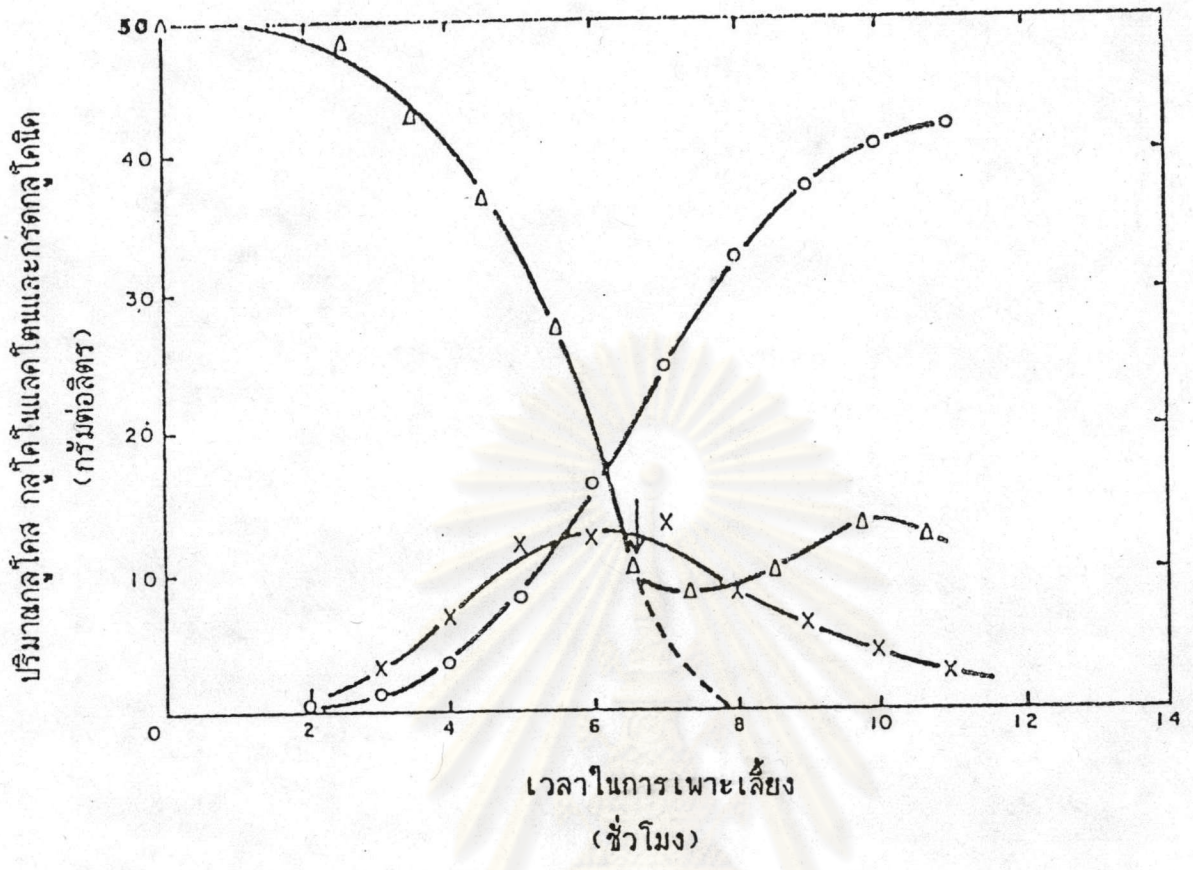
โดยปกติแล้วดี-กลูโคสรูปแอลฟาสามารถเปลี่ยนรูปเป็นเบตาได้เอง แต่ถ้าหากมีเอนไซม์มิวตาโรเตส (Mutarotase ; aldose 1-epimerase , E.C. 5.1.3.3) ร่วมด้วยจะเร่งการเปลี่ยนรูปดังกล่าวให้เร็วขึ้น (21) ซึ่งใน Aspergillus niger มีเอนไซม์ดังกล่าวนี้อยู่ด้วย (4)

2. เอนไซม์กลูโคโนเดลตาแลคโตเนส (Gluconolactonase ; D-Glucono-δ-lactone hydrolase , E.C.3.1.1.17)

Brodie และ Lipman เป็นผู้ค้นพบและสกัดแยกเอนไซม์กลูโคโนเดลตาแลคโตเนสได้เป็นครั้งแรกจาก Saccharomyces cerevisiae (22) เอนไซม์นี้มีบทบาทต่อกลูโคโนเดลตาแลคโตนที่เป็นสารมัธยันตร์ในกระบวนการผลิตกรดกลูโคนิค โดยปกติจะมีการไฮโดรไลซ์กลูโคโนเดลตาแลคโตนเป็นกรดกลูโคนิคได้เองตามธรรมชาติ การสะสมของกลูโคโนเดลตาแลคโตนนี้มีผลทำให้อัตราการออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคสลดลง ดังนั้นการไฮโดรไลซ์แลคโตนจึงเป็นสิ่งสำคัญต่ออัตราการผลิตทั้งหมดของกรดกลูโคนิคหรือเกลือของกรดดังกล่าว (4) หากมีเอนไซม์นี้อยู่ด้วยก็จะช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้นได้ ซึ่งจุลินทรีย์ Aspergillus niger ก็มีเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ (3,4) โดยเอนไซม์นี้จะมีบทบาทที่สำคัญเมื่อในระบบมีความเป็นกรด (4) นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์นี้จะถูกกระตุ้น (activate) ด้วยไดวาเลนท์แคทไอออน (divalent cation) เช่น Mg^{2+} เป็นต้น (22)

3. เอนไซม์คะตะเลส (Catalase ; E.C.1.11.1.6) (23)

เอนไซม์คะตะเลส มีบทบาทสำคัญในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นผลผลิตร่วมในขณะที่เกิดกลูโคโนเดลตาแลคโตนในกระบวนการผลิตกรดกลูโคนิค จุลินทรีย์ Aspergillus niger สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นมาร่วมกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส(2,6,24,25) จากปฏิกิริยาของเอนไซม์คะตะเลสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะได้โมเลกุลของออกซิเจนกับน้ำและครึ่งหนึ่งของโมเลกุลออกซิเจน จะถูกนำมาใช้เพื่อทำให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสกลับมาอยู่ในสภาพที่นำกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาในกระบวนการได้อีก (26)



○ หมายถึง กรดกลูโคนิค × หมายถึง กลูโคโนแลคโตน △ หมายถึง กลูโคส

↓ หมายถึง เติมกลูโคส

รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ของกลูโคส กลูโคโนเดลตาแลคโตนและกรดกลูโคนิคระหว่างการหมัก (27)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิคจากจุลินทรีย์

1. วัตถุดิบ

โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน มีความสำคัญมาก เพราะมีผลต่อปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคจากจุลินทรีย์โดยตรง

เนื่องจากปฏิกิริยาการเกิดกรดกลูโคนิคต้องอาศัยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ซึ่งมีความจำเพาะต่อน้ำตาลกลูโคสในรูปเบตาดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้ในตารางที่ 2 ยังได้แสดงถึงอัตราการเกิดปฏิกิริยาสัมพัทธ์ของเอนไซม์ชนิดนี้ทำให้เห็นได้ว่าน้ำตาลกลูโคสนั้นเหมาะสมกับการผลิตกรดกลูโคนิคมากที่สุด แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงปริมาณน้ำตาลที่จะใช้ด้วยเนื่องจากหากใช้ปริมาณมากเกินไปอาจทำให้การผลิตกรดกลูโคนิคลดลงได้ (28,29,30) ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะกับการผลิตกรดกลูโคนิคจาก Aspergillus niger โดยทั่วไปนิยมใช้ปริมาณ 110-250 กรัมต่อลิตร(4) Kundu และ Das ได้ทำการทดลองผลิตกรดกลูโคนิคทั้งในขวดเขย่า(shake flask)และไม่มีการเขย่า (static condition)ไว้ด้วย Aspergillus niger MN181 พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิคสำหรับสายพันธุ์นี้เป็น 15% โดยมีปริมาณกรดคิดเป็น 92% และ 93% เมื่อคิดจากน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นตามลำดับ (31) วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในระดับอุตสาหกรรมได้แก่น้ำตาลกลูโคส ยิ่งไปกว่านั้นได้มีการพยายามใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายแป้ง(hydrolysed starch) ในการผลิตกรดกลูโคนิคซึ่งได้ผลผลิตแตกต่างกันไปโดยให้ผลผลิตกรดกลูโคนิค 97-100% (6) Kundu และ Das ซึ่งได้ทดลองใช้ Aspergillus niger MN181 เพื่อการผลิตเกลือแคลเซียมกลูโคเนตในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้ขวดเขย่า แล้วเปรียบเทียบผลผลิตกรดเมื่อใช้น้ำตาลจากการย่อยสลายแป้ง กากน้ำตาลและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งนี้ได้เติมชานอ้อย (sugar cane bagasse)ซึ่งได้หั่นเป็นชิ้นเล็กๆเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวให้กับจุลินทรีย์ลงไปด้วย ใช้ความเร็วในการเขย่า 250 รอบต่อนาที พบว่าในระยะเวลา 5 วันเท่ากันปริมาณกรดกลูโคนิคในรูปของเกลือแคลเซียมกลูโคเนตที่ได้จากการใช้น้ำตาลจากการย่อยสลายแป้งและกากน้ำตาลเท่ากับ 85.2% และ 70.8% ตามลำดับซึ่งน้อยกว่าที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณเกลือแคลเซียมกลูโคเนตที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 94.8% เมื่อคิดจากน้ำตาลตั้งต้น (31)

สำหรับแหล่งไนโตรเจนนั้น ไม่ควรใช้แหล่งไนโตรเจนที่ไม่ใช่แหล่งไนโตรเจนบริสุทธิ์(crude nitrogen)เช่น corn steep liquor ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงเกลืออนินทรีย์บางชนิดอันจะมีผลต่อปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคซึ่งจะได้กล่าวต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ควรให้มีปริมาณไนโตรเจนมากนัก เพราะจะทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญมากเป็นสาเหตุให้ได้ผลผลิตกรดกลูโคนิคลดน้อยลง (3,4,5) การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปใดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้(6) สำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคจาก Aspergillus niger โดยทั่วไปควรมีแหล่งไนโตรเจนประมาณ 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเป็นปริมาณที่ต่ำมาก (3)

นอกจากองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อจะสำคัญแล้ว อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนก็มีความสำคัญเช่นกัน เพราะถ้าหากปรับให้อัตราส่วนดังกล่าวเหมาะสมแล้ว จะทำให้ได้ผลผลิตกรดสูงสุดอีกทั้งยังเป็นการใช้วัตถุดิบอย่างคุ้มค่าด้วย ซึ่งปริมาณของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและอัตราส่วนระหว่างแหล่งทั้งสองจะเป็นเท่าไรก็ต้องขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงต้องมีการวิจัยเฉพาะเจาะจงลงไปในแต่ละสายพันธุ์

2. เกลืออินทรีย์

การผลิตและสะสมกรดกลูโคนิคซึ่งเป็นสารในกระบวนการเมตาบอลิสมที่สำคัญของรา Aspergillus niger นั้น ชนิดและปริมาณของเกลืออินทรีย์หรือโลหะธาตุนั้นมีผลกระทบต่อการผลิตกรดดังกล่าว (2) ถ้ามีโลหะธาตุเงิน ปรอทและทองแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อแม้เพียงเล็กน้อยจะไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส(16) คลอไรด์ก็เช่นกันมีผลต่อเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสโดยจะไปแย่งกับน้ำตาลกลูโคสในการจับกับเอนไซม์ (8) ซึ่งเป็นผลทำให้ได้ปริมาณกรดกลูโคนิคลดลง การใช้น้ำตาลกลูโคสและแร่ธาตุที่เป็นสารบริสุทธิ์ในการผลิตกรดกลูโคนิคควรเติมแมงกานีส (Manganese) ลงไปด้วย (2,4,6) มิฉะนั้นจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสน้อยแล้วจะมีการใช้น้ำตาลไปเพื่อการเติบโตและมีผลิตภัณฑ์อื่นคือ กรดมะนาวและกรดออกซาลิกร่วมด้วย(2,6) อย่างไรก็ตามความต้องการโลหะธาตุหรือเกลืออินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคย่อมแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เช่น ในการทดลองของ Yasin และคณะได้ทดลองใช้ Aspergillus niger สายพันธุ์ที่พบในประเทศปากีสถานเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค โดยใช้องค์ประกอบแต่ละชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสารบริสุทธิ์แต่ใช้น้ำประปาโดยไม่ต้องเติมโลหะธาตุหรือเกลืออินทรีย์ใดๆเลยก็ให้ผลผลิตกรดได้สูงเช่นกัน (28) ในขณะที่สูตรอาหารของ Mahmoud และคณะใช้ Aspergillus niger NRRL3 ในการผลิตกรดกลูโคนิค โดยใช้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นองค์ประกอบบริสุทธิ์ แต่ใช้น้ำกลั่นและต้องเติมโลหะธาตุหรือเกลืออินทรีย์ในปริมาณที่เหมาะสม (13) ดังนั้นชนิดของจุลินทรีย์ที่จะใช้ในการทดลองนั้นจึงเป็นส่วนสำคัญในการพิจารณา

สำหรับรา Aspergillus sp. สายพันธุ์ G153 ที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเชื้อราที่ได้รับการคัดเลือกมาแล้วว่าให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงแต่เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้ กรรณิกา จันทรสอาด และ รติกร กัณฑะพงศ์ ได้ทำการทดลองถึงผลกระทบของโลหะธาตุบางชนิดที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้จุลินทรีย์ Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153 ที่ใช้ในการทดลองนี้ พบว่าถ้ามีเหล็กในรูปของเฟอร์รัสซัลเฟตและแมงกานีสในรูปของแมงกานีสซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม จะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคขึ้นเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมเหล็กในขณะที่ สังกะสี เงิน ทองแดง และปรอทนั้นให้ผลในทางลบ คือลดปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคเมื่อมีในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงเล็กน้อย (32)

3. ปริมาณออกซิเจน

เนื่องจากการเกิดกรดกลูโคนิคเป็นกระบวนการออกซิเดชั่น ดังนั้นปริมาณออกซิเจนจึงเป็นสิ่งสำคัญต่ออัตราการหมัก การให้อากาศสามารถทำได้หลายวิธี เช่นการเพิ่มความดันและการกวน (33,34) เพื่อให้ได้ผลดีที่สุดคือมีผลผลิตที่ต้องการสูงสุดในระยะเวลาอันสั้น ก็ควรที่จะปรับการให้ออกซิเจนให้เพียงพอกับความต้องการของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก จึงต้องมีการให้ออกซิเจนค่อนข้างสูง (2) และถ้าระดับออกซิเจนต่ำกว่า 20 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะทำงานได้ไม่ดี (35)

เมื่อเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิคแล้วจะทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่ใช้งานไม่ได้ ต้องอาศัยออกซิเจนเพื่อมาทำให้เอนไซม์ดังกล่าวกลับสู่สภาพเดิมเพื่อที่จะเร่งปฏิกิริยาได้อีก (4,36)

4. ความเป็นกรดด่าง

ในระหว่างกระบวนการผลิตกรดกลูโคนิค ถ้าไม่มีการเติมสารควบคุมความเป็นกรดด่างลงไป จะทำให้ในระบบมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำประมาณ 3 ซึ่งการที่มีสภาพเป็นกรดมากเช่นนี้จะไปยับยั้งการผลิตกรดกลูโคนิค (1) นอกจากนี้ยังเป็นผลเสียต่อภาชนะและเครื่องมือทางอุตสาหกรรมอีกด้วย (13) อีกทั้งยังไปทำให้จุลินทรีย์เติบโตไม่ดีซึ่งก็เป็นเหตุให้ผลผลิตกรดดังกล่าวลดลงด้วย (6) ดังนั้นการเลือกใช้จุลินทรีย์ในการผลิตจึงต้องคำนึงถึงข้อนี้ ดังได้กล่าวมาแล้วว่าในทางอุตสาหกรรมนิยมใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ

Aspergillus niger และ Gluconobacter oxydans สำหรับ Aspergillus niger นั้นมีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นหรือปริมาณน้ำตาลและกรดได้สูง (27) ในขณะที่ Gluconobacter oxydans สามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้ในสภาพที่เป็นกรดจึงไม่จำเป็นต้องควบคุมสภาพความเป็นกรดด่างมากนัก แต่มีข้อเสียคือเกลือกลูโคเนตจากจุลินทรีย์ชนิดนี้จะถูกออกซิไดซ์ (oxidise) ต่อ ได้เป็นกรดคีโตกลูโคนิค(7)

สำหรับ Aspergillus niger หากในกระบวนการผลิตมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 3 แล้ว เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะไม่ทำงานแต่จุลินทรีย์จะสร้างกรดมะนาวออกมาแทน (3,37) สภาพความเป็นกรดด่างที่พอเหมาะต่อการผลิตกรดกลูโคนิคจะมีค่าประมาณ 5.5 (1,6,30) ซึ่งก็คือค่าที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั่นเอง (8,26) ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวควบคุมความเป็นกรดด่างลงไป เพื่อควบคุมสภาพความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว สารที่นิยมเติมลงไปในระหว่างการผลิตเพื่อจุดประสงค์ดังกล่าวได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (1,6) นอกจากสารควบคุมความเป็นกรดด่างจะมีส่วนช่วยรักษาสภาพความเป็นกรดด่างของระบบแล้ว ยังมีผลต่อการเปลี่ยนรูปของกลูโคโนเดลตาแลคโตนไปเป็นกรดกลูโคนิคอีกด้วย คือที่ค่าความเป็นกรดด่างที่มากกว่า 5.8 การเปลี่ยนกลูโคโนเดลตาแลคโตนตามธรรมชาติจะเร็วขึ้น (4,27) แต่ถ้าค่าความเป็นกรดด่างต่ำการเปลี่ยนกลูโคโนเดลตาแลคโตนไปเป็นกรดกลูโคนิค จะต้องมีเอนไซม์กลูโคโนแลคโตเนสมาช่วยเร่งปฏิกิริยา (4)

Takao และ Sasaki พบว่า แคลเซียมคาร์บอเนต 3% เพียงพอต่อการผลิตกรดกลูโคนิคในระดับห้องปฏิบัติการโดย Pullularia pullulans เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 10% เป็นแหล่งคาร์บอน (5) ส่วน Yasin และคณะพบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 15% เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 26 กรัมต่อลิตร (2.6%)ก็เพียงพอต่อการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการเช่นกันเมื่อใช้ Aspergillus niger (28)

3. หัวเชื้อ

เป็นสิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งในการผลิต โดยทั่วไปแล้วการผลิตผลิตภัณฑ์โดยจุลินทรีย์นั้นต้องมีขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อเสียก่อน ในกรณีการผลิตกรดกลูโคนิคโดยรา หัวเชื้อที่เตรียมมิใช่มีความสามารถในการแบ่งเซลเพื่อเพิ่มจำนวนเท่านั้น แต่ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่พร้อมจะผลิตกรดดังกล่าวในถังหมักด้วย เพราะหัวเชื้อที่ดีจะทำให้ได้ผลผลิตกรดสูงและลดระยะเวลาในการผลิต ดังนั้นการศึกษาเพื่อให้ได้หัวเชื้อที่มีคุณภาพจึงมีความ

017453

สำคัญทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตด้วย เช่น Gastrock และ คณะ ได้ทดลองใช้ Aspergillus niger โดยใช้ถังหมักแบบกลองหมุน พบว่า หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ที่งอกแล้วให้ผลผลิตดีกว่าหัวเชื้อที่เป็นสปอร์ (30) ในขณะที่ Mahmoud และคณะ ได้ทดลองใช้ Aspergillus niger NRRL3 โดยเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า พบว่าไม่ว่าจะใช้หัวเชื้อชนิดใดก็ให้ผลผลิตเท่ากัน (37) เป็นต้น

ขนาดของหัวเชื้อก็เป็นอีกสิ่งหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงด้วย Qadeer และคณะได้ทำการทดลองโดยใช้หัวเชื้อของ Aspergillus niger WRL51 ที่เป็นสปอร์ที่งอกแล้วอายุ 24 ชั่วโมงเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค พบว่าถ้าเพิ่มขนาดของหัวเชื้อปริมาณการผลิตกรดจะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งเขาได้ทำการทดลองเพิ่มขนาดของหัวเชื้อจาก 4% เป็น 10% พบว่าปริมาณการผลิตเกลือแคลเซียมกลูโคเนตเพิ่มขึ้นจาก 78.8 กรัมต่อลิตร เป็น 103.5 กรัมต่อลิตร รวมทั้งการใช้น้ำตาลกลูโคสก็จะเพิ่มขึ้นจาก 90 กรัมต่อลิตรเป็น 115 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 24 เช่นเดียวกัน (29)

ในปัจจุบันยังไม่มีการผลิตกรดกลูโคนิคขึ้นในประเทศไทย แต่มีการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมากโดยได้มีการนำเข้าทั้งในรูปของกรดและเกลือของกรดดังกล่าวปีละมากกว่า 850,000 กิโลกรัมคิดเป็นมูลค่ามากกว่า 53 ล้านบาท จึงเป็นที่น่าสนใจว่าอุตสาหกรรมการผลิตกรดกลูโคนิคในประเทศจะมีความสำคัญต่อไป นอกจากนี้ประเทศไทย เป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีวัสดุทางการเกษตรหลายจำพวกที่มีราคาถูกเหมาะแก่การนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตกรดได้ โดยเฉพาะวัตถุดิบจำพวกแป้งและข้าว

การวิจัยนี้ เป็นการตรวจหาปริมาณการผลิตกรดกลูโคนิคจากเชื้อรา Aspergillus sp.สายพันธุ์ G153 ซึ่งแยกได้จากดินในประเทศไทย มีความสามารถผลิตกรดกลูโคนิคแต่เพียงอย่างเดียวในปริมาณที่สูง โดยแปรผันสภาวะการเลี้ยงเชื้อต่างๆ กันไป เพื่อให้ได้ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตสูงสุดและทดลองใช้น้ำตาลที่ได้จากการหมักข้าวแทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ ซึ่งเป็นการใช้วัตถุดิบราคาถูกสำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้ประการหนึ่ง