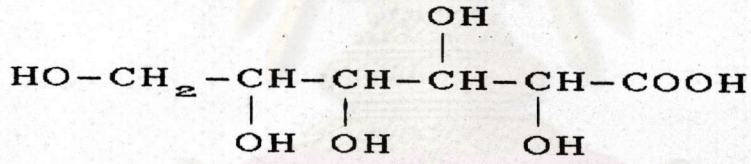
บทที่ 1

บทนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

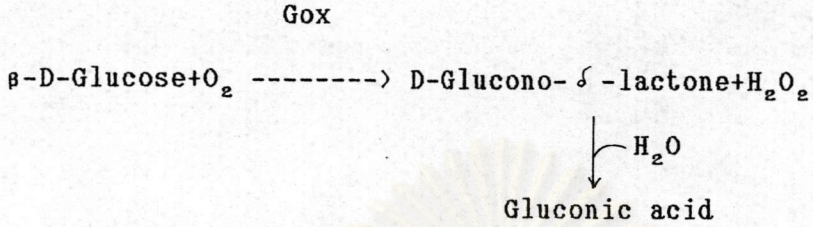
คำนำ

กรดกลูโคนิค (Gluconic acid, $C_6H_{12}O_7$) หรือกรดเพนตะไฮดรอกซีคาร์โพรอิก (Pentahydroxycaproic acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่สำคัญชนิดหนึ่ง (รูปที่ 1) ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 36.74% ไฮโดรเจน 6.17% และออกซิเจน 57.10% มีน้ำหนักโมเลกุล 196.16 ละลายน้ำได้ดี และละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ ไม่ละลายในอีเธอร์ รวมทั้งตัวทำละลายอื่น ๆ ในทางการค้าอยู่ในรูปสารละลาย 50% สีเหลืองอ่อน มีกลิ่นคล้ายน้ำส้มสายชู (Prescott, 1953; Merck, 1989)



รูปที่ 1 สูตรของกรดกลูโคนิค

กรดกลูโคนิคเกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 2) โดยมีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (β-D-glucose : oxygen 1-oxidoreductase, E.C. 1.1.3.4) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็น ดี-กลูโคโน-เดลตา-แลคโตน ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซ์ต่อได้เป็นกรดกลูโคนิค โดยปกติการไฮโดรไลส์ขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หากมีเอนไซม์กลูโคโนเดลตาแลคโตเนสอยู่ด้วยก็จะช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้นได้ ซึ่งจุลินทรีย์ *Aspergillus niger* มีการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้อยู่แล้ว (Prescott และ Dunn, 1959; Lockwood, 1975; Rohr และคณะ, 1983; Milsom และ Meers, 1985)



Gox : Glucose oxidase

รูปที่ 2 ขั้นตอนการเกิดกรดกลูโคนิคจากน้ำตาลกลูโคส

จากรูปที่ 2 ในขณะที่ได้กลูโคโนเดลตาแลคโตนเป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) แล้ว ในระบบจะมีผลผลิตอีกชนิดหนึ่งร่วมด้วย ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ ในระหว่างการผลิตกรดกลูโคนิค การกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต้องใช้เอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์นั้นเอง (Van Dijken และ Veenhuis, 1980; Milsom และ Meers,1985)

การผลิตกรดกลูโคนิคสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ใช้วิธีการทางเคมี ใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสร่วมกับการให้อากาศ วิธีนี้ไม่นิยมใช้ในทางการค้าเนื่องจากเอนไซม์มีราคาแพง หรือใช้วิธีการหมักด้วยจุลินทรีย์ (Walon, 1971; Milsom และ Meers, 1985) ในปัจจุบันการผลิตกรดดังกล่าวในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้กระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดกลูโคนิค

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
รา	
Aspergillus niger	Wells และคณะ, 1937 Gastrock และคณะ, 1938 Moyer และคณะ, 1940 Porges และคณะ, 1940, 1941 Blom และคณะ, 1952 Das และ Nandi, 1969 Yasin และคณะ, 1969 Ziffer และคณะ, 1969 Miura และคณะ, 1970 Jayaraman และ Prasad, 1971 Lewis, 1971 Hatcher, 1972 Qadeer และคณะ, 1975 Mahmoud และคณะ, 1977 Kundu และ Das, 1982, 1985 Heinrich และ Rehm, 1982 Lee และคณะ, 1987 Baig, 1987 Sakurai และคณะ, 1989 Moresi และคณะ, 1991
Penicillium chrysogenum	May และคณะ, 1934

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Penicillium funiculosum	Mandal และ Chatterjee, 1985
Penicillium janthinellum	Mandal และ Chatterjee, 1985, 1986
Penicillium luteum-purpurogenum	May และคณะ, 1927
	Herrick และ May, 1928
Penicillium puberulum	Elnaghy และ Megalla, 1975
Botrytis cinerea	Doneche, 1989
Pullularia pullulans	Takao และ Sasaki, 1964
	Su และคณะ, 1977
<u>แบคทีเรีย</u>	
Acetobacter suboxydans	Nyeste และคณะ, 1980
Acetobacter diazotrophicus	Attwood และคณะ, 1991
Gluconobacter oxydans	Oosterhuis และคณะ, 1983, 1985
	Vanhuynk และคณะ, 1986
	Pronk และคณะ,1989
Gluconobacter suboxydans	Shiraishi และคณะ, 1989
Pseudomonas ovalis	Humphrey และ Reilly, 1965
	Bull และ Kempe, 1970
	Ghose และ Ghosh, 1976
	Ghosh และ Ghose, 1978
Pseudomonas aeruginosa	Whiting และคณะ, 1976
Zymomonas mobilis	Chun และ Rogers, 1988

ประโยชน์ของกรดกลูโคนิคและอนุพันธ์ของกรด

ในปัจจุบันมีการนำกรดกลูโคนิคและอนุพันธ์ของกรดไปใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่

1. อุตสาหกรรมยา

แคลเซียมกลูโคเนตและเฟอร์รัสกลูโคเนต ใช้เป็นยาเพื่อรักษาอาการขาดธาตุแคลเซียมและเหล็กตามลำดับ (Lockwood, 1975; Rohr และคณะ, 1983; Das และ Kundu, 1987)

2. อุตสาหกรรมอาหาร

ใช้กรดกลูโคนิคเพื่อเป็นตัวป้องกันการตกผลึกของน้ำเชื่อมซอร์บิทอล ซึ่งเป็นสารให้ความหวานในการทำหมากฝรั่ง (Pedersen และ Sonder, 1981)

ใช้แคลเซียมกลูโคเนตผสมในอาหารสัตว์ปีกเพื่อเพิ่มคุณภาพของเปลือกไข่ (Das และ Kundu, 1987)

นอกจากนี้ยังใช้โซเดียมกลูโคเนตในอุตสาหกรรมนมและอุตสาหกรรมเบียร์อีกด้วย (Su และคณะ, 1977)

3. อุตสาหกรรมอื่น ๆ

ใช้กรดกลูโคนิคและอนุพันธ์ของกรดเป็นส่วนผสมของน้ำยาทำความสะอาดโลหะ ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและการพิมพ์ลายผ้า การถ่ายภาพ การฟอกหนัง อุตสาหกรรมผงซักฟอก และใช้ผสมในปูนซิเมนต์เพื่อช่วยในการแข็งตัว (Prescott และคณะ, 1953; Hatcher, 1972; Rohr และคณะ, 1983; Milsom และ Meers, 1985)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายข้าวหรือแป้งมันสำปะหลัง เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดกลูโคนิคทดแทนกลูโคสบริสุทธิ์ที่ได้ศึกษามาแล้ว และแปรผันองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อบางประการ เช่น แหล่งไนโตรเจน น้ำ เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต รวมทั้งศึกษาสภาวะบางประการในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิค

ขอบเขตการวิจัย

1. ใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายข้าวและแป้งมันสำปะหลังในการผลิตกรดกลูโคนิค
2. ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการผลิตกรดกลูโคนิค
3. หาปริมาณที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองไฮโดรไลเสส เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแอมโมเนียมซัลเฟต
4. ผลิตกรดกลูโคนิคในระดับขวดเขย่า โดยใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตดีที่สุดที่ได้ทำการทดลองมา
5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการ เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร

การผลิตกรดกลูโคนิคในระดับอุตสาหกรรม

ปัจจุบันจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดกลูโคนิคได้ในปริมาณสูง และนิยมใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลว มีทั้งที่เป็นรา และแบคทีเรีย ในกรณีของรานิยมใช้ *Aspergillus niger* (Das และ Kundu, 1987; Markwell และคณะ, 1989) แบคทีเรียนิยมใช้ *Gluconobacter oxydans* (Pronk และคณะ, 1989; Attwood และคณะ, 1991) จุลินทรีย์ที่เลือกใช้ผลิตกรดกลูโคนิคในระดับอุตสาหกรรมนี้ควรผลิตกรดกลูโคนิคได้เพียงชนิดเดียวในปริมาณมาก หรือถ้ามีผลิตภัณฑ์อื่นปนต้องมีเพียงเล็กน้อยและสามารถแยกออกได้ง่าย สำหรับงานวิจัยนี้ได้ใช้จุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกแล้วว่าผลิตกรดกลูโคนิคเพียงชนิดเดียว ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบในด้านการแยกผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์

วิธีการผลิตกรดกลูโคนิคในระดับอุตสาหกรรมที่นิยมทำมี 3 วิธีคือ

1. การผลิตโดยการหมักในถาด (Shallow pan method)
2. การผลิตโดยการหมักในอาหารเหลว (Submerged culture method)
3. การผลิตโดยใช้ถังหมักแบบกลองหมุน (Rotary drum method)

แต่วิธีการหมักในอาหารเหลว ทั้งที่เป็นถังหมักแบบตั้งหรือถังหมักแบบกลองหมุน เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากมีข้อได้เปรียบหลายประการคือ วิธีนี้สามารถผลิตกรดกลูโคนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณมาก ๆ ได้ในคราวเดียว ค่าใช้จ่ายด้านแรงงานต่ำ เครื่องมือทำให้ปลอดเชื้อได้ง่าย และมีอัตราการหมักเร็วกว่าการหมักในถาด (Mahmoud และคณะ, 1977) นอกจากนี้การผลิตกรดกลูโคนิคในระดับอุตสาหกรรม จำเป็นต้องใช้วิธีการที่ทำให้ได้ผลผลิตสูงสุดเพื่อให้คุ้มค่าและลดต้นทุนการผลิต

วิธีการที่นิยมใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิคในระดับอุตสาหกรรม

1. การเติมโบรอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการผลิตกรดกลูโคนิค ถ้าต้องการให้มีการผลิตกรดปริมาณสูงจะต้องใช้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ความเข้มข้นสูง แต่ที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูง (มากกว่า 10-15%) จะเกิดการตกตะกอนของแคลเซียมกลูโคเนต และรบกวนกระบวนการหมัก วิธีการป้องกันการตกตะกอนที่ได้ผลวิธีหนึ่ง คือ การเติมโบรอน ในรูปของกรดโบริค หรือสารประกอบอื่น ๆ ของโบรอน Moyer และคณะ (1940) พบว่า *Aspergillus niger* สามารถผลิตกรดกลูโคนิคที่น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 20 25 30 และ 35% ได้โดยไม่เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมกลูโคเนต เมื่อเติมโบรอน 500 1000 1500 และ 2500 พีพีเอ็มตามลำดับ Qadeer และคณะ (1975) รายงานว่า การเติมโบรอนจะทำให้สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้นมากกว่า 15% ในการผลิตกรดกลูโคนิคได้ Yasin และคณะ (1969) พบว่าการเติมโบรอน 0.25 0.57 และ 0.87% ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 20 25 และ 30% ตามลำดับ จะมีผลทำให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคเพิ่มขึ้น

2. การเติมวัตถุดิบเป็นลำดับ

เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิคได้ เนื่องจากการเติมวัตถุดิบเป็นลำดับจะทำให้สามารถใช้ปริมาณวัตถุดิบรวมตั้งต้นได้สูงและให้ผลผลิตกรดรวมสูงด้วย Ziffer และคณะ (1969) ได้รายงานว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสเป็นลำดับ ในการผลิตกรดกลูโคนิคด้วยวิธีการหมักแบบต่อเนื่องโดย *Aspergillus niger* NRRL3 โดยเริ่มต้นที่น้ำตาลกลูโคส 270 กก.ต่อ ลบ.ม. ต่อมาเติม 300 80 และ 90 กก.ต่อ ลบ.ม. ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการหมักจะไม่พบปัญหาเรื่องการตกตะกอน และวิธีนี้มีข้อดีคือ ทำให้ได้ผลผลิตเข้มข้นขึ้นเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการระเหยแห้ง นอกจากนี้ในช่วงหลังของกระบวนการหมักซึ่งเติมวัตถุดิบเป็นลำดับในความเข้มข้นสูง เช่น 80 กก. ต่อ ลบ.ม. เป็นต้น สามารถเติมได้โดยไม่จำเป็นต้องทำการฆ่าเชื้อก่อนเพราะที่ความเข้มข้นสูงเช่นนี้ จุลินทรีย์เจริญได้ยากทำให้ประหยัดพลังงานในส่วนที่ใช้เพื่อการฆ่าเชื้อ

3. การปรับปรุงสายพันธุ์

เนื่องจากกรดกลูโคนิคเกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคส มีเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในปริมาณสูงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มขึ้น และได้กรดกลูโคนิคเพิ่มขึ้นด้วย Fiedurekและคณะ (1986)ได้ทดลองเพิ่มผลผลิตเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสโดยการทำให้ *Aspergillus niger* G13 เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตร้าไวโอเล็ตร่วมกับไนโตรโซกัวนิดีน (Nitrosogaunidine) พบว่า 12 สายพันธุ์ จาก 960 สายพันธุ์ ผลิตเอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 ถึง 18% Markwell และคณะ (1989) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Aspergillus niger* NRRL-3 ด้วยโซเดียมไนไตรต์ (Sodium nitrite) 5 มก.ต่อ มล. พบว่า 7 สายพันธุ์ จาก 26 สายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์มีการผลิตเอนไซม์สูงขึ้นกว่าเดิม Witteveen และคณะ (1990) ได้ทดลองทำการกลายพันธุ์ *Aspergillus niger* โดยการฉายแสงอัลตร้าไวโอเล็ต พบว่าเชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสได้สูงขึ้นเช่นเดียวกัน

4. การตรึงเซล

เป็นวิธีการเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิคอีกวิธีหนึ่ง ในปัจจุบันมีความพยายามที่จะนำวิธีการตรึงเซลมาใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิคในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากมีข้อได้เปรียบหลายประการ คือสามารถใช้ได้หลายรอบโดยที่อัตราการผลิตยังคงที่ มีความคงทน สามารถใช้ผลิตกรดกลูโคนิคที่ความเข้มข้นวัตถุดิบสูงได้ และลดเวลาในการผลิตเนื่องจากไม่ต้องเตรียมหัวเชื้อใหม่ Sakurai และคณะ (1989) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้เซลล์ของ *Aspergillus niger* ที่ถูกตรึงบนผ้าที่ทอด้วยเส้นใยสังเคราะห์ผสมกับเส้นใยจากธรรมชาติ พบว่า สามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้สูงถึง 220 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นรวม 300 กรัมต่อลิตร และเซลราที่ถูกตรึงสามารถใช้ซ้ำได้ถึง 14 ครั้ง โดยที่อัตราการผลิตยังคงที่เช่นเดียวกับ Shiraishi และคณะ (1989) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้การตรึงเซลล์ *Gluconobacter suboxydans* และใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 100-250 กก.ต่อ ลบ.ม. พบว่า ได้ผลผลิตกรดกลูโคนิคถึง 84.6%

<u>ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิค</u>

1. แหล่งคาร์บอน

การผลิตกรดกลูโคนิค ส่วนใหญ่นิยมใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำเชื่อมเดกซ์โตรส น้ำตาลซูโครส คอร์นซีรัพ กากน้ำตาล และแป้งไฮโดรไลเสสชนิดต่าง ๆ เช่น แป้งข้าวโพดไฮโดรไลเสส แป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลเสส เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต (Hatcher, 1972; Su และคณะ, 1977; Kundu และ Das, 1982; Milsom และ Meers, 1985; Das และ Kundu, 1987)

รติกร กัณฑะพงศ์ (2534) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus* sp. G153 ในระดับขวดเขย่า พบว่าน้ำตาลกลูโคส 25% เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ให้ผลผลิตกรดสูงถึง 94% เมื่อเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 33°ซ. นาน 5 วัน Su และคณะ (1977) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีแป้งมันสำปะหลัง

ไฮโดรไลเสสเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะที่มีการกวน 500 รอบต่อนาที การให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที พบว่า 97% ของน้ำตาลที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปเป็นกรดกลูโคนิคในเวลา 35 ชั่วโมง Kundu และ Das (1982) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคโดยเชื้อ *Aspergillus niger* MN181 ในระดับขวดเขย่ามีแป้งข้าวโพดไฮโดรไลเสสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติมชานอ้อยซึ่งหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พบว่าแป้งข้าวโพดไฮโดรไลเสสให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงถึง 85.2% นอกจากนี้มีความเป็นไปได้ที่จะเพาะเลี้ยงเชื้อรา เช่น *Rhizopus oryzae* หรือ *Aspergillus flavus* ให้เจริญบนเมล็ดธัญพืช โดยเชื้อราที่ใช้นี้ต้องสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอไมเลสและกลูโคอไมเลสได้สูง เพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลซึ่งเป็นวัตถุดิบสำหรับกระบวนการหมัก (นภา โล่ห์ทอง, 2534)

นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้ว ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อการสร้างกรดกลูโคนิค ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus niger* อยู่ระหว่าง 110-250 กรัมต่อลิตร (11-25%) (Rohr และคณะ, 1983) Sakurai และคณะ (1989) ได้รายงานว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิค โดย *Aspergillus niger* อยู่ระหว่าง 10-15% และการผลิตกรดกลูโคนิคจะถูกยับยั้งเมื่อมีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 25% Das และ Kundu (1987) รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นมากกว่า 15% จะทำให้เกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตและยับยั้งการหมัก Qadeer และคณะ (1975) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 50 ลิตร พบว่า น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 15% จะเหมาะสมในการผลิตกรดโดย *Aspergillus niger* WRL-51 ส่วน Gastrock และคณะ (1938) ซึ่งผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักแบบกลองหมุน โดย *Aspergillus niger* สายพันธุ์ 67 พบว่าจะเกิดตะกอนของแคลเซียมกลูโคเนต เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 25 และ 30%

2. แหล่งไนโตรเจน

เชื้อราโดยทั่วไปสามารถใช้ได้ทั้งสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน และสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อการเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิค ได้แก่ เกลือแอมโมเนียม ยูเรีย คอร์นสตีปลิเคอร์ และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต

(Hatcher, 1972; Milsom และ Meers, 1985) นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ในการใช้ไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยสลายกากถั่วเหลือง ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ควรให้มีปริมาณมากนัก เพราะจะทำให้จุลินทรีย์มีการเติบโตมาก เป็นสาเหตุให้ได้ผลผลิตกรดกลูโคนิคน้อยลง (Rohr และคณะ, 1983) Miura และคณะ (1970) ใช้แอมโมเนียมฟอสเฟต 0.05% เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus niger* 5131 Qadeer และคณะ (1975) ผลิตแคลเซียมกลูโคเนตโดย *Aspergillus niger* WRL 51 โดยใช้แอมโมเนียมไนเตรต 0.25% เป็นแหล่งไนโตรเจน Kundu และ Das (1982) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคในรูปเกลือแคลเซียมกลูโคเนตโดย *Aspergillus niger* MN181 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.12% เป็นแหล่งไนโตรเจน Moresi และคณะ (1991) เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* NRRL3 เพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.22% เป็นแหล่งไนโตรเจน Takao และ Sasaki (1964) ทดลองใช้แหล่งไนโตรเจนหลายชนิดในการผลิตกรดกลูโคนิค โดย *Pullularia pullulans* พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% เป็นแหล่งไนโตรเจน จุลินทรีย์นี้ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงสุดมากกว่า 90% Elnaghy และ Megalla (1975) ได้รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Penicillium puberulum* ได้แก่ เปปโตน ส่วนเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้มีการเติบโตน้อยและไม่มีการผลิตกรดกลูโคนิค นอกจากนี้การผลิตกรดกลูโคนิคจะเกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนต่ำ Mandal และ Chatterjee (1985) ได้รายงานว่า แอมโมเนียมคลอไรด์ 300 มก.ไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Penicillium janthinellum* Herrick และ May (1928) กับ Su และคณะ (1977) ได้ทดลองแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคาร์บอเนต โซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และยูเรีย พบว่าโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Penicillium luteum-purpurogenum* ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร(คิดเป็น 0.016% ไนโตรเจน) ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิค 62.5% และเกลือแอมโมเนียมทุกชนิดที่ความเข้มข้น 0.05% เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับ *pullularia pullulans* และให้ผลผลิตกรดสูงมากกว่า 90% ตามลำดับ รติกร กัณฑะพงศ์ (2534) ได้ทดลองใช้แหล่ง

ไนโตรเจนทั้งที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ ผงสกัดยีสต์ ยูเรีย และสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ โซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับ *Aspergillus* sp. G153 ในการผลิตกรดกลูโคนิค ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.4%

3. แร่ธาตุ

เชื้อรา *Aspergillus* sp. G153 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตกรดกลูโคนิคในการทดลองนี้ ต้องการแร่ธาตุสำคัญคือ เหล็ก และ แมงกานีส ในปริมาณที่พอเหมาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ เหล็กในรูปเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) 10 มก.ต่อลิตร แมงกานีสในรูปแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)ไม่เกิน 500 มก.ต่อลิตร จึงจะทำให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูง (กรรณิกา จันทรสอาด, 2533) ในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้น้ำตาลกลูโคสและแร่ธาตุที่เป็นสารบริสุทธิ์ ควรเติมแมงกานีสลงไปด้วย มิฉะนั้นจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสน้อย ทำให้มีการใช้น้ำตาลไปเพื่อการเติบโตมากกว่า และมีผลิตภัณฑ์อื่นคือ กรดมะนาว และกรดออกซาลิกร่วมด้วย (Lockwood, 1975; Milsom และ Meers, 1985; Das และ Kundu, 1987) Herrick และคณะ (1928) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Penicillium luteum-purpurogenum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือและธาตุบางชนิด เช่น แมกนีเซียมในรูป $MgSO_4.7H_2O$ ฟอสฟอรัสในรูป Na_2HPO_4 และ H_3PO_4 โปตัสเซียมในรูป KCl พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต มีการสร้างสายใยน้อยมาก และไม่มีการผลิตกรดกลูโคนิค ส่วนฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.00043% จะทำให้ผลผลิตกรดลดลงอย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวกับโปตัสเซียมที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.00026% จะทำให้ไม่มีการเจริญของสายใยและผลผลิตกรดกลูโคนิคจะลดลง Elnaghy และ Megalla (1975) ได้รายงานว่า แมกนีเซียมในรูป $MgSO_4.7H_2O$ เป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการเติบโต และเมตาบอลิซึมใน *Penicillium puberulum* Munk และคณะ (1963) รายงานว่า การเติมแมกนีเซียมในปริมาณพอเหมาะจะเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสใน *Aspergillus niger* ทำให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่ำจะกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสใน *Aspergillus niger* ด้วยเช่นกัน Nakamura และ Ogura (1968) พบว่า เงิน ปรอท และทองแดง จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสใน

Aspergillus niger เช่นเดียวกับ กรรณิกา จันทรสอาด (2533) พบว่าเงิน ทองแดง และปรอท ยับยั้งการผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus* sp. G153 แม้มีในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 0.1 มก.ต่อลิตร Yasin และคณะ (1969) ได้ทดลองใช้ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ที่พบในประเทศปากีสถานเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ระบุปริมาณและองค์ประกอบทางเคมี แต่ใช้น้ำประปาโดยไม่ต้องเติมธาตุเหล็ก ทองแดง และสังกะสี ก็ให้ผลผลิตกรดสูงเช่นกัน Blom และคณะ (1952) และ Hatcher (1972) พบว่าสามารถใช้น้ำประปาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคได้เช่นกัน

4. อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน

เนื่องจากกรดกลูโคนิคเกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญมาก รวมทั้งการกวนที่จะช่วยให้ออกซิเจนได้สัมผัสกับเชื้อรามากขึ้น รติกร กัณฑะพงศ์ (2534) ศึกษาผลของชนิดขวดทดลองและความเร็วรอบของเครื่องเขย่าต่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus* sp. G153 ในระดับขวดเขย่า พบว่าการใช้ขวดแก้วทรงกรวยที่มีก้นบุบ และใช้ความเร็วของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ทำให้มีการเติมออกซิเจนให้กับน้ำตาลกลูโคสมากขึ้น จึงทำให้มีผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงและเร็วตามไปด้วย Wells และคณะ (1937) ได้ศึกษาผลของอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนที่มีต่อการผลิตกรดกลูโคนิค โดย *Aspergillus niger* ในถังหมักแบบกลองหมุน พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศและอัตราการกวน ผลผลิตกรดดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นด้วย โดยให้ผลผลิตกรดสูงสุด 420 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้อัตราการให้อากาศ 1.20 ลิตรต่อนาที และอัตราการหมุน 13 รอบต่อนาที Herrick และคณะ(1935) ได้รายงานว่า การใช้ถังหมักแบบกลองหมุนความจุ 17 ลิตรในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้สปอร์ที่ทำให้งอกแล้วของ *Aspergillus niger* เป็นหัวเชื้อ แปรผันอัตราการให้อากาศ 400-1,200 ลิตรต่อนาที อัตราการหมุน 13 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 30°ซ. พบว่าได้ผลผลิตกรดดังกล่าว 80% ใน 56 ชั่วโมง Currie และคณะ (1903) รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ และมีการกวน จะให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงถึง 90% ใน 48-60 ชั่วโมง Blom และคณะ (1952) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคในระดับโรงงานต้นแบบ

ในถังหมักความจุ 300 แกลลอน พบว่าอัตราการให้อากาศ 1.50 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที และอัตราการกวน 220 รอบต่อนาที จะให้ผลผลิตกรดใกล้เคียง 100% ใน 19 ชั่วโมง Nyeste และคณะ (1980) ได้เสนอแบบจำลองของถังหมัก และปรับปรุงกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 10 ลิตรโดยมีอัตราการให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อลิตรอาหารต่อนาที และอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที Ghosh และ Ghose (1978) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Pseudomonas ovalis* พบว่าการให้อากาศร่วมกับการกวน จะทำให้มีการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลได้มากกว่าการกวนเพียงอย่างเดียว Lee และคณะ (1987) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลาย (Dissolved oxygen) ที่มีต่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus niger* พบว่าการผลิตกรดกลูโคนิคจะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายจนถึง 150 พีพีเอ็ม

5. ปริมาณหัวเชื้อ

เป็นสิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งในการผลิตกรดกลูโคนิค Mahmoud และคณะ (1977) ได้ทดลองแปรผันขนาดของหัวเชื้อ *Aspergillus niger* NRRL3 ค่าต่าง ๆ กัน พบว่าผลผลิตกรดกลูโคนิคเพิ่มขึ้นจาก 1.4% เป็น 8.0% เมื่อเพิ่มขนาดของหัวเชื้อจาก 0.5 เป็น 2.5 ล้านสปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มล. Blom และคณะ (1952) รายงานว่าปริมาณหัวเชื้อ 10% ของ *Aspergillus niger* NRRL3 เป็นปริมาณที่ทำให้เกิดการหมักอย่างรวดเร็ว Qadeer และคณะ (1975) ได้ทดลองแปรผันปริมาณหัวเชื้อ *Aspergillus niger* WRL51 เป็น 4 10 และ 20% พบว่า ผลผลิตกรดกลูโคนิคเพิ่มขึ้นตามปริมาณหัวเชื้อที่เพิ่มคือ 78.8 103.5 และ 135.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รติกร กัณฑะพงศ์ (2534) ได้ทดลองหาชนิดและขนาดของหัวเชื้อ *Aspergillus* sp. G153 ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิค พบว่าการใช้หัวเชื้อชนิดสปอร์ที่งอกแล้วเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคดีกว่าหัวเชื้อชนิดสปอร์แขวนลอย และขนาดของหัวเชื้อ $2.5\text{-}5.0 \times 10^7$ สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มล. เป็นปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้

งานวิจัยนี้ มุ่งทดลองใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายแป้ง เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus* sp. G153 ทดแทนกลูโคสบริสุทธิ์ และหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมบางอย่าง ในระดับขวดเขย่า สำหรับนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมบางประการสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019442