บทที่ 1

บทนำ

การนำจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด ตัวอย่าง เช่น การนำจุลินทรีย์ไปใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะได้แก่ คลอแรมฟินิคอล เพนนิซิลิน และอื่นๆ การนำจุลินทรีย์ไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เอนไซม์ไคตินเนส และอื่นๆ การนำจุลินทรีย์มาใช้ในการผลิตกรดอินทรีย์ได้แก่ กรดอิทาโคนิก กรดกลูโคนิก กรดโคจิ และอื่นๆ กรดกลูโคนิก (gluconic acid, $C_6H_{12}O_7$) หรือกรดเพนตะไฮดรอกซีคาร์โพรอิก (pentahydroxycaproic acid) เป็นหนึ่งในกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ โดยขบวนการออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคสด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Martin, 1963; Bucke, 1983; Atlas, 1995) ดังสมการนี้

$$\beta\text{-D-glucose} + O_2 + H_2O \longrightarrow \text{gluconic acid} + H_2O_2$$

การผลิตกรดกลูโคนิกอาจทำโดยวิธีทางเคมี และใช้วิธีการหมักด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดกลูโคนิกได้มีทั้งที่เป็นแบคทีเรีย ได้แก่ *Moraxella* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp., *Enterobacter* sp. และ *Acetobacter (Gluconobacter) suboxydans*. ราได้แก่ *Pullularia* sp., *Aspergillus* sp., *Scopulariopsis* sp. และ *Gonatobotrys* sp. ยีสต์ได้แก่ *Endomycopsis fibuligera* (Milsom และ Meers, 1985)

ในปัจจุบันการผลิตกรดกลูโคนิกด้วยจุลินทรีย์นิยมใช้ *Aspergillus niger* และ *Acetobacter (Gluconobacter) suboxydans* (Casida, 1968; Milsom และ Meers, 1985) กรดกลูโคนิกที่มีขายในท้องตลาด ในปัจจุบันจะอยู่ในรูปสารละลาย 50 เปอร์เซนต์ ส่วนรูปผลึกของกรดจะไม่มีขายในตลาด (Lockwood, 1979; Rohr, 1982; Milsom และ Meers, 1985) การผลิตกรดกลูโคนิกในทางการค้านิยมผลิตในรูปเกลือโซเดียมกลูโคเนต หรือเกลือแคลเซียมกลูโคเนต

กรดกลูโคนิก ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 36.74 เปอร์เซนต์ ไฮโดรเจน 6.17 เปอร์เซนต์ และออกซิเจน 57.10 เปอร์เซนต์ มวลโมเลกุล 196.16 ละลายน้ำได้ดีและละลายในแอลกอฮอล์ได้เล็กน้อย ไม่ละลายในอีเทอร์และตัวทำละลายอื่นๆ มีสีเหลืองอ่อน กลิ่นคล้ายน้ำส้มสายชู (อ้างถึงใน Lockwood, 1979; Prescott และคณะ, 1959; Merck, 1989)

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

แคลเซียมกลูโคเนต ($C_{12} H_{22} CaO_{14}$) ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 33.49 เปอร์เซนต์ ไฮโดรเจน 5.16 เปอร์เซนต์ แคลเซียม 9.31 เปอรเซนต์ และออกซิเจน 52.05 เปอร์เซนต์ มีน้ำหนักโมเลกุล 430.38 ละลายได้ช้าๆ ในน้ำเย็น 30 ส่วน (น้ำหนักต่อปริมาตร) และในน้ำเดือด 5 ส่วน (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไม่ละลายในแอลกอฮอล์และตัวทำละลายอื่นๆ ไม่มีสี,กลิ่นและรส (Merck, 1989) ปัจจุบันยังไม่มีโรงงานผลิตกรดกลูโคนิกในประเทศไทย จึงอาศัยการนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งปริมาณนำเข้าในแต่ละปีจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ข้อมูลแสดงปริมาณการนำเข้ากรดกลูโคนิกและมูลค่าแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าประเทศไทยของกรดกลูโคนิก เกลือของกรด และเอสเทอร์ของกรด (ข้อมูลจาก กองบริหารข้อมูล กรมศุลกากร กระทรวงการคลัง, 2540)

ประเทศ	พ.ศ. 2531		พ.ศ. 2532		พ.ศ. 2533		พ.ศ. 2534		พ.ศ. 2535		พ.ศ. 2536		พ.ศ. 2537		พ.ศ. 2538		พ.ศ. 2539		ม.ค. - ส.ค. 40	
	KG	BATH	KG	BATH	KG	BATH	KG	BATH	KG	BATH	KG	BATH	KG	BATH	KG	BATH	KG	BATH	KG	BATH
SWITZERLAND	0	0	9	2906	0	0	1	699	3	1761	3501	2453	3	1025	2	1007	4	2943	7	6778
CHAINA	4000	268527	9000	517797	5000	362040	17000	428400	1000	75756	2500	358688	0	0	6000	418740	3000	234057	0	0
GERMANY	10635	1083452	6591	589332	9323	994556	17305	1798664	4468	514841	76372	4080354	2874	357815	32268	2511937	49281	2536057	2528	325580
DENMARK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20000	766200	0	0	0	0	0	0
SPAIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5000	146280	0	0	0	0	0	0
SPAEL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10000	345000	0	0	0	0	0	0
FINLAND	0	0	25500	875538	43000	1380767	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UNITED KINGDOM	0	0	3	628	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FRANCE	0	0	0	0	11000	398244	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IRELAND	2000	201280	3000	301320	0	0	4000	410480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INDIA	0	0	3500	215397	4000	239568	0	0	3000	202804	2000	162816	4000	323578	7000	561127	7000	584735	8015	706490
ITALY	0	0	0	0	0	0	12	2092	72	14701	0	0	0	0	0	0	19975	683055	50	25352
JAPAN	22000	830091	10025	389026	39030	1385787	67000	2250860	159010	6020097	191000	7124860	173760	6644251	170860	6583939	143925	5796908	73030	2827512
KOREA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30000	922020	15000	499770	0	0	15000	507780
NETHERLANDS	0	0	21000	782007	21500	829060	41500	1543320	40000	1476970	63000	2834494	70000	3546623	116500	5363264	208000	6882100	120250	3815061
TAIWAN	0	0	0	0	0	0	0	0	250	13336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
U.S.A.	0	241	0	0	2268	134982	20918	848011	19087	700269	39853	1605975	21426	819934	53728	1900496	23949	1264195	2579	1373392
TOTAL	38635	2383591	78628	3673951	135121	5725004	167736	7282526	226890	9020535	378226	16052975	337063	13872726	401412	17840280	455134	17984050	244675	9587945

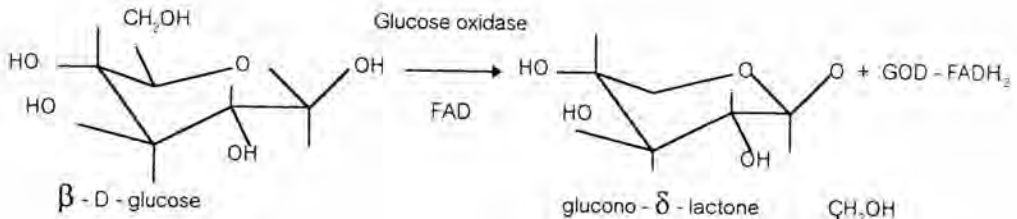
หมายเหตุ : KG หมายถึง ปริมาณการนำเข้า (กิโลกรัม)

BATH หมายถึง มูลค่านำเข้า (บาท)

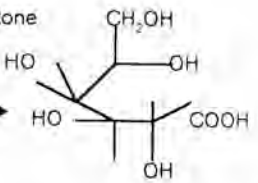
กระบวนการทางชีวเคมีของการผลิตกรดกลูโคนิก

การผลิตกรดกลูโคนิก ประกอบด้วย ขั้นตอนของการใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิกโดยเปลี่ยนหมู่ aldehyde ไปเป็นหมู่ carboxyl (Casida, 1968; Van Dijken และ Veehuis, 1980; Rogalski และคณะ, 1988; Markwell และคณะ, 1989; Anna Caridis และคณะ, 1991; Wilson และ Turner, 1992; Velizarov, และ Beschkov, 1994) ดังสมการต่อไปนี้

1.



2. glucono - δ - lactone + H_2O ⟶



gluconic acid

3. glucose oxidase-$FADH_2$ + O_2 + other electron acceptor ⟶ H_2O_2 or reduced electron acceptor

4. สมการสุทธิ :

β - glucose + O_2 + H_2O ⟶ gluconic + H_2O_2

รูปที่ 1 : ขั้นตอนการเกิดกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลกลูโคส

ที่มา : Bucke, 1983

จากสมการที่ 1 เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (β - D - glucose : oxygen -1 - oxidoreductase, E.C.1.1.3.4) มีฟลาวินอาดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Flavine adenine dinucleotide,FAD) เป็นเอนไซม์ร่วม (Coenzyme) เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนกลูโคส (เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะไปดึงอะตอมไฮโดรเจน 2 อะตอมออกมาจากน้ำตาลกลูโคส) ให้เป็น ดี-กลูโคโนเดลตาแลคโตน (D-glucono-δ- actone) (Bucke, 1983; Milsom และ Meers, 1985; Wilson และ Turner, 1992) หลังจากนั้นมีการไฮโดรไลซ์ ดี-กลูโคโนเดลตาแลคโตน ต่อได้เป็น กรดกลูโคนิก ดี-กลูโคโนเดลตาแลคโตนเป็นสารมัธยันต์ (intermediate) ถ้ามีการสะสมมากๆ จะทำให้อัตราการออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคสลดลง ทำให้ได้กรดกลูโคนิกน้อยลง โดยปกติ ดี-กลูโคโน

เดลตาแลคโตนจะเปลี่ยนไปเป็นกรดกลูโคนิก โดยการเกิดเองตามธรรมชาติโดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ แต่ถ้ามีเอนไซม์แลคโตเนส (lactonase) จะช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้น (สมการ 2) ส่วนเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่เปลี่ยนรูปไปจะไปรวมตัวกับออกซิเจนได้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (สมการ 3) ซึ่งเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ แต่ในจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดกลูโคนิกได้ เช่น *Aspergillus niger* จะมีเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ซึ่งสามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำกับออกซิเจนได้ (Van Dijken และ Veenhuis, 1980; Rohr และคณะ, 1982; Milsom และ Meers, 1985; Das และ Kundu,1987; Witteveen และคณะ, 1992; Hellmuth และคณะ, 1995)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตกรดกลูโคนิก

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

มีการศึกษาเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1928 โดย Muller แยกได้จาก *Aspergillus niger* และ *Penicillium glaucum* เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เกาะอยู่ภายในเซลล์ (cell bound enzyme) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160,000 มีโคเอนไซม์คือ FAD 2 หน่วย และมีคาร์โบไฮเดรต 16 เปอร์เซนต์ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจนไปยังออกซิเจน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาคือ กลูโคโนเดลตาแลคโตน เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมีความจำเพาะกับน้ำตาลกลูโคสในรูป β - D - glucose มากกว่า δ - D - glucose ถึง 156 เท่า (O'Malley และ Weaver, 1972; Bucke, 1983; Hartmeier และ Doppner, 1983; Hatzinikolaou และ Macris, 1995; Chu และคณะ,1997) นอกจากนี้ในการทำงานของกลูโคสออกซิเดสนั้นอาจถูกยับยั้งได้ถ้ามี เงิน ปรอท และทองแดง (Nukamura และ Ogura, 1968; Wilson และ Tumer, 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)

เอนไซม์กลูโคโนแลคโตเนส มีบทบาทต่อกลูโคโนเดลตาแลคโตน ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ในการผลิตกรดกลูโคนิค และเอนไซม์นี้ผลิตได้จาก *Aspergillus niger* โดยปกติ

กลูโคโนเดลตาแลคโตน จะเปลี่ยนเป็นกรดกลูโคนิก โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ แต่ถ้ามีการสะสมกลูโคโนเดลตาแลคโตนมาก จะทำให้มีผลยับยั้งการออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคส ดังนั้น ถ้ามีเอนไซม์แลคโตเนส (lactonase) ก็จะช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้น (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) ซึ่งเอนไซม์คะตะเลสสามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ (ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการผลิตกรดกลูโคนิก) ได้เป็นออกซิเจนกับน้ำ (Kleppet, 1966; Casida, 1968; Milsom และ Meers, 1985)

ประโยชน์ของกรดกลูโคนิก อนุพันธ์ของกรดและเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

กรดกลูโคนิก อนุพันธุ์ของกรดและเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมีประโยชน์หลายด้านได้แก่

1. ใช้ในทางการแพทย์

แคลเซียมกลูโคเนตและเฟอร์รัสกลูโคเนต ใช้เป็นยาในการบำบัดโรคที่ขาดธาตุแคลเซียมและเหล็ก (Lockwood, 1975; Das และ Kundu, 1987)

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ใช้ในการตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดและปัสสาวะ (Ward, 1977; Merck, 1989; Caridis และคณะ, 1991; Wilson และ Tumer, 1992)

2. ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

กรดกลูโคนิค ใช้ผสมในหมากฝรั่ง เพื่อป้องกันการตกผลึกของน้ำตาลซอร์บิทอล ซึ่งเป็นสารให้ความหวานในหมากฝรั่ง (Pederson และ Sonder, 1981)

กรดกลูโคนิก และกลูโคโนเดลตาแลคโตน ใช้ผสมในเต้าหู้ เพื่อช่วยทำให้เต้าหู้แข็งตัวและมีรสเปรี้ยว นอกจากนี้ยังพบว่ามีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวน *Bifidobacterium* sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้มนุษย์ แต่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Clostridium perfringen* นอกจากนี้ยังพบอีกว่ากรดกลูโคนิกสามารถถูกใช้ได้ใน *Bifidobacterium adolescentis* group, *Clostridium clostridiiforme*, *Clostridium*

innocum, Propionibacterium acnes, Megasphaera elsdenii, Enterococcus faecium and Klebsiella pnemoniae (กรดกลูโคนิก ช่วยเพิ่มจำนวนเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย, 2536 ; Asano และคณะ, 1994; Asano และคณะ, 1995)

กรดกลูโคนิก ใช้เติมลงในเนื้อบรรจุหีบห่อเพื่อทำให้เกิดสีแดงน่ารับประทาน และเก็บไว้ได้นาน (Zepeda และคณะ, 1994)

แคลเซียมกลูโคเนต ใช้ผสมในอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ปีกทำให้เปลือกไข่แข็งขึ้น (Das และ Kundu, 1987)

โซเดียมกลูโคเนต ใช้ป้องกันการตกตะกอนของนมและเบียร์ (Su และ คณะ,1977)

กลูโคโนเดลตาแลคโตน ใช้เป็นส่วนผสมของผงฟูในการทำขนมปัง เนื่องจากเมื่อใส่กลูโคโนเดลตาแลคโตนลงไปในแป้งทำขนมปังจะช่วยควบคุมการปลดปล่อยของคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้ขนมปังฟูสม่ำเสมอ (Prescott และ Dunn, 1959; Ward, 1977; Milsom และ Meer, 1985; Das และ Kundu, 1987; Markwell และคณะ, 1989)

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ใช้ป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นของสารอาหาร (กำจัดออกซิเจน) เนื่องจากปริมาณออกซิเจน และสารกระตุ้นต่างๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่น รส ของอาหาร จึงมีการใส่เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เพื่อลดออกซิเจนในอาหารและเครื่องดื่ม ได้แก่ น้ำส้ม เบียร์ ไวน์ มายองเนส น้ำแต่งสลัด และอาหารแห้ง ซึ่งในการทำจะใส่ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และกลูโคสในภาชนะบรรจุที่ยอมให้ออกซิเจนผ่านได้อย่างเดียว จากนั้นนำถุงสารละลายที่เตรียมไว้บรรจุไปกับอาหาร โดยเฉพาะอาหารแห้งที่ต้องการลดออกซิเจน (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535; Richter, 1983)

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ใช้กำจัดกลูโคส เพื่อป้องกันการเกิดสีน้ำตาลและกลิ่นในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีโปรตีนสูง เช่น ไข่ผง แป้งสาลี ในกรณีนี้อาจใช้ร่วมกับเอนไซม์คะตะเลส หรือไม่ก็ได้ เนื่องจากในปฏิกิริยาของกลูโคสออกซิ เดส จะให้ผลผลิต เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งอาจจะก่อกลิ่นแปลกปลอมได้ ถ้ามีปริมาณสูง ในบางผลิตภัณฑ์ก็ไม่มีความจำเป็นต้องกำจัด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกด้วยเอนไซม์คะตะเลส ทั้งนี้เพราะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535; Ward, 1977; Merck, 1989; Hatzinikolao และ Macris, 1995)

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

3. ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ

โซเดียมกลูโคเนต สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ดังนี้

- ใช้ในอุตสาหกรรมเส้นใยสิ่งทอ โดยโซเดียมกลูโคเนตจะเป็นสารป้องกันไม่ให้มีการปนเปื้อนของเหล็กในกระบวนการย้อมผ้า (Blom และคณะ, 1952) และป้องกันการเกาะติดของเกลือที่ปะปนอยู่ในน้ำกระด้างบนผ้า

- ใช้ในอุตสาหกรรมย้อมสีหนัง โดยป้องกันการตกตะกอนของไฮดรอกไซด์ของโลหะบางชนิดที่ใช้ในกระบวนการย้อมสีหนัง(Prescott และคณะ, 1953; Bucke, 1983)

- ใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาทำความสะอาดโลหะ ป้องกันสนิม โดยเฉพาะในกรณีที่ใช้น้ำกระด้างซึ่งจะเกิดสนิมได้ง่าย ใช้ทำความสะอาดแก้วภาชนะต่างๆ และเป็นองค์ประกอบของน้ำยาทำความสะอาดหนัง (Lockwood, 1979; Smith และคณะ, 1981;) Milsom และ Meer, 1985)

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

- ใช้ในอุตสาหกรรมภาพถ่ายจะช่วยให้สารเคมีที่ใช้มีความเสถียร และ ป้องกันการตกตะกอนของโลหะออกไซด์ในถังบรรจุด่าง (Prescott และคณะ, 1953)

สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิก

เนื่องจากกรดกลูโคนิกมีประโยชน์มากดังกล่าวข้างต้น จึงมีผู้สนใจทำการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตกรดและได้จดสิทธิบัตรไว้มากมาย ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิก

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Bergmeyer และ Jaworek (1976)	US 3,935,017	Process for the conversion of glucose in to gluconic acid
Hartmeier (1987)	US 4,460,686	Glucose oxidation with immobilized glucose oxidase-catalase
Scopes, Rogers และ Leigh (1988)	US 4,755,467	Method for the production of sorbitol and gluconate
Bringer-Meyer และ Sahn (1991)	US 5,017,485	Process for obtaining sorbitol and gluconic acid by fermentation, and cell material suitable for this purpose
Rehr และ Sahm (1991)	EP 0,427,150	Process for production of sorbitol and gluconic acid or gluconate and biomass therefor
Rehr และ Sahm (1992)	US 5,102,795	Process for obtaining sorbitol and gluconic acid or gluconate
Rehr และ Sahm (1993)	US 5,190,869	Process for obtaining sorbitol and gluconic acid or gluconate using *Zymomonas mobilis*

การผลิตกรดกลูโคนิกในระดับอุตสาหกรรม

จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิก ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *Gluconobacter suboxydans* แต่ในปัจจุบันนิยมผลิตกรดกลูโคนิกด้วย *Aspergillus niger* มากกว่า *Gluconobacter suboxydans* เนื่องจากมักไม่พบผลิตภัณฑ์อื่นๆ ร่วม ในการผลิตกรด แต่สำหรับ *Gluconobacter suboxydans* นั้น ในการผลิตกรดจะได้ คีโตกลูโคเนตเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมกับกรดกลูโคนิกด้วย (Weenk และคณะ, 1984; Seiskari และคณะ, 1985; Trager และคณะ, 1992) ในการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับอุตสาหกรรมนั้น มีหลายวิธี ได้แก่ การผลิตกรดกลูโคนิกโดยวิธี การหมักในถาด (shallow pan method) ที่ทำด้วยอลูมิเนียม ซึ่งได้ทดลองศึกษาโดย May และคณะ ในปี ค.ศ. 1929 (อ้างถึงใน Milsom และ Meers, 1985) การผลิตกรดกลูโคนิกโดยวิธีการหมักในอาหารเหลว (submerger culture method) ซึ่งได้ศึกษาโดย Currie Kane และ Finlay ในปี ค.ศ. 1933 (อ้างถึงใน Milsom และ Meers, 1985) ต่อมา Porges และคณะ (1938) ได้พัฒนาเป็นวิธีการหมักในอาหารเหลวแบบกึ่งต่อเนื่อง (อ้างถึงใน Milsom และ Meers, 1985) การผลิตกรดกลูโคนิกโดยการใช้ถังหมักแบบกลองหมุน (rotary drum method) ซึ่งได้ศึกษาโดย Hemic และคณะ (อ้างถึงใน Prescott และ Dun, 1959) ต่อมาในปี ค.ศ. 1937 Moyer และคณะ ได้ปรับปรุงวิธีการ และใช้ถังหมักขนาดใหญ่ขึ้น (Moyer และคณะ, 1937) และการหมักกรดกลูโคนิกโดยการใช้ถังหมักที่มีการให้อากาศพร้อมทั้งการกวน (stirred aerater tank fermentor) ซึ่งศึกษาโดย Bolm และคณะ ในปี ค.ศ. 1952 วิธีการหมักในอาหารเหลวทั้งแบบถังตั้ง และถังหมักแบบกลองหมุน มีข้อดี คือสามารถผลิตกรดกลูโคนิก ได้ครั้งละมากๆ ในคราวเดียว เครื่องมือทำให้ปลอดเชื้อง่าย ค่าใช้จ่ายด้านแรงงานต่ำ และมีอัตราการหมักเร็วกว่าการหมักในถาด การผลิตกรดกลูโคนิกนิยมผลิตใน 2 รูป คือในรูปแคลเซียมกลูโคเนต โดยเติมแคลเซียมคาร์บอเนตหรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นสารควบคุมความเป็นกรดด่าง โดยเติมเพียงครั้งเดียว เมื่อเริ่มการทดลอง จะควบคุมความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 5.5 - 6.5 (นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539; Ward, 1967; Rohr และคณะ, 1982) และในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดยควบคุมความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 5.5-6.5 ตลอดการทดลองด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (จินตนา ไกรวัฒนพงศ์, 2536; Ward, 1967) การผลิตกรดกลูโคนิกในระดับอุตสาหกรรมนั้น นอกจากจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิต เช่น ชนิด และ

ปริมาณของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณออกซิเจน แล้วยังต้องคำนึงถึงต้นทุนของการดำเนินการผลิต โดยต้องพยายาม หาวิธีการที่ทำให้ได้ผลผลิตกรดสูงสุด และค่าใช้จ่ายในการผลิตต่ำ เช่นเลือกใช้วัตถุดิบที่หาง่าย ราคาถูก เช่น ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายแล้วมาเป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ (บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536; Su และคณะ, 1977; Jantrapanukom และ Chantarasa-ard, 1992; Rogalski และคณะ, 1996) แป้งข้าวโพดที่ย่อยแล้ว (Vassilev และคณะ, 1993) มีการพัฒนาโดยนำสปอร์มาใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิก เพื่อลดขั้นตอนการผลิต เนื่องจากไม่ต้องเสียเวลาในการเตรียม seed tank และประหยัดอาหารเลี้ยงเชื้อ (Moksia และคณะ, 1996) การใช้สายใยอิสระซ้ำในการผลิต (จินตนา ไกรวัฒนพงศ์, 2536; Hatcher, 1972) และอีกวิธีหนึ่งที่จะลดต้นทุนการผลิตได้ คือ การตรึงเซลล์หรือสายใย และตรึงเอนไซม์ (Sakurai และคณะ, 1989; Vassilev และคณะ, 1993; Nakao และคณะ, 1997) เนื่องจากสามารถนำเซลล์หรือสายใยตรึงมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง โดยอัตราการผลิตคงที่ และช่วยลดเวลาในการผลิต เนื่องจากไม่ต้องเตรียมหัวเชื้อใหม่ นอกจากนี้มีความยุ่งยากน้อยกว่าการตรึงเอนไซม์มาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกที่จะตรึงสายใยเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิก

การตรึงเซลล์

การใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตสารต่างๆ นั้นทำได้หลายวิธี เช่น การใช้จุลินทรีย์ผลิตสารที่ต้องการโดยตรง การใช้เอนไซม์ทั้งในรูปเอนไซม์บริสุทธ์ เอนไซม์ตรึงรูป และการใช้เซลล์หรือสายใยตรึง การตรึงเซลล์ หรือสายใย คือ การกักเซลล์ หรือ สายใยให้อยู่ในขอบเขตจำกัดโดยความสามารถต่างๆ ของเซลล์ หรือสายใยยังคงอยู่ เซลล์หรือสายใยตรึงสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำ และใช้ในการผลิตแบบต่อเนื่องได้ เซลล์หรือสายใยที่ถูกตรึง จะสามารถเติบโต และตายได้ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activities) ที่ต้องการยังคงอยู่เทคนิคการตรึงเซลล์ได้รับการพัฒนามาจากเทคนิคการตรึงเอนไซม์ หรืออีกนัยหนึ่งอาจกล่าวได้ว่าเทคนิคการตรึงเซลล์เป็นการหาหนทางแก้ปัญหาของการตรึงเอนไซม์ เนื่องมาจากในการผลิตสารบางชนิด ถ้าต้องการเอนไซม์หลายชนิดมาเกี่ยวข้องในปฏิกิริยา และต้องการเอนไซม์ร่วม จะไม่สะดวกที่จะตรึงเอนไซม์ทุกๆ ตัว ในการตรึงเอนไซม์ ยังพบว่าความเสถียรไม่เท่ากับเอนไซม์ที่มีอยู่ในภาวะธรรมชาติในเซลล์ และการตรึงเอนไซม์ต้องผ่านขั้นตอนการ

สกัด และทำให้บริสุทธิ์ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการตรึงเอนไซม์สูงตามไปด้วย นอกจากนี้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ถูกตรึงสูงเกินไปอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาโปรตีนต่อโปรตีน (protein-protein interaction) ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นจึงใช้ความหนาแน่นของเอนไซม์ตรึงต่อหน่วยปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อได้ต่ำ (Chibata และ Tosa, 1983; Federici, 1993) จากข้อเสียของการตรึงเอนไซม์นี้ จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรึงเซลล์ขึ้นมา แต่อย่างไรก็ตาม การตรึงเซลล์ต้องคำนึงถึง เอนไซม์ชนิดอื่นภายในเซลล์ คือต้องไม่มีเอนไซม์อื่นในปริมาณมากจนมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ต้องการ หรือสามารถกำจัดเอนไซม์ที่ไม่ต้องการได้ นอกจากนี้สารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ ควรมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เพื่อให้สามารถผ่านเข้าออกในบริเวณที่เซลล์ถูกตรึงได้ การตรึงเซลล์ถือได้ว่าเป็นกระบวนการที่เลียนแบบวิธีการที่พบในธรรมชาติ เช่น จุลินทรีย์ที่เกาะติดกับหิน ทราย ซึ่งช่วยในการบำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม โดยกระบวนการทริกกริ้งฟิลเตอร์ (Trickling filter) หรือการผลิตกรดน้ำส้ม และกรดมะนาว ที่มีการเติมขี้เลื่อยลงไปในถังหมัก เพื่อให้แบคทีเรีย หรือ ยีสต์ *Candida guilliermondii* เกาะตามลำดับทำให้ผลผลิตดีขึ้น (Brodelius และ Vandamme, 1987; Tisnadjaja และคณะ 1996)

วิธีการตรึงเซลล์หรือสายใย

วิธีการที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์หรือสายใยสามารถแบ่งออกเป็นวิธีใหญ่ๆ ได้ 2 วิธี

1. **แอคทีฟ อิมโมบิไลเซชั่น** (Active Immobilization)

เป็นวิธีการที่เซลล์ หรือสายใยตรึงกับวัสดุตรึงโดยใช้สารเคมีเป็นตัวก่อให้เกิดการตรึง มี 3 วิธี คือ

1.1 **การเกิดพันธะโควาเลนต์** (covalent bonding)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เกิดขึ้นโดยใช้สารเคมีทำให้เซลล์ และวัสดุตรึงที่อาจเป็นสารอินทรีย์ หรือ สารอนินทรีย์ เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยกระตุ้นวัสดุตรึงด้วยสารเชื่อมไขว้ เช่น พอลิไอโซไซยาเนต หรือ คาร์โบไดไอมายด์ อะมิโนซิแลน หรือกลูตารัลดีไฮด์ เมื่อเติมสารละลายเซลล์ลงไป หมู่ของสารเชื่อมไขว้ที่อยู่บนผิวของวัสดุตรึงจะเชื่อมเซลล์ให้ติดกันอยู่บนผิวของวัสดุตรึงนั้น ซึ่งพบว่าการเชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนต์นั้นมีความแข็งแรง และเสถียรมาก เนื่องจากการเกิดพันธะโควาเลนต์ต้องผ่านขั้นตอนของการสลายพันธะโควาเลนต์เดิม ดังนั้นพลังงานการสลายยิ่งสูง โมเลกุลใหม่ที่ได้จะมีพันธะ

โควาเลนต์แข็งแรง และเสถียรมากขึ้น ด้วยเหตุผลนี้ภาวะของปฏิกิริยาการเกิดพันธะโควาเลนต์จึงค่อนข้างรุนแรง และมีผลต่อแอคติวิตีของเซลล์ และความอยู่รอดของเซลล์ลดลง (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535; Brodelius and Vanda, 1987; Fukuda, 1995)

1.2 **การกักขังเซลล์** (entrapment)

เป็นวิธีการทำให้เซลล์หรือสายใยถูกตรึงไว้ในช่องว่างของตาข่าย หรือถูกห่อหุ้มไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้สารซึมผ่านได้บ้าง (semipermeable membrane) เช่นสารตั้งต้น และสารผลิตภัณฑ์ การตรึงด้วยวิธีนี้แตกต่างจากวิธีตรึงด้วย พันธะโควาเลนต์ เนื่องจากไม่มีการเชื่อมด้วยพันธะเคมีใดๆ กับสารห่อหุ้ม จึงเป็นที่นิยมแพร่หลายในการตรึงเซลล์ เอนไซม์ ออร์กาเนลล์ เซลล์พืช เซลล์สัตว์ วัสดุตรึงที่นิยมใช้แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. พอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ แป้ง แป้งโคจาค (kojak, glucomannan polymer) ไคติน ไคโตแซน อัลจิเนต คาราจิแนน
2. พอลิเมอร์สังเคราะห์ (สร้างจากสารโมโนเมอร์ และไดเมอร์) ได้แก่ พอลิอะคริลามายด์ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ไดเมธาคิลเรทพอลิเมอร์ และยูรีเทนพรีพอลิ เมอร์

การตรึงเซลล์โดย วิธีกักขังเซลล์หรือสายใยนี้มีข้อจำกัด บ้างเช่น การตรึงเซลล์ในพอลิอะคริลาไมด์ โมโนเมอร์ของอะคริลาไมด์ และบิส ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ ทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี หรือการตรึง ในเรซินที่เชื่อมไขว้ด้วยแสง และการตรึงในพอลิเมอร์สายสั้นๆ ของยูรีเทนเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก และเอนไซม์จะสูญเสียความเสถียร และการตรึงเซลล์ในแคลเซียมอัลจิเนต แคลเซียมอัลจิเนตจะสูญเสียความเสถียรเมื่อมีอนุมูลอิสระบางชนิดในระบบ เช่น ฟอสเฟต ซิเตรต แลคเตด อีดีทีเอ เป็นต้น (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535; Brodelius และ Vanda, 1987; Fukuda, 1995)

2. **พาสซีฟ อิมโมบิไลเซชั่น** (Passive Immobilization)

เป็นวิธีการที่เซลล์ หรือสายใยเกิดการตรึงกับวัสดุตรึงได้เองตามธรรมชาติ มี 2 วิธี คือ

2.1 การเกาะติดบนวัสดุตรึง (adsorption)

เป็นการเกาะติดของเซลล์ที่เกิดขึ้นเอง เนื่องจากแรงดึงดูดทางไฟฟ้าระหว่างผิวของเซลล์ กับ วัสดุตรึง แรงที่เกิดขึ้น เช่น แรงวัลเดอร์วาล ข้อเสียของการเกาะติดบนวัสดุตรึง คือ อาจเกิดการรั่วของเซลล์ออกจากวัสดุตรึงได้ง่าย เนื่องจากการจับของเซลล์กับวัสดุตรึงเป็นแรงที่ค่อนข้างอ่อน วัสดุตรึงที่นิยมใช้ได้แก่ เซลลูโลส เดกซ์แทน หรือเรซินที่เติมหมู่อิออน เช่น ไดเอทิลอะมิโนเอทิล-เซลลูโลส เลคติน การเกาะติดบนวัสดุตรึง ถือได้ว่าเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติได้ด้วยเช่นกัน เช่น การเกาะติดของจุลินทรีย์ในหินและทราย ซึ่งช่วยในการบำบัดน้ำเสียโดยกระบวนการทริกกริ้งฟิลเตอร์ การเกาะติดของแบคทีเรียที่ผนังลำไส้ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535; Chibata และคณะ, 1978; Bickerstaff, 1997; Fukuda, 1995)

2.2 เซลล์หรือสายใยเจริญในวัสดุตรึง (colonization)

สำหรับการตรึงโดยวิธีนี้วัสดุตรึงที่ใช้ควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือ มีลักษณะเป็นรูพรุน หรือมีโครงสร้างที่เป็นร่างแหสานกันอยู่ ทนต่อสารเคมี ทนความร้อนได้ดีสามารถนำไปทำให้ปลอดเชื้อได้ วิธีการตรึงเซลล์หรือสายใยกระทำโดย นำวัสดุตรึงเติมลงในถังหมัก ทำการฆ่าเชื้อ แล้วผ่านขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อตามปกติ โดยเติมเซลล์หรือ สปอร์ราลงไป เซลล์จะเจริญ หรือสปอร์ของราจะงอกเป็นสายใย และถูกตรึงอยู่ภายในวัสดุตรึงเองในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ วัสดุตรึงต่างๆ ที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้ เช่น ชิ้นเหล็กปลอดสนิม พอลิเอสเทอร์โฟม พอลิอีเทอร์โฟม พอลิยูรีเทนโฟม ซิลิโคนโฟม พอลิไวนิลฟอมัล เรซิน เซลลูโลสที่มีรูพรุน (Fukuda, 1995; Varesche และคณะ, 1997)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างวัสดุตรึงชนิดต่างๆ ที่นิยมใช้ตรึง เซลล์ หรือสายใยรา

วัสดุตรึง	จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
พอลิอะคิลามายด์	*Escherichia coli*	กรดแอล-แอสพาติก	chibata และคณะ, 1974
แคลเซียมอัลจิเนต	*Gluconobacter oxydans*	กรดซิตริก	Eikmeier และ Rehm, 1984

ตารางที่ 3 ตัวอย่างวัสดุตรึงชนิดต่างๆ ที่นิยมใช้ตรึงเซลล์ หรือสายใยรา (ต่อ)

วัสดุตรึง	จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
พอลิอะคริลามายด์	*Aspergillus niger*	กรดซิตริก	Horitsu และคณะ, 1985
เส้นใยไนลอน	*Gluconobacter suboxydans* ATCC 621	กรดกลูโคนิก	Seiskari และคณะ, 1985
แคลเซียมอัลจิเนต	*Aspergillus niger*	กรดซิตริก	Tsay และ To, 1987
ซิลิกา และ อัลจิเนต (colloidal silica and alginate)	*Saccharomyces cerevisiae* IFO 0224	เอธานอล	Fukushima และคณะ, 1988
เซรามิคที่มีลักษณะคล้ายรังผึ้ง	*Gluconobacter oxydans*	กรดกลูโคนิก	Shiraishi และคณะ, 1989
แคปปา-คาร์ราจิแนน	*Escherichia coli*	อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	Manin และคณะ, 1989
ผ้าใยสังเคราะห์	*Aspergillus niger*	กรดกลูโคนิก	Sakurai และคณะ, 1989
ซินเทอร์กลาส	*Saccharomyces cerevisiae*	กลีเซอรอล	Hecker และคณะ, 1990
ผ้าไนลอน	*Yarrowia lipolytica*	กรดซิตริก	Kautola และคณะ, 1991
เรซินที่เชื่อมไขว้ด้วยแสง	*Zymomonas mobilis*	เอธานอล	Iida และคณะ, 1993
พอลิยูรีเทนโฟม และ Celite R-663	*Aspergillus niger* KKS	เซลลูโลส และไซแลนเนส	Kang และคณะ, 1995

ตารางที่ 3 ตัวอย่างวัสดุตรึงชนิดต่างๆ ที่นิยมใช้ตรึง เซล์ หรือสายใยรา (ต่อ)

ขี้เลื่อย	*Candida guilliermondii*	กรดซิตริก	Tisnadjaja และคณะ, 1996
เม็ดเซลลูโลส (porous cellulose beads)	*Aspergillus niger*	กรดซิตริก	Sakurai และคณะ, 1997

การตรึงเซลล์หรือสายใยในวัสดุตรึง พอลิยูรี เทนโฟม (Polyurethane foam : PUF)

วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ PUF ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ที่เกิดจากปฏิกิริยาแบบรวมตัวของสารพอลิออลและสารไอโซไซมาเนต

พอลิออล + ไอโซไซยาเนต ⟶ พอลิยูรีเทน

(Polyol) (Isocyanate) (Polyurethane)

ซึ่งพอลิออลที่นิยมใช้ได้แก่ พอลิอีเทอร์ (Polyether) หรือพอลิเอสเทอร์ (Polyester) ส่วนสารไอโซไซยาเนตที่นิยมแพร่หลายได้แก่ โทลูอีนไดไอโซไซยาเนต (TDI), เมธิลีนไดเฟนิลไดไอโซไซยาเนต (MDT) หรือโพลิเมอริกไอโซไซยาเนต (PMDI) ซึ่งลักษณะที่แตกต่างกันของพอลิยูรีเทนขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิออลและชนิดของไอโซไซยาเนตที่ใช้ สามารถแบ่ง PUF ตามลักษณะโครงสร้างของรูพรุนได้ 3 ชนิด (บรรเลง ศรานิล, 2535; วีณา ลี้เลิศพันธ์ชัย, 2537; กัญจนา ตระกูลคู, 2537)

1. ชนิดโครงสร้างแบบปิด

เป็นโฟมที่มีรูพรุนไม่ติดต่อถึงกัน ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชั่นแบบรวมตัวระหว่างโพลิเมอริกไอโซไซยาเนต (PMDI) กับพอลิอีเทอร์พอลิออล ส่วนการเกิดช่องอากาศแบบปิดนั้นเกิดจากการเป่าสารฟลูออโรคาร์บอนลงไป พอลิยูรีเทนโฟมแบบนี้มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ใช้ในเครื่องเย็น (วัสดุกักความร้อนในตู้เย็น) อาคารและสิ่งก่อสร้าง ฉนวนสำหรับที่เก็บน้ำ

2. ชนิดโครงสร้างแบบเปิด

เป็นโฟมที่มีรูพรุนต่อถึงกันจนทำให้ก๊าซหรืออากาศหมุนเวียนถึงกันได้ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชั่นแบบรวมตัวระหว่างโทลูอีนไดไอโซไซยาเนต (TDI), พอลิอีเทอร์พอลิออลและน้ำ ส่วนการเกิดฟองเป็นโครงสร้างโฟมที่มีช่องอากาศเปิดเกิดจากปฏิกิริยาของน้ำกับไดไอโซไซยาเนต (diisocyanate) ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือบางทีก็มีการเติมสารฟลูออโรคาร์บอนและเมธิลีนคลอไรด์เข้าไปเพื่อให้นิ่มและลดความหนาแน่น ประโยชน์ของโฟมชนิดนี้ส่วนใหญ่ใช้เป็นเฟอร์นิเจอร์และที่นอน นอกจากนี้ใช้ทำเบาะรถยนต์และรองพื้นพรม

3. ชนิดโครงสร้างแบบผสม (mixed)

เป็นโฟมที่ประกอบด้วยเซลล์ปิดและเปิดอยู่ด้วยกัน มักใช้เป็นวัสดุกันกระแทก การตรึงเซลล์ใน PUF สามารถกระทำได้ 2 แบบ

1. **การตรึงเซลล์โดยวิธีกักขังเซลล์ใน** PUF (Brodelius and Vandamme, 1987)

สามารถทำได้โดยเตรียมสารพรีพอลิ เมอร์ (prepolymer) ของพอลิยูรีเทนที่มีหมู่ไอโซไซยาเนตที่ปลายทั้งสองข้างแล้วนำมาผสมกับสารละลายเซลล์และเติมยูเรียลงไปจะเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชั่นระหว่างหมู่ไอโซไซยาเนตของพรีพอลิเมอร์ (prepolymer) หลายๆ โมเลกุลทำให้เกิดโครงร่างตาข่ายของสายพอลิเมอร์ เซลล์จะถูกตรึงอยู่ในโครงร่างตาข่ายของพอลิเมอร์เหล่านี้ สามารถจะทำให้พอลิยูรีเทนอยู่ในรูปของโฟมหรือเจลก็ได้ขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของพอลิไอโซไซยาเนตที่ใช้ วิธีนี้นิยมนำไปผลิตสารผลิตภัณฑ์ในถังหมักแบบฟิกซ์เบด (fixed bed fermentor) แต่ปัจจุบันไม่นิยมใช้วิธีนี้เนื่องจากมีขั้นตอนยุ่งยากและมีผลทำให้ความเสถียรของเอนไซม์ลดลง

2. **การตรึงเซลล์โดยวิธีการทำให้เซลล์หรือสายใยเจริญใน** PUF (Fukuda, 1995)

สามารถทำได้โดยนำ PUF ที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วใส่ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแล้วทำการฆ่าเชื้อตามปกติจากนั้นเติมเซลล์หรือสปอร์ราลงไปผ่านขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อปกติ เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์จะถูกตรึงเข้าไปใน PUF ส่วนสปอร์ของราจะงอกเป็นสาย

ใยและติดอยู่ภายในโครงร่างที่เป็นรูพรุนของ PUF วิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถเตรียมสายใยตรึงได้สะดวกรวดเร็ว ราคาไม่แพง ทนต่อแรงเฉือนได้ดี สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง ขั้นตอนในการตรึงไม่ต้องการปฏิกิริยาเคมีทำให้ไม่มีสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อเซลล์หรือสายใย และการผลิตในระดับขยายส่วนเป็นไปได้ง่ายเนื่องจากไม่ต้องการถังที่ใช้ในการเตรียมสายใยตรึงเพิ่มเติม

ตารางที่ 4 ตัวอย่างการใช้จุลินทรีย์ที่ตรึงในพอลิยูรีเทนโฟมโดยวิธีทำให้เซลล์ หรือสายใยเจริญเพื่อผลิตสารผลิตภัณฑ์ต่างๆ

จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
Methanogen sp.	มีเทน	Fynn และ Whitemore, 1982 อ้างถึงใน Fukuda, 1995
Rhizopus chinensis	ไลเปส	Nakashima และคณะ, 1988 อ้างถึงใน Fukuda, 1995
Botrycococcus braunii	ไฮโดรคาร์บอน	Baillez และคณะ, 1988
Aspergillus terreus	กรดอิทาโคนิก	Kautola และคณะ, 1989
Rhizopus arrhizus	กรดฟูมาริก	Kautola และ Linko, 1989
Penicillium chysogenum	เพนนิซิลิน	Kobayashi และคณะ, 1990 อ้างถึงใน Fukuda, 1995
Yarrowia lipolytica	กรดซิตริก	Kautola และคณะ, 1991
Thiobacillus feroxidans	การออกซิไดซ์เฟอร์รัสซัลเฟต	Armentia และ Webb, 1992
Candida rugosa	ไลเปส	Ferrer และ Sola, 1992
Aspergillus niger	กรดกลูโคนิก	Vassilev และคณะ, 1993
Citrobactor freundii	1,3 โปรปานีไดออล	Pflugmacher และ Gottschalk, 1994

ตารางที่ 4 ตัวอย่างการใช้จุลินทรีย์ที่ตรึงในพอลิยูรีเทนโฟมโดยวิธีทำให้เซลล์ หรือสายใยเจริญเพื่อผลิตสารผลิตภัณฑ์ต่างๆ (ต่อ)

จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces coelicolor	แอกทีโนโรดิน	Ozergin - Ulgen และ Mavituna,1994
Aspergillus niger	กรดซิตริก	Sanroman และคณะ, 1994
Trichoderma reesei	เอนโด 1,4 บีตากลูคาเนส และเอนไซม์ไซลาเนส	Haapala และคณะ, 1995
Aspergillus niger KRS	เอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์ไซแลนเนส	Kang และคณะ, 1995
Rhizopus oryzae	กรดแลกติก	Dong และคณะ, 1996
Rhizopus oryzae	กรดแลกติก	Sun และคณะ, 1996
Methanogenic bacterium	มีเทน (Methane)	Varesche และคณะ,1997

แบบของหอทดลอง หรือถังหมักที่ใช้ในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ โดยเซลล์ หรือสายใยตรึง

ชนิดของหอทดลอง หรือถังหมักที่ใช้ในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ด้วยเอนไซม์ตรึง เซลล์ตรึง หรือสายใยตรึง มีหลายแบบ ได้แก่ หอทดลอง หรือถังหมักแบบเกิดปฏิกิริยาไม่ต่อเนื่อง (batch reactors) และหอทดลอง หรือถังหมักแบบเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่อง (continuous reactors) ซึ่งหอทดลอง หรือถังหมักแบบเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องนั้น ยังมีลักษณะของถังหมักอีกหลายแบบ เช่น ถังหมักที่มีการกวนสม่ำเสมอ (stirred) ซึ่งถังหมักชนิดนี้ พบว่าเซลล์ตรึงหรือสายใยตรึงจะถูกทำลายโดยแรงเฉือน (shear force) ทำให้เซลล์เสียสภาพ หรือหลุดออกจากวัสดุตรึง จึงมีการพัฒนาใช้เทคนิคฟลูอิดไดเซชั่น ซึ่งเทคนิคนี้ ยังแบ่งถังหมักได้อีก 2 ลักษณะ คือ ถังหมักแบบฟิกซ์เบด (fixed bed reactor) และถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด (fluidized bed reactor) ซึ่งถังหมักแบบฟิกซ์เบด นั้นพบปัญหาการอุดตัน เนื่องจากการเติบ

โตของเซลล์ตรึง ดังนั้นถังหมักที่นิยมใช้ในการผลิตสารผลิตภัณฑ์โดยวิธีการตรึงเซลล์หรือสายใยคือ ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2528; Brodelius และ Vandamme, 1987; Fukuda, 1995)

ฟลูอิดไดเซชั่น (fluidization) หมายถึง กระบวนการ หรือวิธีการที่ของแข็งซึ่งมีรูปร่างลักษณะเป็นเม็ดหรือชิ้นสัมผัสกับของไหลแล้วเม็ดของแข็งเหล่านี้ จะมีคุณสมบัติคล้ายของไหล ทั้งนี้เนื่องจากเม็ดหรือชิ้นของแข็งดังกล่าว แรกทีเดียวถูกวางไว้บนตะแกรงหอทดลองที่มักมีรูปร่างเป็นทรงกระบอก ปัจจุบันได้พัฒนาให้อยู่ในรูปร่างแนวนอนก็มีแล้ว ของไหลที่ใช้มีทั้งก๊าซ และของเหลว จะถูกปล่อยให้ผ่านมาทางด้านล่างของตะแกรงที่รองรับเม็ดของแข็ง ของไหลก็จะไหลผ่านชิ้นเม็ดของแข็ง แล้วไหลออกทางส่วนบนของหอทดลอง มีการเพิ่มความเร็วของไหลให้มากขึ้นเรื่อยๆ จนในที่สุดจะเห็นเม็ดของแข็งขยับตัวและลอยขึ้นเป็นอิสระไม่เกาะติดกัน ของแข็งที่อยู่ในลักษณะนี้จะมีคุณสมบัติคล้ายของไหล กล่าวคือ มีการไหลหมุนเวียนของเม็ดของแข็งภายในเบด หรือภายในหอทดลอง เราจึงเรียกของแข็งในลักษณะนี้ว่า " ฟลูอิดไดเซชั่น " (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2528) ซึ่งสามารถแบ่งได้อีก 2 แบบ

1. ฟลูอิดไดเซชั่นสองสถานะ (Two - phase Fluidization)

หมายความว่า ในหอทดลองหรือเบดที่ใช้งาน จะประกอบด้วยของสองสถานะ คือ ของแข็งกับของไหล ซึ่งของไหลอาจเป็นก๊าซหรือของเหลวก็ได้ ดังนั้นฟลูอิดไดเซชั่นสองสถานะจึงแบ่งออกได้ 2 ประเภท

- ก๊าซฟลูอิดไดเซชั่น (Gas Fluidization)
- ฟลูอิดไดเซชั่นของเหลว (Liquid Fluidization)

2. ฟลูอิดไดเซชั่นสามสถานะ (Three - phase Fluidization)

หมายความว่า ในหอทดลองหรือ เบดที่ใช้งานจะประกอบด้วย ของสามสถานะอยู่พร้อมกันคือ ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ สำหรับฟลูอิดไดเซชั่นสามสถานะนั้น เป็นขบวนการที่พัฒนาไปจากฟลูอิดไดเซชั่นสองสถานะ เช่น คอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) และหอทดลองแบบแพคเบด (Packed bed) ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้คอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) ซึ่งจัดเป็นฟลูอิดไดเซชั่นประเภทนี้

ข้อดีของการใช้ฟลูอิดไดเซชั่น คือ

- มีการเคลื่อนที่ของเม็ดของแข็งตลอดเวลา ทำให้เกิดการผสมกันได้อย่าง

รวดเร็วและสม่ำเสมอ

- อุณหภูมิภายในหอทดลองเท่ากันตลอด ซึ่งต่างจากเบดนิ่งอุณหภูมิจะไม่เท่ากันตลอดทั้งเบด

- การทำงานด้วยฟลูอิดไดซ์เบดจะเสียพลังงานน้อยกว่าหอทดลองแบบอื่น (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2528)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยเซลล์และสายใยตรึง

1. แหล่งคาร์บอน

ในการผลิตกรดกลูโคนิกทั้งจากสายใยอิสระและสายใยตรึงนั้น ปริมาณผลผลิตจะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้คือน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นกรดกลูโคนิกได้โดยตรง การพัฒนาเพื่อลดต้นทุนการผลิตเป็นสิ่งจำเป็น จึงได้มีความพยายามใช้แหล่งคาร์บอนทดแทน ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้ทดแทนได้ เช่น แป้งข้าวโพดที่ย่อยแล้ว (Moresi และคณะ, 1991; Vassilev และคณะ, 1993) แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว (กุลธิรา สูสุข, 2538; นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539; Su และคณะ, 1977; Rogalski และคณะ, 1996) เนื่องจากในโครงสร้างของแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสมาต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,4 (α-1,4) และแอลฟา 1,6 (α-1,6) เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะมายเลส (α-amylase) และกลูโคอะมายเลส (glucoamylase) จะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส (Bigelis, 1992) และใช้กากน้ำตาลจากอ้อย (Cane molasses) เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนน้ำตาลกลูโคสได้อีก (Rao และ Panda, 1994) นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้วยังต้องคำนึงถึงปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมด้วย เพราะหากใช้ปริมาณมากเกินไปจะทำให้การผลิตกรดต่ำ เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่สามารถทนต่อน้ำตาลสูงได้ โดยทั่วไปนิยมใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ 150 กรัมต่อลิตรจนถึง 350 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และวิธีก ารผลิตด้วย (Ward, 1977; Lockwood, 1979; Rohr และคณะ,1983; Das และ Kundu, 1987) ในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปเกลือโซเดียมกลูโคเนต สามารถใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสได้สูง เพราะเกลือโซเดียมกลูโคเนตสามารถละลายน้ำได้สูงถึง 590 กรัมต่อลิตร (อ้างถึงใน นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539) จากรายงานของ Blom และคณะ (1952) พบว่า

สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปเกลือโซเดียมกลูโคเนตได้สูงถึง 350 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตและให้ผลผลิตสูงสุดคือ 300 กรัมต่อลิตร Blom และคณะ (1952) และบริษัท Fujisawa Phamaceutical พบว่าสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 350 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดยให้ผลผลิตสูงถึง 95 เปอร์เซนต์ (อ้างถึงใน Yamada, 1977) ในปี พ.ศ. 2536 จินตนา ไกรวัฒนพงศ์ ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดย *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตคือ 300 กรัมต่อลิตร แต่การผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนต สามารถใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นได้ต่ำกว่า เนื่องจากถ้าใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสปริมาณมาก จะเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตมารบกวนการผลิต ดังเช่นรายงานการวิจัยของ บาจรีย์ จันทรานุกร (2536) พบว่าถ้าใช้แป้งไฮโดรไลเสตที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 250 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตในถังหมักขนาด 5 ลิตร จะเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตในถังหมักปริมาณมากจนรบกวนการผลิต และต้องหยุดการผลิต แต่เมื่อใช้แป้งไฮโดรไลเสตที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดได้ผลดี นอกจากนี้ ในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนต โดยสายใยตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต (กุลธิรา สู่สุข, 2538) และใน PUF (นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539) ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในการผลิตคือ 50 กรัมต่อลิตร

2. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน ที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการผลิตกรดกลูโคนิกนั้นโดยทั่วไป จะใช้ทั้งในรูปอนินทรีย์ไนโตรเจน และอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น เกลือแอมโมเนียมไนเตรต (Moresi และคณะ, 1991) แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Vassilev และคณะ, 1993; Dronawat และคณะ, 1995) ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) (Seiskari และคณะ, 1985; Sakurai และคณะ, 1989; Shiraishi และคณะ, 1989) นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนแล้ว ปริมาณที่ใช้ก็มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิกเช่นกัน สำหรับการผลิตโดยสาย

ใยอิสระ ควรมีแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมถ้ามีมากเกินไปจะทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตมาก การผลิตกรดจะน้อยลง (Lockwood, 1977; Ward, 1979; Milsom และ Meers, 1985) รติกร กัณฑะพงศ์ (2534) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยอิสระของ *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่ใช้ในการทดลองนี้ พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ต่อมา กุลธิรา สู่สุข (2538) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในแคลเซียมอัลจิเนตพบว่าการผลิตในระดับขวดเขย่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดชนิดนี้ ส่วนการผลิตในระดับคอลัมน์ที่มีการให้อากาศด้านล่างที่มีปริมาตรใช้งาน 400 มิลลิลิตร ไม่ต้องเติมแหล่งแอมโมเนียมใดๆในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด นิติพงษ์ จิระวรานันท์ (2539) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตโดยสายใยตรึง *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงในชิ้น PUF พบว่าการผลิตทั้งในระดับขวดเขย่าและระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ไม่ต้องเติมแหล่งแอมโมเนียมใดๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด และไม่พบสายใยอิสระในอาหารเพื่อการผลิต

3. แหล่งแร่ธาตุ

แหล่งแร่ธาตุก็เป็นองค์ประกอบอีกส่วนหนึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อ จำเป็นต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมและเพียงพอจะช่วยเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิก แร่ธาตุที่ควรมีเติมในการผลิตกรดเพื่อเพิ่มผลผลิตได้แก่ แมกนีเซียม (Mg^{++}) แมกกานีส (Mn^{++}) และ เหล็ก (Fe^{++}) (กรรณิกา จันทรสอาด, 2533; Milsom และ Meers, 1985; Rao และ Panda, 1994) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสามารถใช้น้ำประปาแทนการเติมแร่ธาตุในการผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีใช้ในการทดลองนี้ (บาจรีย์ จันทรานุกร, 2536; กุลธิรา สู่สุข, 2538; นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539; Blom และคณะ, 1952)

4. ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญมากปัจจัยหนึ่ง ในการผลิตกรดกลูโคนิกต้องการปริมาณออกซิเจนมาก เนื่องจากกรดกลูโคนิกเกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่นของน้ำตาล

กลูโคส ไม่ว่าจะเป็นการผลิตในรูปแคลเซียมหรือโซเดียมกลูโคเนต แต่เนื่องจากเกลือโซเดียมละลายได้ดีไม่มีปัญหาตะกอนรบกวนการผลิต ดังนั้นจึงนิยมใช้การผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตในการศึกษาเกี่ยวกับการให้อากาศ และการกวนในอัตราสูง เพื่อศึกษาผลของอากาศที่มีต่อการผลิตกรดกลูโคนิก (Zetelaki and Vas, 1968) ส่วนการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยสายใยอิสระของ *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักที่มีการกวน โดยจินตนา ไกรวัฒนพงศ์ (2536) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศและอัตราเร็วในการกวนเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายทำให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงขึ้น เวลาที่ใช้ในการผลิตจะลดลงด้วย Moresi และคณะ (1991) ศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ (dissolved oxygen) ต่อการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดย *Aspergillus niger* ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถใช้น้ำตาลตั้งต้นเพื่อการผลิตกรดดังกล่าวได้มากขึ้น Vassilev และคณะ (1993) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* ในพอลิยูรีเทนโฟมในระดับขวดเขย่า พบว่าความเร็วของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมคือ 220 รอบต่อนาที และการผลิตระดับขยายส่วนในคอลัมน์ที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4 เซนติเมตร ความสูงของคอลัมน์เท่ากับ 35 เซนติเมตร ปริมาตรใช้งาน 300 มิลลิลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจะมีผลเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิก โดยอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้ผลผลิตกรดสูงสุด 143.8 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 150 กรัมต่อลิตร Dronawat และคณะ (1995) ได้ทดลองศึกษาผลของการปั่นกวน และให้อากาศที่มีต่อการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยใช้ *Aspergillus niger* ATCC 9029 ในการทดลองผลิตกรดกลูโคนิกนั้นได้ใช้อัตราการปั่นกวนอยู่ในช่วง 100 - 300 รอบต่อนาที (rpm) อัตราการให้อากาศ 5 และ 10 ลิตรต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มการปั่นกวนและอัตราการให้อากาศสูงขึ้นผลผลิตกรดกลูโคนิกจะสูงตามด้วย ที่ค่าการปั่นกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อนาที ให้ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุด 22.72 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการเพิ่มอัตราการปั่นกวนและอัตราการให้อากาศ นอกจากจะเพิ่มผลผลิตกรดแล้วยังสามารถเพิ่มความเข้มข้นของ biomass ได้อีกด้วย

5. หัวเชื้อ

ขนาดและอายุของหัวเชื้อสายใย มีความสำคัญต่อการผลิตกรดกลูโคนิกด้วยสายใยตรึง ถ้าหัวเชื้อสายใยตรึงที่ใช้มีอายุเหมาะสม จะช่วยลดเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดและเพิ่มปริมาณกรดที่ได้ Chantarsa-ard และ Kinoshita (1994) ได้ศึกษาผลของอายุหัวเชื้อของสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในพอลิยูรีเทนโฟม ต่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยเปรียบเทียบหัวเชื้ออายุ 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าหัวเชื้อสายใยตรึงอายุ 48 ชั่วโมง ให้ผลผลิตกรดสูงและเร็วกว่าคือ ให้ผลผลิตกรดสูงสุด 99 กรัมต่อลิตรในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณสปอร์ตั้งต้นที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อก็มีความสำคัญต่อการผลิตกรดกลูโคนิกเช่นกัน ถ้าใช้สปอร์ปริมาณมากในการตรึงจะทำให้การงอกของสปอร์ในชิ้นวัสดุตรึงช้าและไม่ทั่วถึง เนื่องจากสารอาหารและอากาศสามารถผ่านเข้าไปในชิ้นวัสดุตรึงลึกลงไปจากระดับผิวด้านนอกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น สปอร์บริเวณผิวชิ้นวัสดุตรึงจะงอกเป็นสายใย แต่สปอร์บริเวณกลางชิ้นวัสดุตรึงจะไม่สามารถงอกได้ทำให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกลดลง (กุลธิรา สูสุข, 2538; นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539; Tsay และ To, 1987; Gosmann และ Rehm, 1988; Fukuda, 1995)

6. ชนิดและขนาดของชิ้นวัสดุตรึง

ชนิดของวัสดุตรึงที่นิยมใช้ตรึงเซลล์หรือสายใยในการผลิตกรดกลูโคนิก มีหลายชนิดด้วยกันเช่น เส้นใยไนลอน (Seiskari และคณะ, 1985) เซรามิคที่มีลักษณะคล้ายรังผึ้ง (Shiraishi และคณะ, 1989) ผ้าใยสังเคราะห์ (Sakurai และคณะ, 1989) และ PUF (Vassilev และคณะ, 1993) นอกจากนี้ในปี 2539 นิติพงษ์ จิระวรานันท์ ได้ใช้ PUF ในการตรึงสายใยรา และในงานวิจัยนี้ก็ใช้ PUF เช่นเดียวกัน ขนาดของชิ้นวัสดุตรึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยชิ้นวัสดุตรึงที่มีขนาดเล็กจะให้ผลผลิตที่ดีกว่าชิ้นวัสดุตรึงที่มีขนาดใหญ่กว่า เนื่องจากวัสดุตรึงชิ้นเล็กจะมีพื้นที่ผิวมากกว่าทำให้การส่งผ่านออกซิเจน และการผ่านเข้าออกของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์เป็นไปได้ง่าย (Klein และ

Wagner, 1983; Fukuda, 1995; Sun และคณะ, 1996) Vassilev และคณะ (1993) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* ในพอลิยูรีเทนโฟมพบว่าชิ้นวัสดุตรึงขนาด 1 เซนติเมตร (กว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 1 เซนติเมตร สูง 1 เซนติเมตร) จะให้ผลผลิตต่ำและช้ากว่าชิ้นวัสดุตรึงขนาด 0.3 เซนติเมตร (กว้าง 0.3 เซนติเมตร ยาว 0.3 เซนติเมตร สูง 0.3 เซนติเมตร) นิติพงษ์ จิระวรานันท์ (2539) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตโดยสายใยตรึง *Aspergillus niger* G153 ในชิ้นพอลิยูรีเทนโฟม พบว่า PUF ขนาดชิ้น 0.25 เซนติเมตร (กว้าง 0.25 เซนติเมตร ยาว 0.25 เซนติเมตร สูง 0.25 เซนติเมตร) ชนิดความหนาแน่นสูงโครงสร้างเปิด สามารถผลิตกรดกลูโคนิกได้ผลผลิตดีกว่าขนาดชิ้น 0.6 เซนติเมตร (กว้าง 0.6 เซนติเมตร ยาว 0.6 เซนติเมตร สูง 0.6 เซนติเมตร) และไม่พบสายใยอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกเลย

รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kunda และ Das (1982) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยเชื้อ *Aspergillus niger* ในระดับขวดเขย่ามีแป้งข้าวโพดที่ย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการเติมซานอ้อยหั่นเป็นชิ้นเล็กเพื่อให้สายใยเกาะพบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมซานอ้อย

Heinrich และ John (1982) พบว่ามีการผลิตกรดกลูโคนิกที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตกรดซิตริก โดยสายใยอิสระและสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* ATCC 9142 ที่เกาะติด (adsorped) บนแผ่นกระเบื้อง (glass carrier) ในหอทดลองแบบฟิกซ์เบด (fixed - bed reactor) และพบว่าที่ระดับความเป็นกรดด่าง 5.5 มีการผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด ซึ่งอาจเนื่องมาจากความเป็นกรดด่าง 5.5 เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และยังมีการเติมแมงกานีสลงไป ซึ่งแมงกานีสยังเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ดี นอกจากนี้ที่ความเป็นกรดด่าง 5.5 หรือสูงกว่านี้ จะส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์แลคโตเนส ที่ช่วยเปลี่ยนกลูโคโนเดลต้าแลคโตนที่สะสมอยู่ให้เป็นกรดกลูโคนิกอีกด้วย จึงเป็นผลให้พบการผลิตกรดกลูโคนิก ในระหว่างการผลิตกรดซิตริก

Seiskari และคณะ (1985) สามารถตรึงเซลล์ของ *Gluconobactor suboxydans* บนเส้นใยไนลอน (fibrous nylon carrier) และทำการผลิตกรดกลูโคนิกแบบต่อเนื่องในรูปกรดอิสระในคอลัมน์แก้วที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Jacketed glass column reactor) พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.3 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที อัตราให้อาหาร 0.067 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อชั่วโมง สามารถผลิตกรดกลูโคนิกได้ 80 กรัมต่อลิตร ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 6 เดือน

Sakurai และคณะ (1989) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* บนผ้าที่ทอด้วยเส้นใยสังเคราะห์ผสมกับเส้นใยจากธรรมชาติโดยใช้น้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 300 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดได้ 220 กรัมต่อลิตร และสามารถใช้สายใยตรึงซ้ำได้ถึง 14 ครั้ง โดยอัตราการผลิตไม่ลดลง

Shiraishi และคณะ (1989) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปกรดอิสระด้วยเซลล์ตรึงของ *Gluconobactor suboxydans* IFO 3290 บนกระเบื้องที่มีลักษณะเหมือนรังผึ้งในหอทดลองแบบฟลูอิดไดซ์เบดแบบต่อเนื่อง โดยใช้น้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดได้ต่อเนื่องเป็นเวลา 1 เดือน โดยความสามารถในการผลิตของเซลล์ตรึงไม่ลดลงปริมาณกรดที่ผลิตได้เฉลี่ย 84.6 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

Moresi และคณะ (1991) ได้รายงานว่าเมื่อผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่มีการกวนและให้อากาศด้วยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตที่มีการกวนและให้อากาศด้วย โดยใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ควบคุมความเป็นกรดด่างด้วย 6 M NaOH ให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.4 ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นอยู่ในช่วง 70 - 160 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (dissolved oxygen) ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ช่วง 50 - 75 เปอร์เซนต์ พบว่าผลผลิตกรดกลูโคนิก ขึ้นกับปริมาณออกซิเจนที่ละลาย เมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนจะทำให้สามารถใช้น้ำตาลตั้งต้นเพื่อการผลิตได้มากขึ้น

Vassilev และคณะ (1993) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* ในพอลิยูรีเทนโฟม (polyurethane foam) ในระดับขวดเขย่าพบว่า เมื่อใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายแป้งข้าวโพดเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตกรดได้สูงสุด 137.1 กรัมต่อลิตร ในเวลา 14 ชั่วโมง ซึ่งผลผลิตที่ได้สูงกว่าการผลิตโดยสายใยอิสระคือ สายใยอิสระผลิตได้ 113.4 กรัมต่อลิตร และสามารถนำสายใยตรึงมาใช้ผลิตกรดซ้ำได้ต่อเนื่อง 65 - 70 ชั่วโมง โดยความสามารถในการผลิตคงที่ ต่อมาทำการผลิตระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) ขนาด 300 มิลลิลิตร โดยให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ปริมาตรเซลล์ตรึงต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1 : 3 พบว่าให้ผลผลิตกรดสูงสุด 143 กรัมต่อลิตร ในเวลา 10 ชั่วโมง และสามารถนำสายใยตรึงมาใช้ซ้ำได้ 5 ครั้ง ต่อเนื่องกัน โดยความสามารถในการผลิตลดลงเล็กน้อย

Rao และ Panda (1994) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดกลูโคนิก โดยเซลล์ตรึงของ *Aspergillus niger* ในวัสดุตรึง พบว่าสายใยที่ถูกกักขังไว้ในแคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate entrapment) และการเชื่อมไขว้ (cross - linking) กับกลูตารัลดีไฮด์หลังจากที่อะซีโตน (acetone); ทูลูอีน (toluene) และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ผ่านเข้าไปในเซลล์ (cell permeabilization) โดยใช้กากน้ำตาลอ้อย (cane molasses) ที่มีการเติม (treated) โปตัสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ (potassium ferrocyanide) เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองพบว่า การตรึงเซลล์โดยใช้การกักขังเซลล์ในแคลเซียมอัลจิเนต (entrapment) เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากได้ผลผลิตกรดสูงสุด

Nakao และคณะ (1997) ได้ศึกษาการผลิตกรดกลูโคนิก โดยการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในแคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate gel beads) ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลการทดลองพบว่าสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิกได้ 95 เปอร์เซนต์ (เปอร์เซนต์ glucose conversion) นอกจากนี้ยังพบอีกว่า การกักขังเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสไว้ใน

แคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate gel beads entrapping) สามารถจะลดการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสอีกด้วย

กุลธิรา สู่สุข (2538) ได้ผลิตกรดกลูโคนิก โดยใช้สายใยตรึงของ *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 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นในแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้ว 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ภาวะเหมาะสมคืออัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ความหนาแน่นเม็ดเจลสายใยตรึง 300 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรด 54 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 18 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดโดยใช้สายใยตรึงซ้ำได้ 10 ซ้ำ โดยผลผลิตกรดไม่ลดลง นอกจากนี้ สามารถเก็บเม็ดเจลสปอร์ตรึงและสายใยตรึงไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 และ 5 วัน ตามลำดับ โดยความสามารถในการผลิตกรดกลูโคนิกยังคงเดิม อีกทั้งสามารถใช้น้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสบริสุทธิ์และใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุได้โดยไม่ต้องเติมแร่ธาตุใดๆ

นิติพงษ์ จิระวรานันท์ (2539) ได้ผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนต โดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในพอลิยูรีเทนโฟม พบว่าชนิดของ PUF ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงสายใยของ *Aspergillus niger* G153 เป็นชนิดโครงสร้างเปิดความหนาแน่นสูงขนาดชิ้น 0.25 เซนติเมตร ส่วนภาวะที่เหมาะสมในการตรึงสายใยของ *Aspergillus*

niger G153 คือ ใช้สปอร์ความหนาแน่น 1.0 - 2.5 x 10^8 สปอร์ต่อ PUF 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 ใช้ PUF ที่มีสายใยตรึงหนัก 200 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต ได้ปริมาณกรดสูงสุด 53.8 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ของการผลิต สามารถผลิตกรดโดยสายใยตรึงซ้ำได้ 12 ซ้ำ โดยผลผลิตกรดลดลงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังสามารถเก็บชิ้น PUF ที่มีสายใยตรึงเจริญอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยความสามารถผลิตกรดกลูโคนิกยังคงเดิม อีกทั้งสามารถใช้น้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสบริสุทธิ์ และใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุได้โดยไม่ต้องเติมแร่ธาตุใดๆ

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่ากรดกลูโคนิกมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร พบว่ากรดกลูโคนิกมีผลเพิ่มจำนวนเชื้อบิฟิโดแบคทีเรียม ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้มนุษย์ (กรดกลูโคนิกช่วยเพิ่มจำนวนเชื้อบิฟิโดแบคทีเรียม, 2536) สำหรับประเทศไทยยังไม่มีการผลิตกรดชนิดนี้ใช้เองจึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศทั้งหมด แม้ว่าปริมาณนำเข้าในรูปกรดอนุพันธ์และเอสเทอร์ของกรดจะมีปริมาณไม่สูงมากนัก แต่ก็มีความต้องการใช้กรดกลูโคนิกเพิ่มขึ้นทุกปี และยังนำเข้ากรดในรูปผลิตภัณฑ์อื่นที่ผสมแล้ว แต่ไม่ทราบมูลค่าที่แน่นอนรวมถึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสซึ่งสามารถนำมาใช้งานได้หลายประเภท งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิกในประเทศไทยเริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 โดย รศ. กรรณิกา จันทรสอาด ได้คัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกได้สูงจากดินหลายแหล่งในประเทศไทยซึ่งสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดคือ *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยนี้และได้ทำการทดลองมาอย่างต่อเนื่อง โดยทดลองหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่า (รติกร กัณฑะพงศ์, 2534) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตในถังหมักขนาด 5 ลิตร (บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียม

กลูโคเนตในถังหมักขนาด 5 ลิตร และทดลองใช้สายใยอิสระซ้ำในการผลิต (จินตนา ไกรวัฒนพงศ์, 2536) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนต ด้วยการตรึงสายใยในแคลเซียมอัลจิเนต (กุลธิรา สูสุข, 2538) แต่เนื่องจาก อัลจิเนตเป็นสารที่ได้จากการสกัดสาหร่ายทำให้มีราคาสูง ดังนั้นจึงได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตที่ตรึงใน PUF ซึ่งมีราคาถูกกว่าในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง และใช้สายใยซ้ำในการผลิต (นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539) ซึ่งผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจ แต่เนื่องด้วยการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตมีข้อจำกัดเกี่ยวกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น ซึ่งสามารถใช้ได้ที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสต่ำ เหมือนกับรายงานการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตโดย บาจรีย์ จันทราภานุกร (2536) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตในถังหมักที่ใช้ใบกวน คือ 200 กรัมต่อลิตร ส่วนรายงานวิจัยการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในแคลเซียมอัลจิเนต และ PUF ตามลำดับ สามารถใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสได้ 50 กรัมต่อลิตร (กุลธิรา สูสุข, 2538; นิติพงษ์ จิระวรานันท์, 2539) เนื่องจากถ้าใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นสูงจะเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตในถังหมักปริมาณมากจนรบกวนการผลิต ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาว่าการเติมโบรอนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถใช้ความเข้มข้นของกลูโคสได้สูงขึ้นแต่ก็ยังมีปัญหาในเรื่องการเก็บเกี่ยวและความทนทานต่อปริมาณโบรอนของจุลินทรีย์ (Moyer และคณะ, 1940; Casida, 1968; Miall, 1970; Atlas, 1995) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดยการตรึงสายใยในชิ้นและแผ่นพอลิยูรีเทนโฟมซึ่งเป็นวัสดุที่หาง่าย มีราคาถูก และขั้นตอนที่ใช้ในการตรึงสายใยไม่ยุ่งยากโดยทดลองหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการตรึงสายใย และการผลิตในขวดเขย่ารวมทั้งการผลิตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

หาภาวะเหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในชิ้นและแผ่นพอลิยูรีเทนโฟม (polyurethane foam, PUF) เมื่อผลิตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

ขอบเขตการวิจัย

1. ผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยสายใยตรึงในชิ้นพอลิยูรีเทนโฟมรูปลูกบาศก์ภายใต้ภาวะต่างๆ ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างโดยใช้ภาวะในการเตรียมหัวเชื้อที่ได้ศึกษามาแล้ว

2. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการเตรียมหัวเชื้อสายใยตรึงในแผ่นพอลิยูรีเทนโฟม

3. ผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยสายใยตรึงในแผ่นพอลิยูรีเทนโฟมในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างภายใต้ภาวะต่างๆ

4. วิเคราะห์และเปรียบเทียบผลผลิตกรดกลูโคนิกที่ได้จากการทดลองในข้อ 1 และข้อ 3 คือที่ได้จากชิ้นและแผ่นพอลิยูรีเทนโฟม