บทที่ 1

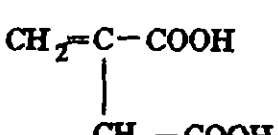
บทนำ

ประวัติความเป็นมา

กรดอิตาโคนิก (Itaconic acid หรือ methylene succinic acid) พบเป็นครั้งแรกโดย Baup (Baup, 1836) จากการกลั่นกรดซิตริก ต่อมาในปี 1931 Kinoshita ได้แยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอิตาโคนิกจากผลพลัมแห้ง เป็นเชื้อราสีเขียวในกลุ่ม *Aspergillus* และได้ตั้งชื่อว่า *Aspergillus itaconicus* (*A. itaconicus*) (Kinoshita, 1931) และต่อมาในปี 1939 Calam และคณะสามารถแยกจุลินทรีย์ชนิดใหม่จากตัวอย่างดิน มีความสามารถผลิตกรดอิตาโคนิกได้เช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นเชื้อราสีน้ำตาลและตั้งชื่อว่า *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) และพบว่ามีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าสามารถผลิตกรดอิตาโคนิกได้มากกว่า และมีความคงที่กว่า *A. itaconicus* ปัจจุบันนิยมใช้ *A. terreus* ผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับอุตสาหกรรม (Calam, 1939; Mattey, 1992)

สมบัติของกรดอิตาโคนิก

กรดอิตาโคนิกมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_5H_6O_4$ มวลโมเลกุล 130.10 (C = 46.16% H = 4.65% O = 49.19%) และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของกรดอิตาโคนิก

ลักษณะของกรดชนิดนี้ เป็นผลึกสีขาว เป็นสารไม่มีพิษ จุดหลอมเหลว 162-164 องศาเซลเซียส เสียสภาพที่อุณหภูมิสูงกว่า 162 องศาเซลเซียส ละลายได้เล็กน้อยใน เบนซีน คลอโรฟอร์ม อีเธอร์ คาร์บอนไดซัลไฟด์ และปิโตรเลียมอีเธอร์ กรดอิตาโคนิก 1 กรัมละลายได้ในอัลกอฮอล์ 5 มิลลิลิตร ละลายได้ในน้ำ โดยละลายได้ประมาณ 7 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์-เมตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และละลายได้ 60 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ด้วยสมบัตินี้จึงช่วยทำให้ง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึก (Milsom and Meers, 1985; Merck, 1989)

<u>ประโยชน์ของกรดอิตาโคนิก และอนุพันธ์ของกรด</u>

กรดอิตาโคนิกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งในทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรมต่าง ๆ

1. <u>การแพทย์</u>

ใช้เป็นยาบรรเทาความเจ็บปวด และต้านการอักเสบ โดยใช้ในรูปของไดเมทธิลอิตาโคเนต และไดเอทธิลอิตาโคเนต (Ragavant et al., 1994)

2. <u>การเกษตร</u>

อนุพันธ์เฮกซิลของกรดอิตาโคนิก (Hexylitaconic acid) ใช้เป็นสารเร่งการเจริญของราก และส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน เช่น ผักกาดหอม กะหล่ำปลี และ ข้าว โดยอนุพันธ์เฮกซิลของกรดอิตาโคนิก 25 ส่วนในล้านส่วน สามารถเร่งการเจริญของต้นข้าวทั้งส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน เพิ่มขึ้น 60 และ 75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Suzuki et al.,

1986)

3. อุตสาหกรรมสิ่งทอ

ในอุตสาหกรรมสิ่งทอนิยมใช้โคโพลิเมอร์ของกรดอิตาโคนิกกับอะคริโลไนไตรล์ในขั้นตอนการย้อมสีเนื่องจากจะทำให้สิ่งทอมีสมบัติติดสีย้อมได้ดีขึ้น (Milsom and Meers, 1985)

กรดอิตาโคนิกใช้เป็นสารเพิ่มคุณสมบัติทนความร้อนให้แก่ขนแกะ โดยการแช่ขนแกะในสารละลายของกรดอิตาโคนิกในไดเมทธิลฟอร์มาไมด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะทำให้เส้นใยขนแกะสามารถทนความร้อนเพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส ช่วยป้องกันปัญหาการโค้งงอของขนแกะเมื่อผ่านกระบวนการทำแห้ง (Tsukada et al., 1992)

4. อุตสาหกรรมผลิตโพลิเมอร์

กรดอิตาโคนิกใช้เป็นสารเพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่พลาสติก โดยใช้ในรูปของเอสเทอร์ของกรดอิตาโคนิกกับอัลกอออล์สายยาว (Milsom and Meers, 1985)

5. อุตสาหกรรมผลิตสี

กรดอิตาโคนิกใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตสีอะคริลิก ทำให้มีความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวดีขึ้น (Milsom and Meers, 1985)

6. อุตสาหกรรมผลิตกาว

กรดอิตาโคนิกใช้เป็นส่วนผสมในกาวที่ทำจากสไตรีนบิวตาไดอีน โดยจะทำให้มีสมบัติการเกาะติดดีขึ้น นิยมนำมาทาด้านหลังของพรม (Milsom and Meers, 1985)

7. อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษพิมพ์คุณภาพดี

กรดอิตาโคนิกใช้เติมลงในส่วนผสมที่มีสไตรีนบิวตาไดอีน สามารถนำมาเคลือบผิวกระดาษเพื่อให้หมึกพิมพ์ติดได้ดี (Milsom and Meers, 1985)

8. อุตสาหกรรมอื่น ๆ

กรดอิตาโคนิกเมื่อทำปฏิกิริยากับเอมีนจะได้ไพโรลิโดนซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิต ผงซักฟอก ยาสระผม ยาปราบศัตรูพืช และสามารถเพิ่มความข้นของสารหล่อลื่นได้ (Christiansen, 1980; Gordon and Coupland, 1980)

9. ประโยชน์อื่น ๆ

กรดอิตาโคนิกใช้เป็นสารป้องกัน และขจัดตะกอนแคลเซียม ตะกอนแมกนีเซียม และคราบสนิมเหล็กที่เกิดขึ้นในกระบวนการถ่ายเทความร้อน เช่น กระบวนการให้ความร้อน การหล่อเย็นและการกลั่น โดยใช้โคโพลิเมอร์ของกรดอิตาโคนิกและกรดอะคริลิก 0.1-100 ส่วนในล้านส่วน ทำให้การถ่ายเทความร้อนของระบบถ่ายเทความร้อนโดยใช้น้ำมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Walter, 1983)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอิตาโคนิก

กรดอิตาโคนิก ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งรา และยีสต์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอิตาโคนิก

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<u>รา</u>	
Aspergillus itaconicus	Kinoshita, 1931
Aspergillus terreus	Calam et al., 1939
Penicillium cherlesii	Milsom and Meers, 1985
Helicobasidium mompa	Milsom and Meers, 1985
<u>ยีสต์</u>	
Rhodotorula sp.	อ้างถึงใน Milsom and Meers, 1985
Candida sp.	Tabuchi et al., 1981
Ustilago cynodontis	Guevarra and Tabuchi, 1990

แต่จุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับอุตสาหกรรมคือ *Aspergillus terreus* เนื่องจากผลิตกรดอิตาโคนิกได้ปริมาณมาก และมีกรดอินทรีย์อื่นปนเปื้อนน้อย (Lockwood and Reeves, 1945; Lockwood and Nelson, 1946; Nelson et al., 1952; Pfeifer et al., 1952)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื่องจากกรดอิตาโคนิกมีประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย ดังที่กล่าวมาแล้ว จึงทำให้มีผู้วิจัยเกี่ยวกับกรดอิตาโคนิก ทั้งในแง่กระบวนการผลิต และการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ซึ่งมีคุณค่าถึงขั้นจดสิทธิบัตรมากมาย ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดอิตาโคนิก

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Kobayashi and Tabuchi, 1957a	Jpn.Pat. 571,100	Itaconic acid
Kobayashi and Tabuchi, 1957b	Jpn.Pat. 579,394	Treatment of waste molasses for itaconic acid fermentation
Kobayashi, 1960	Jpn.Pat. 60,147	Itaconic acid manufacture by fermentation
Batti, 1961	Aus.Pat. 253,501	Process for production of itaconic acid
Kinoshita and Tanaka, 1961	Br.Pat. 878,152	Process for the production of itaconic acid by fermentation

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Nubel and Ratajak, 1962	U.S.Pat. 3,044,941	Process for producing itaconic acid
Batti and Schweiger,1963	U.S.Pat. 3,078,217	Process for the production of itaconic acid
Batti, 1964	U.S.Pat. 3,162,582	Process for the produotion of itaoonic acid
Adams et al., 1970	U.S.Pat. 3,544,455	Itaconic acid purification by reverse osmosis
Kobayashi and Nakamura, 1971	U.S.Pat. 3,621,053	Process for recovering itaconic acid and salts thereof from fermented broth
Shizuoka prefecture bandai kagaku kogyo kk, 1981	Jpn.Pat.81,137,893	Production of itaconic acid by fermentation

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Welter, 1983	Eur.Pat. 0,079,165	(METH) acrylic acid/itaconic acid copolymer their preparation and use as antiscalants
Suzuki et al., 1986	U.S.Pat. 4,626,277	Plant growth regulator
Hughes and Swift, 1992	Eur.Pat. 0,506,246	Preparation of itaconic acid polymers

<u>กระบวนการทางชีวเคมีของการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิก</u>

กลไกการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิกโดยวิธีการทางชีวภาพ (biosynthesis) มีแบบแผนที่เป็นไปได้อยู่ 3 แบบแผน คือ

1. การสังเคราะห์จากกรดซิส-อะโคนิติก (cis-aconitic acid) ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ (intermediate) ในวัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle หรือ TCA cycle) (Kinoshita, 1931)

2. การสังเคราะห์จากกรดซิตร้ามาลิก (citramalic acid) (Jakubowska and Metodiewa, 1974)

3. การสังเคราะห์จาก 1,2,3-ไตรคาร์บอกซิโพรเพน (1,2,3-tricarboxy-propane) (Shimi and Nour El Dein, 1962)

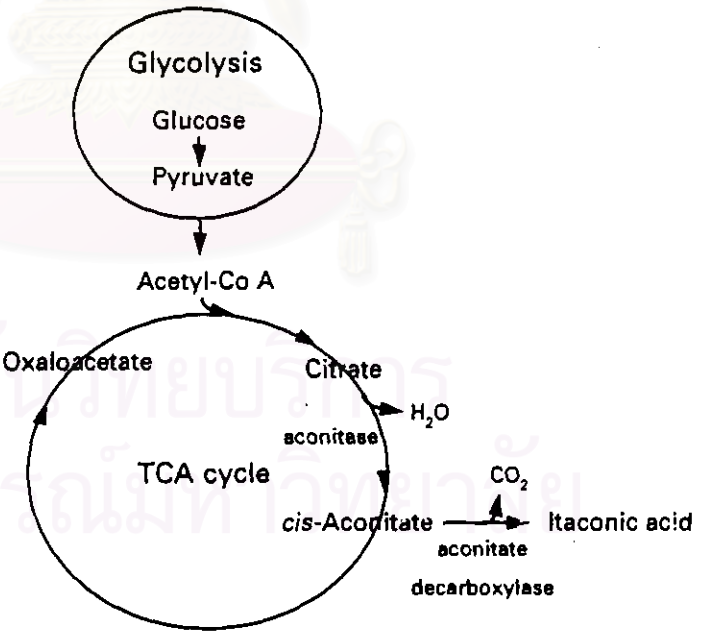
Kinoshita (1931) ได้ศึกษาการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิกใน *A. terreus* พบว่า เกิดการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากกรดซิส-อะโคนิติกซึ่งได้จากกรดซิตริก ได้เป็นกรดอิตาโคนิกจากนั้นกรดอิตาโคนิกจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดอิตาทาร์ทาริก (2-ไฮดรอกซี-2-ไฮดรอกซิเมทธิลบิวเทนไดโออิก แอซิด) และกรดซิตร้ามาลิก (2-ไฮดรอกซี-2-เมทธิล-บิวเทนไดโออิก แอซิด) ได้มีรายงานว่าการเปลี่ยนจากกรดอิตาโคนิกไปเป็นกรดอิตาทาร์ทาริกเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์อิตาโคนิกออกซิเดส (Arpai, 1959) แต่ Jakubowska และ Metodiewa (1974) รายงานว่าไม่พบเอนไซม์นี้ และเสนอว่ากรดอิตาทาร์ทาริกเป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิกจากกรดซิตร้ามาลิก โดย Nowakowska-Waszczuk (1978) และ Smith และคณะ (1974) กล่าวว่ากรดซิตร้ามาลิกอาจได้จากการรวมกันของกรดไพรูวิกและอะเซตติลโคเอ และพบว่าการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิกไม่มีเอนไซม์ในวัฏจักรเครปส์มาเกี่ยวข้อง มีผู้สนับสนุนข้อสรุปดังกล่าวโดยได้รายงานว่า กรดอิตาโคนิกเกิดจากการเปลี่ยนกรดไพรูวิกไปเป็นอะเซตติลฟอสเฟต จากนั้นมีการรวมอะเซตติลฟอสเฟต 3 โมเลกุลได้ 1,2,3-ไตรคาร์บอกซีโพรเพน แล้วเปลี่ยนเป็นกรดอะโคนิติก จากนั้นมีการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจึงได้เป็นกรดอิตาโคนิกตามลำดับ (Shimi and Nour El Dein, 1962)

กลไกการสังเคราะห์ที่เสนอโดย Kinoshita และ โดย Shimi และ Nour El Dein ดังกล่าวข้างต้นเหมือนกันตรงที่มีการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากกรดซิส-อะโคนิติก แต่มีข้อแตกต่างที่แหล่งของกรดซิส-อะโคนิติก คือรายงานของ Kinoshita เป็นซิตริก ส่วนรายงานของ Shimi และ Nour El Dein เป็น 1,2,3-ไตรคาร์บอกซีโพรเพน (Kinoshita, 1931; Shimi and Nour El Dein, 1962)

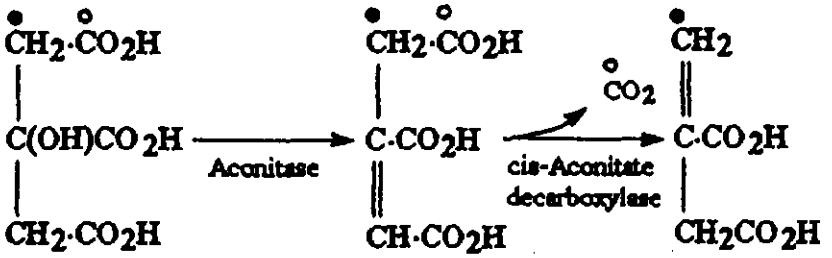
Bentley และ Thiessen (1957 b) และ Winskill (1983) ศึกษาและรายงานออกมาอย่างต่อเนื่องซึ่งรายงานของเขาสนับสนุนรายงานของ Kinoshita (1931) ที่ว่ากรดอิตาโคนิกเกิดผ่านกระบวนการดีไฮเดรชั่นของกรดซิตริกได้กรดอะโคนิติก และผ่านกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชั่นของกรดอะโคนิติก พบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิก คือเอนไซม์อะโคนิเตส และเอนไซม์ซิส-อะโคนิเตตดีคาร์บอกซิเลส ในสารสกัดจากเซลล์ของ *A.terreus* ซึ่งเอนไซม์อะโคนิเตสเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดซิตริกเป็นกรดซิส-อะโคนิติก และเอนไซม์ซิส-อะโคนิเตตดีคาร์บอกซิเลส เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดซิส-

อะโคนิติกเป็นกรดอิตาโคนิกตามลำดับ

จากกลไกการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิกที่เสนอโดย Kinoshita (1931) และ Bentley และ Thiessen (1957 b) และ Winskill (1983) สามารถอธิบายวิถีการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิกได้ว่า วิถีการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิกเริ่มจากกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ของน้ำตาลกลูโคส ได้กรดไพรูวิก (pyruvic acid) แล้วถูกเปลี่ยนไปเป็นอะเซตติลโคเอ (acetyl CoA) แล้วเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ ดังแสดงในรูปที่ 2 ส่วนกรดซิตริกซึ่งเป็นสารมัธยันต์ในวัฏจักรเครปส์ จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดซิส-อะโคนิติกด้วยเอนไซม์อะโคนิเตส แล้วกรดซิส-อะโคนิติกถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดอิตาโคนิกโดยเอนไซม์อะโคนิเตต ดีคาร์บอกซิเลส ส่วนรายละเอียดที่แสดงถึงสูตรโครงสร้างของกรดซิตริก กรดซิส-อะโคนิติก และกรดอิตาโคนิก ในวิถีการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิก แสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 2 วิถีการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิกจากน้ำตาลกลูโคส (ดัดแปลงมาจาก Voet และ Voet (1990) และ Winskill (1983))



Citric acid Aconitic acid Itaconic acid

รูปที่ 3 วิถีการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิกจากกรดซิตริก (Winskill, 1983)

การสะสมกรดอิตาโคนิกจะเกิดขึ้นเมื่อมีการหยุดชะงักในขั้นตอนที่กรดอิตาโคนิกจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอิตาตาร์ตาริกโดยเอนไซม์อิตาโคนิกออกซิเดส ซึ่งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้อาจเกิดจากสภาพความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำของการหมัก หรือเกิดจากตัวยับยั้งที่เฉพาะเจาะจง เช่น คอปเปอร์ไอออน (Lockwood and Schweiger, 1977) หรือแคลเซียมไอออน (Crueger and Crueger, 1990)

<u>การผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับอุตสาหกรรม</u>

วิธีการผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับอุตสาหกรรมมี 2 วิธีคือ การหมักบนผิวหน้าอาหาร (surface process) และ การหมักในอาหารเหลว (submerged process) โดยมีปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการเลือกวิธีการที่ใช้ในการผลิตคือ ต้นทุนในการผลิต เครื่องมือและอุปกรณ์ แหล่งพลังงาน บุคลากร ค่าแรงงาน ตลอดจนเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิต และการควบคุมการผลิต (Mattey, 1992) กระบวนการที่นิยมใช้ในการผลิตในอุตสาหกรรม คือวิธีการหมักในอาหารเหลว

1. <u>การหมักบนผิวหน้าอาหาร (surface process)</u> (Mattey, 1992)

การผลิตกรดอิตาโคนิกโดยการหมักบนผิวหน้าอาหาร นิยมทำบนผิวหน้าอาหารเหลว เป็นวิธีการดั้งเดิมที่ใช้มานาน และยังนิยมใช้ในการผลิตจนถึงปัจจุบัน ซึ่งมีข้อดีคือ ต้นทุนในการใช้พลังงานต่ำ แม้ว่าค่าแรงงานสูงกว่ากระบวนการหมักในอาหารเหลวก็ตาม วัตถุดิบที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้กากน้ำตาลอ้อย และกากน้ำตาลจากหัวบีท ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 5-7 เติมแหล่งอาหารอื่น ๆ ที่จำเป็น ทำการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อน เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เย็นแล้วลงในถาด หรือภาชนะก้นตื้นที่ทำจากวัสดุที่ทนการกัดกร่อนของกรดได้ ที่นิยมใช้คือภาชนะที่ทำด้วยเหล็กกล้าปลอดสนิม (stainless steel) คุณภาพสูง ทำการถ่ายสปอร์ของ *A. terreus* โดยการพ่นกระจายสปอร์ลงบนผิวหน้าของอาหารเหลว ต้องมีการให้อากาศเพื่อให้ออกซิเจนแก่จุลินทรีย์ และลดความร้อนโดยมีการให้อากาศเป็น 2 ช่วง ช่วงแรกให้อากาศปลอดเชื้อด้วยอัตราต่ำเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในระยะการงอกของสายใยและการเจริญในช่วงแรก ช่วงหลังให้อากาศด้วยอัตราสูงขึ้นเป็น 10 ลูกบาศก์เมตรต่อลูกบาศก์เมตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที โดยให้เป็นอากาศที่ควบคุมความชื้น ในปริมาณพอเหมาะ เพื่อป้องกันการระเหยของอาหารเลี้ยงเชื้อ สายใยของ *A. terreus* จะขึ้นปกคลุมผิวหน้าอาหารจนทั่ว บ่มเชื้อโดยไม่มีการกวนเป็นเวลา 8-15 วัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *A. terreus* ที่ใช้ และความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจึงนำน้ำหมักออกมากรองแยก และชะล้างสายใย จากนั้นนำน้ำหมักไปทำการแยกกรดอิตาโคนิกและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2. การหมักในอาหารเหลว (submerged process) (Mattey, 1992)

กระบวนการหมักแบบนี้นิยมใช้ผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับอุตสาหกรรม เพราะเป็นกระบวนการที่ใช้แรงงานในการผลิตน้อย แต่ให้อัตราการผลิตสูงกว่า และใช้พื้นที่น้อยกว่ากระบวนการหมักบนผิวหน้าอาหารเหลว กระบวนการหมักในอาหารเหลวมีการออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ (reactor) หลายรูปแบบ แต่ที่ใช้กันทั่ว ๆ ไปคือ ถังหมักที่มีการให้อากาศและการกวน (stirred, aerated tank reactor) และเครื่องปฏิกรณ์แบบแอร์ลิฟท์ (air-lift reactor) ด้วยวิธีการนี้จะมีการแยกเตรียมหัวเชื้อในเครื่องปฏิกรณ์ที่มีขนาดเล็กกว่าที่มีการควบคุมภาวะให้เหมาะกับการเจริญมากกว่าการผลิต และมักใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงในถังหมักซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเหมาะสมที่ได้ผ่านฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นต้นให้อยู่ในช่วง 5-7 วัสดุที่ใช้ต้องทนการกัดกร่อนของกรดได้สูง โดยใช้ปริมาณของหัวเชื้อได้ตั้งแต่ 1-20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเพื่อการผลิต ให้อากาศโดยผ่านเข้าทางด้านล่างด้วยอัตรา 0.1 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงแรก และเพิ่มถึง 0.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงหลัง ควบคุมฟองที่เกิดขึ้นด้วยสารกำจัดฟอง เช่นน้ำมันถั่วเหลือง ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส ด้วยวิธีการนี้ต้องใช้เวลานานจึงจะได้ผลผลิตกรดอิตาโคนิกสูงสุด ซึ่งเมื่อถึงเวลานั้นอัตราการผลิตจะลดลง ดังนั้นการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจึงมักใช้เวลาเพียง 72 ชั่วโมง เพื่อให้คุ้มทุน (Mattey, 1992)

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแล้ว จึงทำการแยกกรดอิตาโคนิกที่อยู่ในน้ำหมักซึ่งอาจอยู่ในรูปสารละลายหรือตกตะกอนเป็นผลึกสีขาว โดยนำน้ำหมักที่ผ่านการกรองแยกสายใยแล้ว ดำเนินการตามวิธีใดวิธีหนึ่ง ดังต่อไปนี้

1. การสกัดแยกกรดอิตาโคนิกด้วยตัวทำละลาย เช่น เอทธิลอีเธอร์ เอทธิลอะซิเตต หรือเอมิลอะซิเตต (Pfeifer et al., 1952)

2. การปั่นเหวี่ยงแยกผลึกกรดอิตาโคนิกแล้วนำไปทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ (Prescott and Dunn, 1959)

3. การใช้วิธีรีเวอร์สออสโมซิส (reverse osmosis) (Milsom and Meers, 1985)

4. การทำโครมาโตกราฟีด้วยวิธีแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography) โดยใช้แอมเบอร์ไลท์ IR-45 เรซิน (Nakagawa and Kobayashi, 1968)

5. การตกผลึกโดยทำให้น้ำหมักเข้มข้นขึ้น และตกผลึกภายใต้สุญญากาศ หรืออาจใช้สารช่วยตกตะกอน เช่น ตะกั่วคาร์บอเนต (lead carbonate) นำผลึกมาละลายในน้ำร้อน แล้วฟอกสีด้วยคาร์บอน แล้วจึงตกผลึกอีกครั้ง และแยกผลึกด้วยการปั่นเหวี่ยง หลังจากนั้นทำให้แห้ง ก็จะได้ผลึกกรดอิตาโคนิกที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวก จึงนิยมนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Pfeifer et al., 1952 ; Lockwood, 1954)

<u>พัฒนาการของการผลิตกรดอิตาโคนิก</u>

เนื่องจากการผลิตในถังหมักที่มีการกวนโดยใช้เซลล์อิสระ ปริมาณออกซิเจนจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป เนื่องจากความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ต้องมีการเพิ่มอัตราการให้อากาศและการกวน อันจะเป็นการทำลายเซลล์และทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน (Park et al., 1993) จึงได้มีการพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์แบบแอร์ลิฟท์ ซึ่งสามารถให้ปริมาณออกซิเจนเพียงพอโดยไม่ต้องมีการกวน เหมาะสำหรับการผลิตกรดอิตาโคนิกแบบกะ (batch process) (Okabe et al., 1993) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการผลิต โดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous process) และการใช้สายใยตรึงในการผลิตบนวัสดุตรึงชนิดต่าง ๆ (Kokufuta et al., 1988; Kautola et al., 1989; Vasilev, 1989; Kautola et al., 1990)

ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก

1. ชนิดของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถหมักกรดอิตาโคนิกได้มีทั้ง รา และ ยีสต์ ดังที่กล่าวมาแล้ว แต่จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรม จะต้องมีความสามารถในการผลิตกรดอิตาโคนิกได้ในปริมาณสูง กรดอื่นปนเปื้อนน้อย ให้ผลผลิตสม่ำเสมอ และไม่กลายพันธุ์ง่าย ดังเช่น *A. terreus* ซึ่งเป็นราที่นิยมใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม (Milsom and Meers, 1985)

2. แหล่งคาร์บอน

เป็นปัจจัยสำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งในการผลิตกรดอิตาโคนิก ซึ่งต้องคำนึงถึงทั้งชนิดและปริมาณเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด ใช้เวลาในการผลิตน้อยที่สุด แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดอิตาโคนิกได้มีหลายชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลแมนโนส และ น้ำตาลไซโลส (Kimhjellen and Larsen, 1955) โดยทั่วไปนิยมใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากให้ผลผลิตกรดอิตาโคนิกสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่น (Kimhjellen and Larsen, 1955; Kinaghy and Megalla, 1975)

ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จำเป็นจะต้องเลือกใช้วัตถุดิบที่หาง่าย และราคาถูก ทั้งนี้เพื่อลดต้นทุนการผลิต ได้มีความพยายามใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นทดแทนน้ำตาลซูโครส ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้ทดแทนมีหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดอิตาโคนิก แทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์

วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งน้ำตาลซูโครส	เอกสารอ้างอิง
น้ำอ้อย (sugar cane juice)	Vincenty et al., 1950
น้ำตาลทรายแดง (unrefined-cane sugar)	Van der Westhuizen et al., 1951
กากน้ำตาลอ้อย(cane molasses)	Van der Westhuizen et al., 1951 Nubel and Ratajak, 1962 Nakamura et al., 1975
กากน้ำตาลจากหัวบีท (beet molasses)	Van der Westhuizen et al., 1951 Nubel and Ratajak, 1962 Karklin and Agafonova, 1969 Nowakowska-Waszczuk and Zakowska, 1971

นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้ว ยังต้องคำนึงถึงปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมด้วย ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ผลิตกรดอิตาโคนิก *A. terreus* อยู่ระหว่าง 5-7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Prescott and Dunn, 1959)

3. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดอิตาโคนิกมีทั้งแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ แต่ที่นิยมใช้ คือ แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต โดยที่แอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลผลิตสูงกว่า (Pfeifer et al., 1952) ส่วนแหล่งไนโตรเจนจำพวกอัลคาไลน์ไนเตรต ได้แก่ โปตัสเซียม และโซเดียมไนเตรต ให้การเจริญมากเกินไปแต่ให้ผลผลิตกรดอิตาโคนิกน้อยมาก (Moyer and Coghill, 1945; Tandon and Mehrotra, 1970) สำหรับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ Elnaghy และ Megalla (1975) ได้ศึกษาถึงการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ พบว่าสามารถใช้แอมโมเนียมไนเตรต ร่วมกับคอร์นสตีพลิเคอร์ สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อ และเปปโตนได้

นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนแล้ว ปริมาณที่ใช้ก็มีผลต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกเช่นกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ควรมีแหล่งไนโตรเจนมากนัก เพราะจะทำให้เชื้อมีการเติบโตมาก การผลิตกรดจะน้อยลง (Milsom and Meers, 1985)

4. อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจน

อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะต้องมีสัดส่วนที่เหมาะสม หากไนโตรเจนน้อยเกินไปไม่ได้สัดส่วนกับคาร์บอนที่มีอยู่ จะทำให้ไม่เพียงพอต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ ส่งผลให้ได้ผลผลิตกรดอิตาโคนิกต่ำ และหากไนโตรเจนมากเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์มีแนวโน้มในการเติบโตมากกว่าการผลิตกรดอิตาโคนิก ผลผลิตจะลดลง

5. แร่ธาตุ

แร่ธาตุ เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก เพราะจุลินทรีย์ต้องการแร่ธาตุเพื่อการเติบโต และการผลิตกรดอิตาโคนิก แร่ธาตุที่จำเป็นต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกได้แก่ แมกนีเซียม และแคลเซียม ส่วนทองแดง สังกะสี และเหล็ก ต้องการในปริมาณที่เหมาะสม หากมากเกินไปจะยับยั้งการผลิตกรดอิตาโคนิก (Bigelis and Arora, 1991) สำหรับแมกนีเซียมจะช่วยส่งเสริมการเติบโตและการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิกและยังช่วยต้านพิษของอะลูมิเนียมในภาชนะที่ใช้ผลิตกรดอิตาโคนิก ปริมาณที่เหมาะสมของแมกนีเซียมคือ 4.5-5.0 กรัมต่อลิตร (Lockwood and Reeves, 1945) ส่วนแคลเซียมจะช่วยทำให้มีการสะสมกรดอิตาโคนิกโดยจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อิตาโคนิกออกซิเดส ที่ใช้ในการเปลี่ยนกรดอิตาโคนิกไปเป็นกรดอิตาตาร์ตาริก จึงทำให้มีการสะสมกรดอิตาโคนิกมากขึ้น (Crueger and Crueger, 1990) ความเข้มข้นของแคลเซียมที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 350-3,500 ส่วนในล้านส่วน และความเข้มข้นของทองแดงและสังกะสี ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1-50 ส่วนในล้านส่วน (Batti and Schweiger,1963) เหล็กก็มีผลต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกมาก โดยจะทำให้ผลผลิตลดลงหากมีปริมาณเกิน 20 ส่วนในล้านส่วน (Nelson et al., 1952)

6. อุณหภูมิ

การผลิตกรดอิตาโคนิก โดย *A.terreus* ด้วยวิธีการหมักต้องการอุณหภูมิในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 30 องศาเซลเซียส (Van der Westhuizen et al., 1951; Moyer and Coghill, 1945; Elnaghy and Megalla, 1975) มีการศึกษาทดลองผลิตกรดอิตาโคนิก ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า *A. terreus* จะสังเคราะห์กรดโคจิกร่วมกับกรดอิตาโคนิก (Yuill, 1948)

7. ความเป็นกรด-ด่าง

ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมในการผลิตกรดอิตาโคนิกอยู่ในช่วง 1.8-2.1 เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างช่วงนี้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดอิตาโคนิก และพบว่าหากค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าสูงเกิน 6.0 จะไม่มีการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิก (Lockwood and Nelson, 1946; Larsen and Eimhjellen, 1955; Bentley and Thiessen, 1957 a) และถ้ารักษาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตให้อยู่ในช่วง 3.0-5.0 จะช่วยลดการปนเปื้อนของกรดชนิดอื่น เช่น กรดซักซินิกและกรดอิตาตาร์ตาริก แต่การสังเคราะห์กรดอิตาโคนิกจะลดลง (Batti, 1964)

8. ขนาดของหัวเชื้อ

ขนาดของหัวเชื้อมีผลต่อปริมาณการผลิตกรดอิตาโคนิก โดยทั่วไปจะใช้ปริมาณหัวเชื้อ *A. terreus* อยู่ในช่วง 5-10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) (Casida,1968) นอกจากนี้ Nelson และคณะ (1952) ได้รายงานว่า การผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* NRRL 1960 ในถังหมักขนาด 20 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 ลิตร อัตราการให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที การใช้หัวเชื้อปริมาณน้อยเพียง 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก

9. การให้อากาศและการกวน

การให้อากาศและการกวนจำเป็นต่อการหมักกรดอิตาโคนิกเนื่องจาก เป็นการหมักแบบใช้อากาศ และนอกจากนั้นการให้อากาศและการกวนจะทำให้มีการผสมผสานระหว่างจุลินทรีย์ ออกซิเจน และสารอาหาร เพื่อจุลินทรีย์นำออกซิเจน และสารอาหารไปใช้ในการ

เจริญและการผลิตกรดอิตาโคนิก อัตราการให้อากาศและการกวนที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่องปฏิกรณ์ด้วย โดย Okabe และคณะ (1993) พบว่าเมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* IFO-6365 ในถังหมักที่มีการให้อากาศด้านล่าง (air-lift fermentor) ขนาดความยาว 480 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 80 มิลลิเมตร ความจุ 3 ลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ลิตร พบว่า อัตราการให้อากาศที่เหมาะสม คือ 2 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ส่วน Park และคณะ (1993) พบว่าเมื่อผลิตกรดอิตาโคนิก โดย *A. terreus* IFO-6365 ในถังหมักที่มีการให้อากาศ และการกวน ขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ลิตร อัตราการให้อากาศที่เหมาะสม คือ 0.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ส่วนอัตราการกวนที่เหมาะสม คือ 300 รอบต่อนาที

<u>งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอิตาโคนิก</u>

Moyer และ Coghill (1945) ได้ศึกษาผลกระทบของชนิด และปริมาณของแหล่งไนโตรเจน และปริมาณของคอร์นสตีนลิเคอร์ ต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกบนผิวหน้าอาหารเหลว ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 200 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการผลิตกรดอิตาโคนิกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยไม่มีการเขย่า แปรผันแหล่งไนโตรเจนทั้งชนิด และปริมาณต่าง ๆ กัน พบว่า แอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดอิตาโคนิก ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิก 25 กรัมจากน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป 100 กรัม การเติมแอมโมเนียมไนเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 2.5 กรัมต่อลิตร จะเริ่มการเติบโตของสายใย และการใช้น้ำตาลกลูโคส แต่ผลผลิตกรดอิตาโคนิกเมื่อเทียบกับปริมาณกลูโคสที่ใช้จะลดลง คอร์นสตีนลิเคอร์มีผลต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกโดยปริมาณที่เหมาะสมคือ 0.4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และถ้าหากเติมลงในปริมาณที่มากกว่า 0.4 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้การเติบโตของสายใยมากเกินไป และทำให้ผลผลิตกรดลดลง

Lockwood และ Ward (1945) ได้ทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* NRRL 1960 ในถาดก้นตื้นที่ทำด้วยอะลูมิเนียม กว้าง 22 นิ้ว ยาว 86 นิ้ว และสูง 2 นิ้ว ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 165 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมคอร์นสตีพ-ลิเคอร์ความเข้มข้น 4 มิลลิลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้หัวเชื้ออายุ 5 วัน ทำการผลิตที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน โดยมีอัตราการให้อากาศบนผิวอาหารเหลวเป็น 5 ลิตรต่อนาที พบว่าสามารถผลิตกรดอิตาโคนิกได้ 49.9 กรัม จากน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป 100 กรัม

Lockwood และ Nelson (1946) ได้ศึกษาผลกระทบของปริมาณหัวเชื้อ *A. terreus* NRRL 1960 ต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกในขวดเขย่า โดยใช้หัวเชื้อเป็นเพลเล็ท (pellet) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 64.4 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร เติมกรดไนตริกความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และเติมคอร์นสตีพลิเคอร์ความเข้มข้น 4 มิลลิลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 300 มิลลิลิตร ทำการแปรผันขนาดหัวเชื้อต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 1 ถึง 100 เพลเล็ท บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบโรตารี เป็นเวลา 12 วัน พบว่าการใช้หัวเชื้อปริมาณน้อย (1-2 เพลเล็ทต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 125 มิลลิลิตร) จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่อจำนวนหัวเชื้อมากกว่าการใช้หัวเชื้อปริมาณมาก

Nelson และคณะ (1952) ทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกในถังหมักที่มีการให้อากาศและการกวน ซึ่งทำด้วยเหล็กกล้าปลอดสนิมขนาด 20 ลิตร โดย *A. terreus* NRRL 1960 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 2.67 กรัมต่อลิตร และเติมคอร์นสตีนลิเคอร์ความเข้มข้น 1.5 มิลลิลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 15 ลิตร

พลสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขนาดหัวเชื้อเป็น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 1.8-2.0 อุณหภูมิอยู่ในช่วง 31-37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเป็น 0.5 ลิตรต่อนาที อัตราการกวนเป็น 100 รอบต่อนาที ทำการผลิตเป็นเวลา 4-6 วัน ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิก 46-54 กรัม ต่อน้ำกลูโคสที่ใช้ไป 100 กรัม

Pfeifer และคณะ (1952) ได้ทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับโรงงานต้นแบบในถังหมักขนาด 300 และ 600 แกลลอนที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 200 และ 400 แกลลอนตามลำดับ มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 66 กรัมต่อลิตร และมีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 2.7 กรัมต่อลิตร และเติมคอร์นสตีนลิเคอร์ความเข้มข้น 1.8 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อและในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.1 ใช้ขนาดของหัวเชื้อเป็น 10 เปอร์เซ็นต์(ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศ 0.25 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที โดยในถังหมักขนาด 300 แกลลอน ใช้อัตราการกวน 115 รอบต่อนาที พบว่าได้ปริมาณกรดอิตาโคนิก 57.9 กรัมต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป 100 กรัม ส่วนในถังหมักขนาด 600 แกลลอน ใช้อัตราการกวน 125 รอบต่อนาที พบว่าได้ปริมาณกรดอิตาโคนิก 60.0 กรัมต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป 100 กรัม โดยใช้อะเดคานอลความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ในเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารกำจัดฟอง

Larsen และ Rimhjellen (1955) ได้ทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* NRRL 1960 จากแหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ พบว่าน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และเซลโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก และให้กรดอิตาโคนิก 57 52 และ 41 กรัมต่อแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น 100 กรัม ตามลำดับ รองลงมา คือ น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบิโนส และกรีเซอรอล เนื่องจาก *A. terreus* ได้นำแหล่งคาร์บอนเหล่านี้ใช้ไปในการเจริญเป็นส่วนใหญ่ เป็นเหตุให้การผลิตกรดอิตาโคนิกลดลงไปถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่แหล่งคาร์บอนที่ไม่

สามารถนำมาผลิตกรดอิตาโคนิก คือ แป้ง น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกาแลกโตส กรดซิตริก และไกลโคเจนเนื่องจาก *A. terreus* ไม่สามารถนำแหล่งคาร์บอนเหล่านี้ไปใช้ในการเติบโตได้

Nubel และ Ratejak (1962) ได้ทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกจากกากน้ำตาล ในถังหมัก โดย *A. terreus* ใช้หัวเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง ซึ่งเตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลจากหัวบีทซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องการผลิตกรดอิตาโคนิก มีกากน้ำตาลจากหัวบีทร่วมกับน้ำตาลอื่น เช่น กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน จัดภาวะในการผลิตดังนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 5.1 อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที อุณหภูมิ 35-42 องศาเซลเซียส พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลจากหัวบีทอยู่ในช่วง 10-30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแหล่งคาร์บอนทั้งหมด ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงถึง 50 กรัมต่อคาร์โบไฮเดรตเริ่มต้น 100 กรัม แต่หากใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลจากหัวบีทมากกว่านี้ จะมีปัญหาเนื่องจากสี และความหนืดของกากน้ำตาล รบกวนกระบวนการเก็บเกี่ยวและการทำให้บริสุทธิ์

Elnaghy และ Megalla (1975) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และเปปโตนความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 3.5 ทำการผลิตที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกเป็น 30 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิก 5.4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และศึกษาถึงการให้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับไนโตรเจนอนินทรีย์ พบว่าสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ คอร์นสตีนลิเคอร์ สารสกัดจากเนื้อ สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับแอมโมเนียมไนเตรต ได้โดยผลผลิตไม่ลดลง

Kautola และคณะ (1991) ทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกด้วยสายใยอิสระและสายใยตรึงซ้ำ โดยตรึงสายใยของ *A. terreus* TKK 200-5-1 บนโพลียูริเทนโฟม ทำการผลิตในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้แหล่งคาร์บอนเป็น น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมไนเตรต ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบโรตารีความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาครั้งละ 14 วัน โดยใช้สายใยตรึงซ้ำ 4 ครั้ง พบว่าสามารถผลิตกรดอิตาโคนิกได้ 51 กรัมต่อลิตร ในการผลิตครั้งแรก ซึ่งคิดเป็น 34 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) จากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น แต่ในการผลิตซ้ำที่ 4 ปริมาณกรดอิตาโคนิกลดลง คือให้กรดอิตาโคนิก 19 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าผลผลิตจากการใช้เซลล์อิสระซ้ำที่ 4 ถึง 8 เท่า และนอกจากนี้ได้ศึกษาผลกระทบของการเติมแมกนีเซียมร่วมกับ แคลเซียมและทองแดง ต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก พบว่าการเติมแมกนีเซียมร่วมกับ แคลเซียม และทองแดง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกรดอิตาโคนิกได้ และความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 5 กรัมต่อลิตร 10 กรัมต่อลิตร และ 13 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Park และคณะ (1993) ศึกษาถึงผลกระทบของปริมาณออกซิเจนละลาย และความเร็วของปลายใบกวนต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก โดย *A.terreus* IFO-6365 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2 ลิตร มีน้ำตาลกลูโคลเข้มข้น 130 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน จัดค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 2.0 ทำการผลิตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณออกซิเจนละลายมีผลอย่างมากต่อการเติบโตของสาคใย และการผลิตกรดอิตาโคนิก โดยความเร็วของปลายใบกวนที่เหมาะสม คือ 94.2 เซนติเมตรต่อวินาที เมื่อกำหนดให้อัตราการให้อากาศเป็น 0.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเป็น 49.4 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเร็วของใบกวนเป็น 125.7 เซนติเมตรต่อวินาที ปริมาณกรดอิตาโคนิกจะลดลง เนื่องจากเซลล์เกิดความเสียหายจากแรงเฉือนของใบกวน และพบว่าความเร็วของปลายใบกวนที่เหมาะสม คือ 94.2 เซนติเมตรต่อวินาที และการเพิ่มอัตราการให้อากาศ เพื่อให้ได้ปริมาณออกซิเจนละลายเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถเพิ่มปริมาณ

กรดอิตาโคนิกได้เป็น 52 กรัมต่อลิตร

เนื่องจากกรดอิตาโคนิก และอนุพันธ์ของกรดนี้มีประโยชน์มากมายดังกล่าวข้างต้น และได้มีการนำเข้ากรดอิตาโคนิกมาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ในประเทศไทย โดยส่วนใหญ่จะนำเข้าในรูปผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบมูลค่าการนำเข้าได้ สำหรับการนำเข้าในรูปกรดนั้นมีไม่มาก แต่ยังไม่มีการผลิตใช้เองในประเทศ ดังนั้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอิตาโคนิก จึงมีคุณค่าเพื่อรองรับการผลิตใช้เองในประเทศต่อไป สำหรับจุลินทรีย์ *Aspergillus terreus* I 10 (*A. terreus* I 10) ที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดอิตาโคนิกได้สูงเป็นที่น่าพอใจ ซึ่งคัดเลือกได้โดย อุษา กรีอักษร (2535) แต่ยังไม่มีงานวิจัยเกี่ยวข้องกับการหาภาวะเหมาะสมในการผลิตกรดอิตาโคนิก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะหาภาวะเหมาะสมบางประการสำหรับการผลิตกรดอิตาโคนิกโดยใช้กระบวนการหมักในอาหารเหลวทั้งในระดับขวดเขย่า และทดลองผลิตในระดับขยายส่วนในถังหมักขนาด 5 ลิตร (fermentor) และในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) โดยใช้ *A.terreus* I 10 ในรูปเซลล์อิสระ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการขยายส่วนผลิตต่อไป และเป็นแนวทางในการผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอิตาโคนิก โดย *Aspergillus terreus* I 10 ในระดับขวดเขย่า

2. เพื่อทดลองขยายส่วนการผลิตโดยทดลองผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร และในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

ขอบเขตของการวิจัย

1. หาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมขององค์ประกอบหลัก (แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ผลผลิตกรดอิตาโคนิก

2. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก

3. หาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอิตาโคนิกสูง

4. ทดลองขยายส่วนการผลิตโดยผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร และในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย