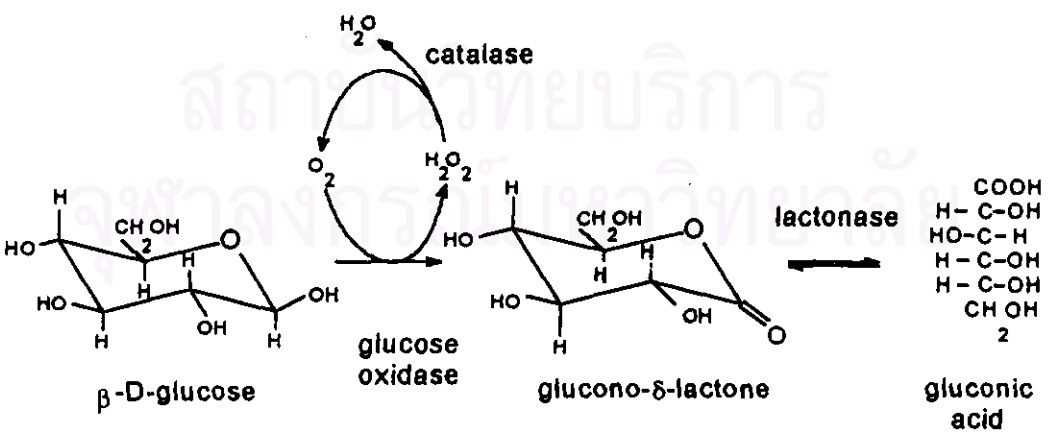
บทที่ 1

บทนำ

กรดอินทรีย์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์และใช้กันมากในอุตสาหกรรมที่รู้จักกันแพร่หลาย คือ กรดซิตริก กรดแลคติก กรดกลูโคนิก กรดอะซิติก กรดมาลิก กรดกลูโคนิก (gluconic acid, $C_6H_{12}O_7$) หรือ กรดเพนตะไฮดรอกซีคาร์โพรอิก (pentahydroxycaproic acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 1) โดยน้ำตาลกลูโคสจะถูกเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (β-D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase, E.C. 1.1.3.4) โดยมี $FADH_2$ เป็นเอนไซม์ร่วม (coenzyme) เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนกลูโคสให้เป็น ดี-กลูโคโน-เดลตา-แลคโตน (D-glucono-δ-lactone) ปฏิกิริยานี้จะให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยซึ่งเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ แต่จุลินทรีย์ก็สามารถกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้โดยเอนไซม์คะตะเลส (catalase, E.C. 1.11.1.6) ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์นั่นเอง ต่อจากนั้นดีกลูโคโนเดลตาแลคโตน จะถูกไฮโดรไลซ์ต่อได้เป็นกรดกลูโคนิก ซึ่งขั้นตอนนี้มักเกิดได้เองตามธรรมชาติ แต่ปฏิกิริยานี้จะเกิดได้เร็วขึ้นถ้ามีเอนไซม์กลูโคโนเดลตาแลคโตเนส (glucono-δ-lactonase, E.C. 3.1.1.17) ช่วยเร่งปฏิกิริยา มักพบว่า *Aspergillus niger* สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ซึ่งจะเห็นได้ว่าขั้นตอนการผลิตกรดชนิดนี้ไม่ยุ่งยาก (Prescott and Dunn, 1959 ; Lockwood, 1975 ; Van Dijken and Veenhuis, 1980 ; Milsom and Meers, 1985 ; Kubicek, Witteveen and Visser, 1994)



รูปที่ 1 ขั้นตอนการเกิดกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลกลูโคส

(Kubicek, Witteveen and Visser, 1994)

กรดกลูโคนิก ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 36.74 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 6.17 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 57.10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโมเลกุล 196.16 ละลายน้ำได้ดี และละลายในแอลกอฮอล์ได้เล็กน้อย ไม่ละลายในอีเธอร์และตัวทำละลายอื่น ๆ ในทางการค้านิยมผลิตในรูปสารละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ สีเหลืองอ่อน กลิ่นคล้ายน้ำส้มสายชู (Prescott et al. , 1953 ; Merck, 1989) แคลเซียมกลูโคเนต ($C_{12}H_{22}CaO_{14}$) ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 33.49 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 5.16 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียม 9.31 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 52.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโมเลกุล 430.38 ละลายได้ช้า ๆ ในน้ำเย็น คือ ละลายได้ในน้ำเย็น 30 ส่วน และในน้ำเดือด 5 ส่วน ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอื่น ๆ ไม่มีสี และกลิ่นรส โซเดียมกลูโคเนต ($C_6H_{11}NaO_7$) ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 33.04 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 5.08 เปอร์เซ็นต์ โซเดียม 10.54 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 51.54 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักโมเลกุล 218.13 มีกลิ่นหอม ละลายได้ดีในน้ำอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คือละลายได้ 59 กรัม ในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ แต่ไม่ละลายในอีเธอร์ (Merck, 1989) ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีโรงงานสำหรับผลิตกรดกลูโคนิก จึงอาศัยการนำเข้าจากต่างประเทศ ข้อมูลแสดงปริมาณการนำเข้ากรดกลูโคนิกและมูลค่าแสดงในตารางที่ 1 ส่วนใหญ่นำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น เยอรมันนี เนเธอร์แลนด์

ตารางที่ 1 มูลค่า และปริมาณการนำเข้าประเทศไทยของกรดกลูโคนิก อนุพันธ์ และเอสเทอร์ของกรด (ข้อมูลจาก กองบริหารข้อมูล กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2539)

ปี พ.ศ.	ปริมาณการนำเข้า (กิโลกรัม)	มูลค่า (บาท)
2531	38,635	2,383,591
2532	78,628	3,673,951
2533	135,121	5,725,004
2534	167,736	7,282,526
2535	226,890	9,020,535
2536	378,226	16,052,975
2537	337,063	13,872,726
2538 (เดือน ม.ค.ถึง ต.ค.)	336,112	14,611,009

ประโยชน์ของกรดกลูโคนิก อนุพันธ์ของกรด และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

1. ใช้ในทางการแพทย์

แคลเซียมกลูโคเนต และเฟอร์รัสกลูโคเนต ใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยที่ขาดธาตุแคลเซียม และเหล็ก ตามลำดับ (Lockwood , 1975 ; Rohr et al., 1983 ; Das and Kundu , 1987)

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ใช้ในการตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือด และปัสสาวะ (Merck, 1989)

2. ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

กรดกลูโคนิก ใช้ผสมในหมากฝรั่งเพื่อป้องกันการตกผลึกของน้ำตาลซอร์บิทอล ซึ่งเป็นสารให้ความหวานในหมากฝรั่ง (Pederson and Sonder , 1981)

กลูโคโนเดลตาแลคโตน ใช้เป็นส่วนผสมของผงฟูในการทำขนมปัง (Prescott and Dunn, 1959 ; Milson and Meers , 1985 ; Das and Kundu, 1987)

แคลเซียมกลูโคเนต ใช้ผสมในอาหารสัตว์ปีกทำให้เปลือกไข่แข็งขึ้น (Das and Kundu, 1987)

โซเดียมกลูโคเนต ใช้ป้องกันการตกตะกอนของนม และเบียร์ (Su et al., 1977)

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ใช้ผสมลงในไข่แดงผง ทำให้เก็บได้นานขึ้น เนื่องจากเอนไซม์จะไปทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในไข่แดงผง ได้กรดกลูโคนิก และคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสหมด และกรดกลูโคนิกยังมีผลยับยั้งการเจริญแบคทีเรียอีกด้วย (Merck, 1989)

กรดกลูโคนิก และกลูโคโนเดลตาแลคโตน ที่ใช้ผสมในเต้าหู้เพื่อเป็นสารให้ความเปรี้ยวและทำให้เต้าหู้แข็งตัว ตามลำดับ มีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวน *Bifidobacterium* sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้มนุษย์ ในขณะที่กรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ไม่มีคุณสมบัติดังกล่าว นอกจากนี้กลูโคโนเดลตาแลคโตนยังมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Clostridium perfringens* (กรดกลูโคนิกช่วยเพิ่มจำนวนเชื้อบิฟิโดแบคทีเรียม, 2536 ; Asono et al., 1995)

กรดกลูโคนิก ใช้เติมลงในเนื้อบรรจุหีบห่อ เพื่อทำให้เกิดสีแดงน่ารับประทาน อีกทั้งยังสามารถทำให้เนื้อเก็บได้นานขึ้น เนื่องจากกรดมีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (Zepeda et al., 1994)

3. ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

พบว่าไซเดียมกลูโคเนต สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น

ใช้ผสมในปูนซิเมนต์ ป้องกันไม่ให้ปูนแข็งตัวเร็ว (Milsom and Meers, 1985 ; Biagini and Collepardi, 1988 ; Zidwich ,1992)

ใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาทำความสะอาดโลหะป้องกันสนิมโดยเฉพาะในกรณีที่ใช้น้ำกระด้างซึ่งจะเกิดสนิมได้ง่าย ใช้ทำความสะอาดแก้ว ภาชนะต่าง ๆ และเป็นองค์ประกอบของน้ำยาทำความสะอาดผนัง (Milson and Meers, 1985)

ใช้เป็นสารป้องกันไม่ให้มีการปนเปื้อนของเหล็กในกระบวนการย้อมผ้า (Prescott et al., 1953) และป้องกันการเกาะติดของเกลือที่ปนอยู่ในน้ำกระด้างบนผ้า (Underkofler , 1954)

ช่วยให้สารเคมีที่ใช้มีความเสถียร และป้องกันการตกตะกอนของโลหะออกไซด์ในถังบรรจุด่างของน้ำยาล้างฟิล์ม (Prescott et al., 1953)

ใช้ป้องกันการตกตะกอนของไฮดรอกไซด์ของโลหะบางชนิดที่ใช้ในกระบวนการย้อมสีหนัง (Prescott et al., 1953)

สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิก

เนื่องจากกรดกลูโคนิกมีประโยชน์มากดังกล่าวข้างต้น จึงมีผู้สนใจทำการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตกรดและได้จดสิทธิบัตรไว้มากมาย ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิก

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Ziffer และคณะ (1969)	US 3,454,501	Aldonic and aldonate compositions and production
Hatcher (1972)	US 3,669,840	Gluconic acid production
Bergmeyer และ Jaworek (1976)	US 3,935,017	Process for the conversion of glucose into gluconic acid
Hartmeier (1984)	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

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิก (ต่อ)

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Goma และคณะ (1989)	EP 0,315,496	Process for the simultaneous preparation by fermentation of oligosides having a high fructose and gluconic acid content
Bringer-Meyer และ Sahm (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

การผลิตกรดกลูโคนิกทำได้ทั้งวิธีทางเคมี และการหมักโดยจุลินทรีย์ แต่วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือการหมักในอาหารเหลว โดยใช้ถังหมักที่มีการกวนโดยใช้จุลินทรีย์ *Aspergillus niger* หรือ *Gluconobacter oxydans* (Das and Kundu , 1987 ; Pronk et al., 1989 ; Sakurai et al. , 1989 ; Attwood et al. , 1991) โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกปริมาณมาก คิดเป็น 97-99 เปอร์เซ็นต์จากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น ให้กรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ปะปนน้อย ทำให้สามารถแยกกรดกลูโคนิกออกจากน้ำหมักได้ง่าย การผลิตนิยมผลิตใน 2 รูป คือในรูปแคลเซียมกลูโคเนต โดยเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารควบคุมความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 6.0-6.5 (Milson and Meers, 1985 ; Zidwich, 1992 ; Kubicek, Witteveen, and Visser, 1994) และในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดยควบคุมความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 6.0-6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Blom et al. , 1952 ; Bigelis and Arora, 1991 ; จินตนา ไกรวัฒนพงศ์ ,

2536) การผลิตกรดกลูโคนิกในระดับอุตสาหกรรมนั้น นอกจากจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิต เช่น ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณออกซิเจนแล้ว ยังต้องคำนึงถึงต้นทุนของการดำเนินการผลิตโดยพยายามหาวิธีการที่ทำให้ได้ผลผลิตกรดสูงสุด และค่าใช้จ่ายในการผลิตต่ำ เช่น การเลือกใช้วัสดุราคาถูกและหาได้ทั่วไปในบริเวณแหล่งผลิต เช่น การใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว (บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536 ; Su et al., 1977 ; Kunda and Das, 1982) แป้งข้าวโพดที่ย่อยแล้ว (Vassilev et al., 1993) การใช้สายใยอิสระซ้ำในการผลิต (จินตนา ไกรวัฒนพงศ์, 2536 ; Hatcher, 1972) และอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ คือ การใช้เซลล์หรือสายใยตรึงในการผลิต เนื่องจากเซลล์ตรึงสามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่ายและสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งโดยอัตราการผลิตยังคงที่และช่วยลดเวลาในการผลิตลงเพราะไม่ต้องเตรียมหัวเชื้อใหม่ (Sakurai et al., 1989 ; Vassilev et al., 1993)

การตรึงเซลล์

เทคนิคการตรึงเซลล์ได้รับการพัฒนามาจากเทคนิคการตรึงเอนไซม์ เนื่องจากในระยะแรกของการตรึงเอนไซม์ มักจะสนใจระบบที่อาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์เพียงชนิดเดียวโดยไม่ต้องการเอนไซม์ร่วม เช่น เอนไซม์แอสพาเตส เป็นต้น ต่อมาเริ่มสนใจระบบที่ต้องการเอนไซม์ร่วมเพื่อใช้ในปฏิกิริยานั้น ๆ แต่เนื่องจากในกระบวนการผลิตสารบางชนิด เช่น การผลิตแอลกอฮอล์จากกลูโคสต้องการเอนไซม์หลายชนิดมาเกี่ยวข้องในปฏิกิริยา และต้องการเอนไซม์ร่วม จึงไม่เป็นการสะดวกที่จะตรึงเอนไซม์ทุกๆ ตัว นอกจากนี้การตรึงเอนไซม์ยังมีข้อเสียหลายประการ คือ เอนไซม์ที่ตรึงแล้วไม่เสถียรเท่ากับเอนไซม์ที่อยู่ในภาวะธรรมชาติภายในเซลล์ การตรึงเอนไซม์ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการตรึงเอนไซม์สูงตามไปด้วย ดังนั้นจึงเริ่มมีความสนใจในการวิจัยเทคนิคการตรึงเซลล์เพื่อลดปัญหาเหล่านี้ แต่อย่างไรก็ตาม การตรึงเซลล์จะใช้ได้ก็ต่อเมื่อเซลล์นั้นไม่มีเอนไซม์อื่นในปริมาณที่มากพอที่จะมามีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ต้องการ หรือสามารถกำจัดเอนไซม์ที่ไม่ต้องการ (interfering enzyme) ได้ นอกจากนี้สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ควรมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เพื่อสามารถผ่านเข้าออกในบริเวณที่มีเซลล์ที่ถูกตรึงได้ การตรึงเซลล์ไม่ใช่กระบวนการที่ค้นพบใหม่ แต่เป็นกระบวนการที่เลียนแบบวิธีการที่พบในธรรมชาติ เช่น จุลินทรีย์ที่เกาะติดกับหิน ทราย ซึ่งช่วยในการกำจัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมโดยกระบวนการทริกกริ้งฟิลเตอร์ (Trickling filter) หรือการผลิตกรดน้ำส้ม ที่มีการเติมขี้เลื่อยลงไปในถังหมักเพื่อให้แบคทีเรียเกาะทำให้ผลการผลิตดีขึ้น (Brodelius and Vandamme, 1987)

วิธีการตรึงเซลล์หรือสายใย

วิธีการที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์หรือสายใยสามารถแบ่งออกเป็นวิธีใหญ่ ๆ ได้ 2 วิธี (Fukuda , 1995)

1. แอคทีฟ อิมโมบิไลซ์ (Active Immobilized)

เป็นวิธีการที่เซลล์ หรือสายใยตรึงกับวัสดุตรึงโดยใช้สารเคมีเป็นตัวก่อให้เกิดการตรึง มี 3 วิธี คือ

1.1 การเชื่อมไขว้ (cross-linkage)

การตรึงเซลล์หรือสายใยโดยใช้สารเคมี เช่น กลูตารัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับเซลล์ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่กลุ่มอะมิโนอิสระ และ/หรือกลุ่มคาร์บอกซิลอิสระบนผนังเซลล์มาเชื่อมโยงกันด้วยสารเชื่อมไขว้

1.2 การเกิดพันธะโควาเลนต์ (covalent bonding)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เกิดขึ้นโดยใช้สารเคมีทำให้เซลล์ และวัสดุตรึงที่อาจเป็นสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยกระตุ้นวัสดุตรึงด้วยสารเชื่อมไขว้ เช่น พอลิไอโซไซยาเนต หรือคาร์โบไดไอมายด์ เมื่อเติมสารละลายเซลล์ลงไป หมู่ของสารเชื่อมไขว้ที่อยู่บนผิวของวัสดุตรึงจะเชื่อมเซลล์ให้ติดกันอยู่บนผิวของวัสดุตรึงนั้น อย่างไรก็ดีพบว่าวิธีการนี้จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ และความอยู่รอดของเซลล์ลดลง

1.3 การกักขังเซลล์ (entrapment in gels)

เป็นวิธีการทำให้เซลล์ติดอยู่ภายในโครงร่างของสารพอลิเมอร์ ไม่หลุดออกมาภายนอก แต่สารตั้งต้น และสารผลิตภัณฑ์สามารถผ่านเข้าออกได้ วิธีการนี้เป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการตรึงเซลล์ เอนไซม์ ออร์กาเนลล์ เซลล์พืช เซลล์สัตว์ วัสดุตรึงต่าง ๆ ที่นิยมนำมาใช้ในการตรึงเซลล์วิธีนี้มีหลายประเภท ดังแสดงในตารางที่ 3

การตรึงเซลล์โดยวิธีกักขังเซลล์นี้ยังมีข้อจำกัด เช่น การตรึงเซลล์ในพอลิอะคริลาไมด์ โมโนเมอร์ของอะคริลาไมด์ และ บิส ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ และทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี หรือการตรึงในเรซินที่เชื่อมไขว้ด้วยแสง และการตรึงในพอลิเมอร์สายสั้น ๆ ของยูรีเทน เป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก และเอนไซม์จะสูญเสียความเสถียร และการตรึง

เซลล์ในแคลเซียมอัลจิเนต แคลเซียมอัลจิเนตจะสูญเสียความเสถียรเมื่อมีอนุมูลอิสระในระบบ เช่น ฟอสเฟต ซิเตรต แลคเตต อีดีทีเอ เป็นต้น

ตารางที่ 3 ตัวอย่างวัสดุตรึงที่ใช้ในการตรึงเซลล์โดยวิธีการกักขังเซลล์

สารพอลิเมอร์สังเคราะห์	Polyacrylamide
	Polymethacrylamide
	Photo-cross-linkable resin prepolymer
	Urethane prepolymer
	Polyethyleneglycol
	Polyvinyl alcohol
พอลิแซคคาไรด์	Alginate
	K-Carrageenan
	Agar
	Chitosan
โปรตีน	Collagen
	Gelatin

2. พาสซีฟ อิมโมบิไลซ์ (Passive Immobilized)

เป็นวิธีการที่เซลล์ หรือสายใยเกิดการตรึงกับวัสดุตรึงได้เองตามธรรมชาติ มี 2 วิธี คือ

2.1 การเกาะติดบนวัสดุตรึง (adsorption)

การเกาะติดของเซลล์จะเกิดขึ้นเอง เนื่องจากแรงดึงดูดทางไฟฟ้า ระหว่างผิวของเซลล์กับวัสดุตรึง วัสดุตรึงที่ใช้ คือ เซลลูโลส เดกซ์แทน หรือ เรซิน ที่เติมหมู่อิออน เช่น ไดเอทิลอะมิโนเอทิล-เซลลูโลส เดคติน

2.2 เซลล์หรือสายใยเจริญในวัสดุตรึง (colonization)

วัสดุตรึงที่ใช้ควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือ มีลักษณะเป็นรูพรุน หรือมีโครงสร้างที่เป็นร่างแหสานกันอยู่ ทนต่อสารเคมี ทนความร้อนได้ดีสามารถนำไปทำให้ปลอดเชื้อได้ วิธีการตรึงเซลล์หรือสายใยกระทำโดย นำวัสดุตรึงเติมลงในถังหมัก ทำการฆ่าเชื้อ แล้วผ่านขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อตามปกติ โดยเติมเซลล์หรือสปอร์ราลงไป เซลล์จะเจริญ หรือสปอร์ของราจะ

งอกเป็นสายใย และถูกตรึงอยู่ภายในวัสดุตรึงเองในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ วัสดุตรึงต่าง ๆ ที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้ เช่น ชิ้นสเตนเลสสตีล พอลิเอสเทอร์โฟม พอลิอีเทอร์โฟม พอลิยูรีเทนโฟม ซิลิโคนโฟม พอลิไวนิลฟอมัล เรซิน เซลลูโลสที่มีรูพรุน

ตารางที่ 4 ตัวอย่างวัสดุตรึงชนิดต่าง ๆ ที่นิยมใช้ตรึงเซลล์ หรือสายใยรา

วัสดุตรึง	จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
พอลิอะคริลามายด์	*E. coli*	กรด แอล-แอสพาติก	Chibata และคณะ , 1974
พอลิอะคริลามายด์	*Aspergillus niger*	กรดซิตริก	Horitsu และคณะ , 1985
เส้นใยไนลอน	*Gluconobacter suboxydans*	กรดกลูโคนิก	Seiskari และคณะ , 1985
แคลเซียมอัลจิเนต	*Aspergillus niger*	กรดซิตริก	Tsay และ To , 1987
เซรามิคที่มีลักษณะคล้ายรังผึ้ง	*Gluconobacter suboxydans*	กรดกลูโคนิก	Shiraishi และคณะ , 1989
แคปปา-คาร์ราจิแนน	*Escherichia coli*	อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส	Manin และคณะ , 1989
ผ้าใยสังเคราะห์	*Aspergillus niger*	กรดกลูโคนิก	Sakurai และคณะ, 1989
ซินเทอร์กลาส	*Saccharomyces cerevisiae*	กลีเซอรอล	Hecker และคณะ , 1990
ผ้าไนลอน	*Yarrowia lipolytica*	กรดซิตริก	Kautola และคณะ , 1991
เรซินที่เชื่อมไขว้โดยแสง	*Zymomonas mobilis*	เอธานอล	Iida และคณะ , 1993
พอลิยูรีเทนโฟม โดยวิธีทำให้สายใยเจริญในวัสดุตรึง	*Aspergillus niger*	กรดกลูโคนิก	Vassilev และ คณะ, 1993

การตรึงเซลล์หรือสายใยในวัสดุตรึงพอลิยูรีเทนโฟม (Polyurethane foam (PUF))

วัสดุตรึงที่ใช้ตรึงสายใยในงานวิจัยนี้ คือ PUF ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่มีหมู่พอลิเมอร์เป็นไอโซไซยาเนต (isocyanate) สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด (บรรเลง ศรานิล, 2535) คือ

1. ชนิดโครงสร้างแบบปิด (closed shape) เป็นโฟมที่มีโพรงของเซลไม่ต่อถึงกัน นิยมใช้เป็นวัสดุกักความร้อนในตู้เย็น

2. ชนิดโครงสร้างแบบเปิด (opened shape) เป็นโฟมที่มีโพรงของเซลต่อถึงกัน จนทำให้ก๊าซ หรืออากาศหมุนเวียนถึงกันได้ วัสดุที่ใช้กันมากคือ ฟองน้ำสังเคราะห์

3. ชนิดโครงสร้างแบบผสม (mixed) มีโครงสร้างผสมระหว่างโครงสร้างเปิดและโครงสร้างปิด ใช้เป็นวัสดุกันกระแทก

การตรึงเซลล์ใน PUF สามารถกระทำได้ 2 แบบ

1. การตรึงเซลล์โดยวิธีกักขังเซลล์ใน PUF

โดยเตรียมสารพรีพอลิเมอร์ของพอลิยูรีเทน ที่มีหมู่ไอโซไซยาเนตที่ปลายทั้งสองข้าง ด้วยการผสมกับสารละลายของเซลล์ เมื่อเติมยูเรียลงไปจะทำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไลเซชั่นระหว่างหมู่ไอโซไซยาเนตของพรีพอลิเมอร์หลาย ๆ โมเลกุล ทำให้เกิดโครงร่างตาข่ายของสายพอลิเมอร์ เซลล์จะถูกตรึงอยู่ภายในโครงร่างตาข่ายพอลิเมอร์เหล่านี้ การเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไลเซชั่นนี้จะให้คาร์บอนไดออกไซด์อิสระขึ้น ซึ่งจะทำให้ชิ้น PUF มีรูพรุน ชิ้น PUF ที่ได้จากการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้นิยมนำไปผลิตสารผลิตภัณฑ์ในถังหมักแบบฟิกซ์เบด (fixed bed fermentor) แต่ปัจจุบันไม่นิยมใช้วิธีการนี้เนื่องจากมีขั้นตอนยุ่งยาก และมีผลทำให้ความเสถียรของเอนไซม์ลดลง (Klein and Wagner, 1983 ; Brodelius and Vandamme, 1987)

2. การตรึงเซลล์โดยวิธีการทำให้เซลล์หรือสายใยเจริญใน PUF

ทำโดยเติมวัสดุตรึงลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว แล้วทำการฆ่าเชื้อตามปกติ แล้วเติมเซลล์ หรือสปอร์ของราลงไป ผ่านขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อตามปกติ เซลล์จะถูกตรึงเข้าไปใน PUF ส่วนสปอร์ของราจะงอกเป็นสายใยและติดอยู่ภายใน PUF ซึ่งมีโครงสร้างเป็นรูพรุน วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกรวดเร็ว ราคาไม่แพง ทนต่อแรงเฉือนได้ดี มีความคงทนทำให้สามารถนำมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง ขั้นตอนในการตรึงไม่ต้องการปฏิกิริยาเคมี ทำให้ไม่มีสาร

เคมีที่เป็นอันตรายต่อเซลล์หรือสายใย และการผลิตในระดับขยายส่วนเป็นไปได้ง่าย เนื่องจากไม่ต้องการถังที่ใช้ในการเตรียมสายใยตรึงเพิ่มเติม (Fukuda , 1995)

ตารางที่ 5 ตัวอย่างการใช้จุลินทรีย์ที่ตรึงในพอลิยูรีเทนโฟมโดยวิธีทำให้เซลล์ หรือสายใยเจริญเพื่อผลิตสารผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ

จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
Methanogen sp.	มีเทน	Fynn และ Whitemore , 1982 อ้างถึงใน Fukuda , 1995
Mucor ambiguus	กรดแกรมมาลิโนลีนิก	Fukuda และ Morikawa , 1987
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 chrysogenum	เพนนิซิลิน	Kobayashi และคณะ , 1990 อ้างถึงใน Fukuda , 1995
Yarrowia lipolytica	กรดซิตริก	Kautola และคณะ , 1991
Thiobacillus ferroxidans	Ferrous sulfate oxidation	Armentia และ Webb , 1992
Candida rugosa	ไลเปส	Ferrer และ Sola , 1992
Aspergillus niger	กรดกลูโคนิก	Vassilev และคณะ , 1993
Citrobacter freundii	1,3 โปรปานีไดออล	Pflugmacher และคณะ , 1994
Streptomyces coelicolor	แอกทีโนโรดิน	Ozergin-Ulgen และ Mavituna,1994
Trichoderma reesei	เอนโด 1,4 บีดากลูคาเนส และเอนไซม์ไซลาเนส	Haapala และคณะ , 1995

แบบของถังหมักที่ใช้ในการผลิตสารผลิตภัณฑ์โดยเซลล์หรือสายใยตรึง

แบบของถังหมักที่ใช้ในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ ด้วยเอนไซม์ตรึง เซลล์ตรึง หรือสายใยตรึง มีหลายแบบ เช่น ถังหมักที่มีการกวนสม่ำเสมอ (stirred tank reactor) หรือใช้เทคนิคฟลูอิดไดเซชั่น โดยอาจใช้ถังหมักแบบฟิกซ์เบด (fixed bed reactor) และถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด (fluidized bed reactor) (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2528) อาจทำการผลิตแบบต่อเนื่อง (continuous culture) หรือแบบใช้สายใยตรึงซ้ำ แต่ในถังหมักแบบที่มีการกวนพบว่าเซลล์ตรึงหรือสายใยตรึงจะถูกทำลายโดยแรงเฉือน (shear force) ทำให้เซลล์เสียสภาพหรือหลุดออกจากวัสดุตรึง ส่วนถังหมักแบบฟิกซ์เบดจะพบปัญหาการอุดตันเนื่องจากการเติบโตของเซลล์ตรึง ดังนั้นถังหมักที่นิยมใช้ในการผลิตสารโดยวิธีการตรึงเซลล์ หรือสายใย คือ ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด (Fukuda, 1995)

ฟลูอิดไดเซชั่น หมายถึงกระบวนการ หรือ วิธีการที่ของแข็งซึ่งมีรูปร่างลักษณะเป็นเม็ด หรือ ชิ้น สัมผัสกับของไหล แล้วเม็ดของแข็งเหล่านี้จะมีคุณสมบัติคล้ายของไหล ซึ่งอาจเป็นก๊าซ หรือของเหลวผ่านเข้าทางด้านล่างของตะแกรงที่รองรับเม็ดของแข็ง ของไหลจะไหลผ่านชั้นเม็ดของแข็ง แล้วไหลออกทางส่วนบนของหอทดลอง เพิ่มความเร็วของไหลให้มากขึ้นเรื่อย ๆ จนในที่สุดจะเห็นเม็ดของแข็งขยับตัว และลอยตัวขึ้นเป็นอิสระต่อกันไม่เกาะติดกัน ของแข็งที่อยู่ในลักษณะนี้จะมีคุณสมบัติคล้ายของไหล คือมีการหมุนเวียนของเม็ดของแข็งภายในหอทดลอง เราเรียกของแข็งในสถานะนี้ว่า ฟลูอิดไดเซชั่น (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2528) ประเภทของฟลูอิดไดเซชั่น มี 2 ประเภท คือ

1. ฟลูอิดไดเซชั่นสองสถานะ มี 2 แบบ คือ ก๊าซฟลูอิดไดเซชั่น (gas fluidization) ระหว่างก๊าซ กับของแข็ง และ ฟลูอิดไดเซชั่นของเหลว (liquid fluidization) ระหว่างของเหลวกับของแข็ง

2. ฟลูอิดไดเซชั่นสามสถานะ ระหว่างของแข็ง ของเหลว และก๊าซ ซึ่งคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้จัดเป็นฟลูอิดไดเซชั่นประเภทนี้

ข้อดีของการทำฟลูอิดไดเซชั่น คือ มีการเคลื่อนที่ของเม็ดของแข็งตลอดเวลา ทำให้อุณหภูมิภายในหอปฏิกิริยาเท่ากันตลอด และสามารถทำงานแบบต่อเนื่องได้โดยไม่เปลืองพลังงานมากเมื่อเทียบกับหอปฏิกิริยาแบบอื่น (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2528)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดยเซลล์และสายใยตรึง

1. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิก

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนสำคัญต่อการผลิตกรดกลูโคนิก พบว่าแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ คือ น้ำตาลกลูโคส เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นกรดกลูโคนิกได้โดยตรง แหล่งของน้ำตาลกลูโคสที่นิยมใช้ ได้แก่ แป้งข้าวโพดที่ย่อยแล้ว (Moresi et al., 1991 ; Vassilev et al., 1993) แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว (Su et al., 1977) เนื่องจากในโครงสร้างของแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสมาต่อกันด้วยพันธะ แอลฟา 1,4 (α-1,4) และแอลฟา 1,6 (α-1,6) เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะมายเลส (α-amylase) และกลูโคอะมายเลส (glucoamylase) จะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส (Bigelis, 1992) นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้ว ยังต้องคำนึงถึงปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมด้วย ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการผลิตกรดกลูโคนิกในรูปเกลือต่าง ๆ ด้วยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* ในวัสดุตรึงต่าง ๆ อยู่ในช่วงระหว่าง 40-150 กรัมต่อลิตร (Seiskari et al., 1985 ; Sakurai et al., 1989 ; Shiraishi et al., 1989 ; Moresi et al., 1991 ; Vassilev et al., 1993) ซึ่งน้อยกว่าการผลิตกรดนี้โดยสายใยอิสระ เนื่องจากถ้าใช้น้ำตาลกลูโคสปริมาณมากจะเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนต ซึ่งจะทำให้เกิดปัญหาในขั้นตอนการผลิตและการนำไปใช้ซ้ำ แหล่งไนโตรเจนก็เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์จะใช้ไนโตรเจนเพื่อสร้างกรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิก เอนไซม์ ฯลฯ เพื่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ สำหรับการผลิตกรดกลูโคนิกนั้นแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สามารถใช้ทั้งในรูปไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น เกลือแอมโมเนียมไนเตรต (Moresi et al., 1991) แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Vassilev et al., 1993) และไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) (Seiskari et al., 1985 ; Sakurai et al., 1989 ; Shiraishi et al., 1989) นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนแล้วปริมาณที่ใช้ก็มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิกเช่นเดียวกัน สำหรับการผลิตโดยสายใยอิสระไม่ควรมีแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมาก เพราะจะทำให้เชื้อมีการเติบโตมากการผลิตกรดน้อยลง (Milson and Meers, 1985) รดิกร กัณฑะพงศ์ (2534) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยอิสระของ *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่ใช้ในการทดลองนี้ พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ต่อมา กุลธิรา สู่สุข (2538) ได้ทดลองผลิตกรดโดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าการผลิตในระดับขวดเขย่า ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดชนิดนี้ ส่วนการผลิตในระดับคอลัมน์แก้วที่มีการให้

อากาศด้านล่าง ไม่ต้องมีการเติมแหล่งแอมโมเนียมใด ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด แหล่งแร่ธาตุก็เป็นองค์ประกอบอีกส่วนหนึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อ จำเป็นต้องเลือกใช้ให้เหมาะสม และเพียงพอ อย่างไรก็ดีพบว่าสามารถใช้น้ำประปาแทนการเติม แร่ธาตุในการผลิตกรดกลูโคนิกได้ (Blom et al , 1952 ; บาจรีย์ จันทราภานุกร , 2536)

2. ปริมาณออกซิเจน

ในการผลิตกรดกลูโคนิกต้องการปริมาณออกซิเจนมาก เนื่องจากกรดกลูโคนิกเกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคสโดยตรง ดังนั้นปริมาณออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญมากปัจจัยหนึ่ง เมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนจะทำให้ได้ผลผลิตสูงและเร็วขึ้น จินตนา ไกรวัฒนพงศ์ (2536) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยสายใยอิสระของ *Aspergillus niger* G153 ในถังหมักที่มีการกวน พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราเร็วในการกวนเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลาย จะทำให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกสูงขึ้น และเวลาที่ใช้ในการผลิตจะลดลงด้วย Moresi และคณะ (1991) ศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ (dissolved oxygen) ต่อการผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Aspergillus niger* ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถใช้น้ำตาลเริ่มต้นเพื่อการผลิตกรดดังกล่าวได้มากขึ้น กุลธิรา สู่สุข (2538) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 5.5 เซนติเมตร ความสูงของคอลัมน์เท่ากับ 30 เซนติเมตร ปริมาตรใช้งาน 400 มิลลิลิตร พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศสูงขึ้นจะทำให้ปริมาณกรดสูงขึ้น และเวลาที่ใช้ในการผลิตลดลง อัตราการให้อากาศที่ดีที่สุด คือ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที Vassilev และคณะ (1993) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* ในพอลิยูรีเทนโฟมในระดับขวดเขย่า พบว่าความเร็วของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมคือ 220 รอบต่อนาที และการผลิตระดับขยายส่วนในคอลัมน์ที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4 เซนติเมตร ความสูงของคอลัมน์เท่ากับ 35 เซนติเมตร ปริมาตรใช้งาน 300 มิลลิลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจะมีผลเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิก โดยอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม คือ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้ผลผลิตกรดสูงสุด 143.8 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 150 กรัมต่อลิตร

3. หัวเชื้อ

ขนาดและอายุของหัวเชื้อสายใยมีความสำคัญต่อการผลิตกรดกลูโคนิกด้วยสายใยตรึง ถ้าหัวเชื้อสายใยตรึงที่ใช้มีอายุเหมาะสมจะช่วยลดเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดและเพิ่มปริมาณกรดที่ผลิตได้ Chantarsa-ard และ Kinoshita (1994) ได้ศึกษาผลของอายุหัวเชื้อของสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในพอลิยูรีเทนโฟม ต่อการผลิตกรดกลูโคนิก โดยเปรียบเทียบหัวเชื้ออายุ 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าหัวเชื้อสายใยตรึงอายุ 48 ชั่วโมงให้ผลผลิตกรดสูง และเร็วกว่า คือให้ผลผลิตกรดสูงสุด 99 กรัมต่อลิตรในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณสปอร์ตั้งต้นที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อก็มีความสำคัญต่อการผลิตกรดกลูโคนิกเช่นกัน ถ้าใช้สปอร์ปริมาณมากในการตรึงจะทำให้การงอกของสปอร์ในชิ้นวัสดุตรึงช้า ไม่ทั่วถึง เนื่องจากสารอาหารและอากาศสามารถผ่านเข้าไปในชิ้นวัสดุตรึงลึกลงไปจากระดับผิวด้านนอกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น สปอร์บริเวณผิวชิ้นวัสดุตรึงจะงอกเป็นสายใย แต่สปอร์บริเวณกลางชิ้นวัสดุตรึงจะไม่สามารถงอกได้ ทำให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกลดลง (Tsay and To, 1987; Gosmann and Rehm, 1988 ; กุลธิรา สุ่สุข , 2538 ; Fukuda, 1995)

4. ขนาดของชิ้นวัสดุตรึง

ขนาดของชิ้นวัสดุตรึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิก โดยชิ้นวัสดุตรึงที่มีขนาดเล็กจะให้ผลผลิตดีกว่าชิ้นวัสดุตรึงที่มีขนาดใหญ่กว่า เนื่องจากวัสดุตรึงชิ้นเล็กจะมีพื้นที่ผิวมากกว่า ทำให้การส่งผ่านออกซิเจนและการผ่านเข้าออกของสารตั้นต้นและผลิตภัณฑ์เป็นไปได้ง่าย (Klein and Wagner , 1983 ; Fukuda, 1995) Vassilev และคณะ (1993) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* ในพอลิยูรีเทนโฟม พบว่าชิ้นวัสดุตรึงขนาด 1 เซนติเมตร (กว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 1 เซนติเมตร สูง 1 เซนติเมตร) จะให้ผลผลิตต่ำและช้ากว่าชิ้นวัสดุตรึง 0.3 เซนติเมตร (กว้าง 0.3 เซนติเมตร ยาว 0.3 เซนติเมตร สูง 0.3 เซนติเมตร)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิกโดยเซลล์หรือสายใยตรึงใน PUF

Kundu และ Das (1982) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยเชื้อ *Aspergillus niger* ในระดับขวดเขย่ามีแป้งข้าวโพดที่ย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติมชานอ้อยที่หั่นเป็นชิ้นเล็กเพื่อให้สายใยราเกาะ พบว่าให้ผลผลิตกรดสูงกว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมชานอ้อย

Seiskari และคณะ (1985) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปกรดอิสระ โดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ *Gluconobacter oxydans* บนเส้นใยไนลอน (fibrous nylon) ในถังหมักแบบฟลูอิดไดเบดแบบต่อเนื่องโดยใช้คอลัมน์แก้วที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Jacketed glass column reactors) พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.3 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที อัตราการให้อาหาร 0.067 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อชั่วโมง สามารถผลิตกรดกลูโคนิกได้ 80 กรัมต่อลิตร ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 6 เดือน

Sakurai และคณะ (1989) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* บนผ้าที่ทอด้วยเส้นใยสังเคราะห์ผสมกับเส้นใยจากธรรมชาติ โดยใช้น้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 300 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดได้ 220 กรัมต่อลิตร และสามารถใช้สายใยตรึงซ้ำได้ถึง 14 ครั้ง โดยอัตราการผลิตไม่ลดลง

Shiraishi และคณะ (1989) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปกรดอิสระด้วยสายใยตรึงของ *Gluconobacter suboxydans* IFO 3290 บนกระเบื้องที่มีลักษณะเหมือนรังผึ้งในถังหมักแบบฟลูอิดไดเบดแบบต่อเนื่อง โดยใช้กลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตต่อเนื่องได้เป็นเวลา 1 เดือน โดยความสามารถในการผลิตของเซลล์ตรึงไม่ลดลง ให้ผลผลิตเฉลี่ย 84.6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

Moresi และคณะ (1991) รายงานว่าเมื่อผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตโดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต ในถังหมักแบบที่มีการกวนด้วยอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.4 ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นอยู่ในช่วง 70-160 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (dissloved oxygen) ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 50-75 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลผลิตกรดกลูโคนิกขึ้นกับปริมาณออกซิเจนที่ละลาย เมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนจะทำให้สามารถใช้น้ำตาลเริ่มต้นเพื่อการผลิตได้มากขึ้น

Vassilev และคณะ (1993) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* ในพอลิยูรีเทนโฟมโดยวิธีการทำให้สายใยเจริญในวัสดุตรึง ในระดับขวดเขย่า พบว่า ผลิตกรดได้สูงสุด 137.1 กรัมต่อลิตร ในเวลา 14 ชั่วโมง เมื่อใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายแป้งข้าวโพดเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลผลิตที่ได้สูงกว่าการ

ผลิตโดยสายใยอิสระ คือสายใยอิสระผลิตได้ 113.4 กรัมต่อลิตร และสามารถนำสายใยมาใช้ผลิตกรดซ้ำได้ต่อเนื่อง 65-70 ชั่วโมง โดยความสามารถในการผลิตคงที่ และทดลองผลิตในระดับขยายส่วนในถังหมักแบบฟลูอิดไดเบดโดยใช้คอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) ขนาด 300 มิลลิลิตร โดยให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ปริมาตรสายใยตรึงต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1: 3 พบว่า ให้ผลผลิตกรดสูงสุด 143 กรัมต่อลิตร ในเวลา 10 ชั่วโมง และสามารถนำสายใยตรึงมาใช้ซ้ำได้ 5 ครั้งต่อเนื่องกัน โดยความสามารถในการผลิตลดลงเล็กน้อย

กุลธิรา สู่สุข (2538) ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus niger* G153 ในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงสปอร์และการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงที่เหมาะสม คือ การใช้สปอร์หนาแน่น 1.0-2.5 X 10^9 สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 100 มิลลิลิตร ขนาดเม็ดเจลสปอร์ตรึง 3.5 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงนาน 66 ชั่วโมง ส่วนภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดในระดับขวดเขย่า คือ ใช้เม็ดเจลสายใยตรึง 40 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ที่มีน้ำตาลกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟต 250 และ 0.2 กรัม ตามลำดับ ให้ผลผลิตกรดสูงสุด 252.4 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการผลิต สำหรับการผลิตในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ น้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ความหนาแน่นเม็ดเจลสายใยตรึง 300 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรด 54 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 18 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดโดยใช้สายใยตรึงซ้ำได้ 10 ซ้ำโดยผลผลิตกรดไม่ลดลง นอกจากนี้สามารถเก็บเม็ดเจลสปอร์ตรึง และสายใยตรึงไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 และ 5 วัน ตามลำดับ โดยความสามารถในการผลิตกรดกลูโคนิกยังคงเดิม อีกทั้งสามารถใช้น้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสบริสุทธิ์ และใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุได้ โดยไม่ต้องเติมแร่ธาตุใด ๆ

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่ากรดกลูโคนิกมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท สำหรับประเทศไทยยังไม่มีการผลิตกรดชนิดนี้ใช้เอง จึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศทั้งหมด แม้ว่าปริมาณนำเข้าในรูปกรด อนุพันธ์ และเอสเทอร์ของกรดจะมีปริมาณไม่สูงมากนัก แต่ก็มีความต้องการใช้กรดกลูโคนิกเพิ่มขึ้นทุกปี และยังนำเข้ากรดในรูปผลิตภัณฑ์อื่นที่ผสมแล้ว แต่ไม่ทราบมูลค่าที่แน่นอน รวมถึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสซึ่งสามารถนำมาใช้งานได้หลายประเภท งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดกลูโคนิกในประเทศไทยเริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 โดย รศ. กรรณิกา จันทรสอาด ได้คัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิกได้สูงจากดินหลาย

แหล่งในประเทศไทย ซึ่งสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด คือ *Aspergillus niger* G153 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ และได้ทำการทดลองมาอย่างต่อเนื่อง โดยทดลองหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่า (รติกร กัณฑะพงศ์, 2534) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปแคลเซียมกลูโคเนตในถังหมักขนาด 5 ลิตร (บาจรีย์ จันทราภานุกร, 2536) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิกในรูปโซเดียมกลูโคเนตในถังหมักขนาด 5 ลิตร และทดลองใช้สายใยอิสระซ้ำในการผลิต (จินตนา ไกรวัฒนพงศ์, 2536) และทดลองผลิตด้วยการตรึงสายใยในแคลเซียมอัลจิเนต (กุลธิรา สู่สุข, 2538) ซึ่งให้ผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจแต่อัลจิเนตเป็นสารที่ได้มาจากการสกัดสาหร่ายทำให้มีราคาสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการตรึงสายใยในพอลิยูรีเทนโฟม ซึ่งเป็นวัสดุที่หาได้ง่าย มีราคาถูก และขั้นตอนที่ใช้ในการตรึงสายใยไม่ยุ่งยาก โดยทดลองหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการตรึงสายใยและการผลิตในขวดเขย่า และทำการผลิตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง รวมทั้งทดลองผลิตโดยใช้ สายใยตรึงซ้ำ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการตรึงสายใย และการผลิตกรดกลูโคนิกโดย *Aspergillus niger* G153 ที่ตรึงใน PUF ในระดับขวดเขย่า และในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง
2. เพื่อศึกษาการนำสายใยตรึงมาผลิตกรดกลูโคนิกซ้ำ

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาหาชนิดของ PUF ที่เหมาะสำหรับการตรึงสายใยเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิกในระดับขวดเขย่า
2. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการตรึงสายใยให้มีประสิทธิภาพสูง
3. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดกลูโคนิกโดยสายตรึงในระดับขยายส่วนการผลิตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง
4. ผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้สายใยตรึงซ้ำ