บทที่ 1

บทนำ

กรดอิทาโคนิก (itaconic acid หรือ methylene succinic acid หรือ methylene butanedioic acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม มีการค้นพบในปี 1836 โดย Baup (Baup, 1836) โดยพบว่ากรดอิทาโคนิกเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมจากการกลั่นกรดซิตริก ต่อมาในปี 1931 Kinoshita พบว่ากรดดังกล่าวผลิตได้โดยเชื้อราในสกุล *Aspergillus* และได้ตั้งชื่อว่า *Aspergillus itaconicus* และในปี 1939 Calam และคณะสามารถแยกจุลินทรีย์ชนิดใหม่ได้จากดินซึ่งเป็นราสีน้ำตาล มีชื่อว่า *Aspergillus terreus* มีความสามารถผลิตกรดอิทาโคนิกได้เช่นเดียวกัน ตั้งแต่นั้นมาจึงนิยมใช้ *A. terreus* ในการผลิตกรดอิทาโคนิกแทนเชื้อ *A. itaconicus* ซึ่งเติบโตช้าและผลิตกรดอิทาโคนิกได้ต่ำ (Calam, 1939 ; Lockwood, 1954 ; Milsom และ Meers,1985 ; Mattey, 1992) นอกจากนั้นยังพบว่า *Rhodotorula* sp. *Candida* sp. *Ustilago zeae* *Penicillium charlesii* *Helicobasidium mompa* และราสีเหลืองเขียวในสกุล *Aspergillus* ก็สามารถผลิตกรดอิทาโคนิกได้ (Tabuchi และคณะ, 1981 ; Milsom และ Meers,1985 ; Guevarra และ Tabuchi, 1990) แต่จุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตกรดอิทาโคนิกในระดับอุตสาหกรรมคือ *Aspergillus terreus* เนื่องจากผลิตกรดดังกล่าวได้ปริมาณมาก และมีกรดอินทรีย์อื่นปนเปื้อนน้อยมาก (Lockwood และ Reeves, 1945 ; Lockwood และ Nelson, 1946 ; Zidwick, 1992)

กรดอิทาโคนิกมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_5H_6O_4$ มวลโมเลกุล 130.10 ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 46.16 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 4.65 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 49.19 เปอร์เซ็นต์ มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1

$$CH_2 = C(-COOH)-CH_2-COOH$$

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของกรดอิทาโคนิก

กรดอิทาโคนิกมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีความเป็นพิษ จุดหลอมเหลว 162 - 168 องศาเซลเซียส เสียสภาพที่อุณหภูมิสูงกว่า 162 องศาเซลเซียส ความถ่วงจำเพาะ 1.632 กิโลกรัมต่อลิตร ละลายได้เล็กน้อยในสารละลายอินทรีย์ ละลายได้ในน้ำ โดยละลายได้ 8.3 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และละลายได้ถึง 72.5 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ด้วยสมบัตินี้จึงช่วยทำให้ง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึก (Presscott และ Dunn, 1959 ; Mattey, 1992)

ประโยชน์ของกรดอิทาโคนิกและอนุพันธ์ของกรด

กรดอิทาโคนิกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งในทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรมต่าง ๆ ด้วยสมบัติของกรดอิทาโคนิกซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ หมู่เมทธิลีน และพันธะคู่ของกรดที่สามารถเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชั่น (polymerization reaction) ซึ่งเป็นสมบัติที่ทำให้กรดอิทาโคนิกถูกใช้เป็นโคพอลิเมอร์ (copolymer) ร่วมกับสารโมโนเมอร์ (monomer) ชนิดอื่นได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ทางการค้า

1. การแพทย์

ใช้เป็นยาบรรเทาความเจ็บปวด และต้านการอักเสบ โดยใช้ในรูปของไดเมทธิลอิทาโคเนตและไดเอทธิลอิทาโคเนต (Bagavant, Gole และ Soni, 1994)

2. การเกษตร

อนุพันธ์เฮกซิลของกรดอิทาโคนิก (hexylitaconic acid) ใช้เป็นสารเร่งการเจริญของราก และส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน เช่น ผักกาด กะหล่ำปลี และข้าว (Suzuki และคณะ,1986)

3. ทางอุตสาหกรรม

3.1 อุตสาหกรรมสิ่งทอ

ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ในขั้นตอนการย้อมสีมีการใช้โคพอลิเมอร์ของกรดอิทาโคนิกกับอะคริโลไนไตรล์ เนื่องจากช่วยให้สิ่งทอติดสีย้อมได้ดีขึ้น (Milsom และ Meers, 1985)

กรดอิทาโคนิกใช้เป็นสารเพิ่มคุณสมบัติทนความร้อนให้แก่ขนแกะ ช่วยป้องกันปัญหาการโค้งงอของขนแกะ เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้ง (Tsukada และคณะ, 1992)

3.2 อุตสาหกรรมผลิตพอลิเมอร์

กรดอิทาโคนิกใช้เป็นสารเพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่พลาสติก โดยใช้ในรูปเอสเทอร์ของกรดอิทาโคนิกกับอัลกอฮอล์สายยาว (Milsom และ Meers, 1985)

3.3 อุตสาหกรรมผลิตสี

กรดอิทาโคนิกใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตสีอะคริลิก ทำให้การเกาะติดของอะคริลิกพอลิเมอร์กับพื้นผิวดีขึ้น (Milsom และ Meers, 1985)

3.4 อุตสาหกรรมผลิตกาว

กรดอิทาโคนิกใช้เป็นส่วนผสมในกาวที่ทำจากสไตรีน-บิวทาไดอีน จะทำให้มีสมบัติในการเกาะติดดีขึ้น นิยมใช้เคลือบด้านหลังพรม (Milsom และ Meers, 1985)

3.5 อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษคุณภาพดี

การเติมกรดอิทาโคนิกในส่วนผสมของสไตรีน-บิวทาไดอีน นำมาเคลือบผิวกระดาษเพื่อให้ติดหมึกพิมพ์ดีขึ้น (Milsom และ Meers, 1985)

3.6 อุตสาหกรรมอื่น ๆ

เมื่อกรดอิทาโคนิกเกิดปฏิกิริยากับเอมีนได้ไพโรลิโดน (pyrrolidone) ซึ่งสามารถเพิ่มความข้นของสารหล่อลื่นได้ นอกจากนั้นยังใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแชมพู สารชะล้างยาปราบศัตรูพืช และทางด้านเภสัชกรรม (Christiansen, 1980 ; Milsom และ Meers,1985 ; Login, 1995)

เนื่องจากกรดอิทาโคนิกมีประโยชน์มากมาย จึงทำให้มีผู้ทำการวิจัยเกี่ยวกับกรดอิทาโคนิกทั้งในด้านกระบวนการผลิต และการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ จนถึงขั้นจดสิทธิบัตรมากมายดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอิทาโคนิก

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Kobayashi และ Tabuchi,1957a	JP 571,100	Itaconic acid.
Nubel และ Ratajak, 1962	US 3,044,941	Process for producing itaconic acid.
Kobayashi และ Nakumura, 1971	US 3,621,053	Process for recovering itaconic acid and salts thereof from fermented broth.
Cros และ Schneider, 1989	EP 341,112	Production of itaconic acid.
Green, Munk และ Barnes, 1990	US 4,925,906	Stain - resistant polymers derived from the itaconic acid useful as coating for fibers.

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอิทาโคนิก (ต่อ)

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Tabuchi,1991	JP 3,035,785	Itaconic acid preparation method.
Hughes และ Swift,1992	EP 506,246	Preparation of itaconic acid polymers.
Cros และ Schneider, 1993	US 5,231,016	Microbiological production of itaconic acid.
Takabe,Yamauchi และ Nakamura, 1993	JP 5,030,978	A selective method for itaconic acid 1 - monoester production.
Karya และ Fujiwara, 1994	JP 6,038,774	Production of itaconic acid.
Jarry และ Seraudie, 1994	FR 2,702,492	Fermentative production of itaconic acid.

กระบวนการทางชีวเคมีของการสังเคราะห์กรดอิทาโคนิก

กลไกการสังเคราะห์กรดอิทาโคนิกโดยวิธีการทางชีวภาพ (biosynthesis) มีแบบแผนที่เป็นไปได้ 3 แบบแผน คือ

1. การสังเคราะห์กรดอิทาโคนิกจากกรดซิส - อะโคนิติก (cis - aconitic acid) ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ (intermediate) ในวัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle หรือ TCA cycle) (Kinoshita, 1931)

2. การสังเคราะห์จากกรดซิตรามาลิก (citramalic acid) (Jakubowska และ Metodiewa, 1974)

3. การสังเคราะห์จาก 1,2,3 - ไตรคาร์บอกซีโพรเพน (1,2,3 - tricarboxypropane) (Shimi และ Nour El Dein, 1962)

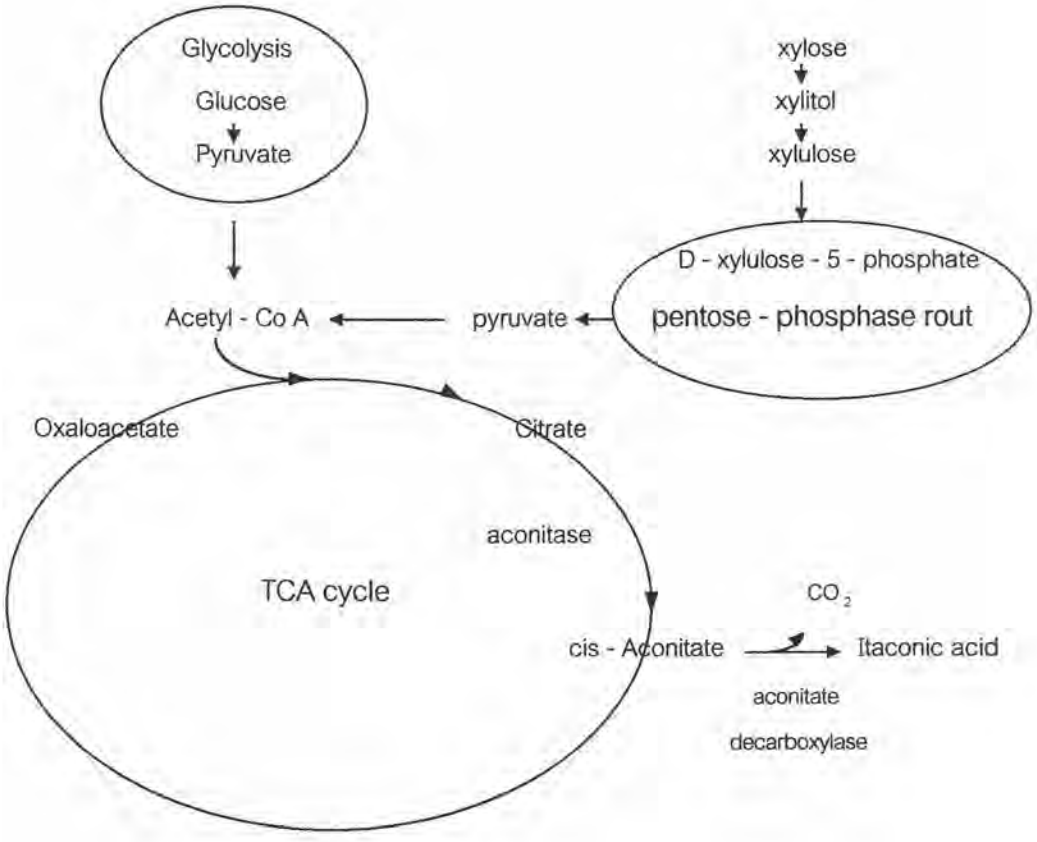
Kinoshita (1931) ได้ศึกษาการสังเคราะห์กรดอิทาโคนิกใน *A. terreus* พบว่าเกิดการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากกรดซิส - อะโคนิติกได้เป็นกรดอิทาโคนิก จากนั้นกรดอิทาโคนิกจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอิทาทาร์ทาริก (2 - ไฮดรอกซี - 2 - ไฮดรอกซีเมทธิลบิวเทนไดโออิก แอซิด)และกรดซิตรามาลิก (2 - ไฮดรอกซี - 2 - เมทธิลบิวเทนไดโออิก แอซิด) ได้มีรายงานว่าการเปลี่ยนจากกรดอิทาโคนิกไปเป็นกรดอิทาทาร์ทาริก เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์อิทาโคเนต ออกซิเดส (Arpai, 1959) แต่ Jakubowska และ Metodiewa (1974) รายงานว่าไม่พบเอนไซม์นี้ และเสนอว่ากรดอิทาทาร์ทาริก เป็นสารมัธยันต์ ในการสังเคราะห์กรดอิทาโคนิกจากกรดซิตรามาลิก

Nowakowska - Waszczuk (1973) และ Smith, Nowakowska - Waszczuk และ Anderson (1974) กล่าวว่ากรดซิตรามาลิกอาจเกิดจากการรวมตัวของกรดไพรูวิกกับอะซิติลโคเอ และยังสรุปว่าในการสังเคราะห์กรดอิทาโคนิกไม่มีเอนไซม์ในวัฏจักรเครปส์มาเกี่ยวข้อง มีรายงานสนับสนุนว่ากรดอิทาโคนิกเกิดจากการเปลี่ยนกรดไพรูวิกไปเป็นอะซิติลฟอสเฟต จากนั้นเกิดการรวมตัวกันของอะซิติลฟอสเฟต 3 โมเลกุล ได้ 1,2,3 - ไตรคาร์บอกซีโพรเพน ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะโคนิติก จากนั้นมีการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกได้เป็นกรดอิทาโคนิก ตามลำดับ (Shimi และ Nour El Dein, 1962)

กลไกการสังเคราะห์ที่เสนอโดย Kinoshita และ โดย Shimi และ Nour El Dein เหมือนกันตรงขั้นตอนสุดท้ายที่มีการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากโมเลกุลของกรดซิส-อะโคนิติก แต่มีข้อแตกต่างกันที่แหล่งของกรดอะโคนิติก คือ ตามกลไกการสังเคราะห์ของ Kinoshita แหล่งของกรดอะโคนิติกเป็นซิตริก ส่วนรายงานของ Shimi และ Nour El Dein เป็น 1, 2, 3 - ไตรคาร์บอกซีโพรเพน (Kinoshita, 1931 ; Shimi และ Nour El Dein, 1962)

Bentley และ Thiessen (1957 b) และ Winskill (1983) ศึกษาและรายงานอย่างต่อเนื่อง รายงานของเขาสนับสนุนรายงานของ Kinoshita (1931) ที่ว่า การสังเคราะห์ทางชีวภาพของกรดอิทาโคนิกจากกรดซิตริก จะผ่านกระบวนการดีไฮเดรชั่นของกรดซิตริกได้กรดอะโคนิติก และเกิดกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชั่นตามมาจนได้กรดอิทาโคนิก นอกจากนั้นยังพบเอนไซม์อะโคนิเทสซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดซิตริกเป็นกรดซิส-อะโคนิติก และเอนไซม์ซิส-อะโคนิเตตดีคาร์บอกซิเลส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดซิส-อะโคนิติกไปเป็นอิทาโคนิก ในสารสกัดจากเซลล์ของ *A. terreus*

จากกลไกการสังเคราะห์กรดอิทาโคนิกที่เสนอโดย Kinoshita (1931) และ Bentley และ Thiessen (1957 b) และ Winskill (1983) สามารถอธิบายวิถีการสังเคราะห์กรดอิทาโคนิกได้ว่า วิถีการสังเคราะห์กรดอิทาโคนิกเริ่มจากกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ของน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลเฮกโซส ได้กรดไพรูวิก (pyruvic acid) แล้วถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิติลโคเอ (acetyl CoA) แล้วเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ ดังแสดงในรูปที่ 2 กรดซิตริกซึ่งเป็นสารมัธยันต์ในวัฏจักรเครปส์ จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดซิส-อะโคนิติก ด้วยเอนไซม์อะโคนิเตส แล้วกรดนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดอิทาโคนิก โดยเอนไซม์อะโคนิเตต ดีคาร์บอกซิเลส ในกรณีของน้ำตาลเพนโตส เช่น น้ำตาลไซโลส จะถูกรีดิวซ์ได้เพนทิทอล (pentitols) ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นเพนทูโลส (pentulose) และเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ได้ ดี - ไซลูโลส - 5 - ฟอสเฟต (D - xylulose - 5 - phosphate) จากนั้นผ่านวิถีเพนโตส - ฟอสเฟต (pentose - phosphate route) ได้กรดไพรูวิกในที่สุดและผ่านกระบวนการต่อไปเช่นเดียวกับน้ำตาลเฮกโซส (Gong และคณะ, 1983) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 วิถีการสังเคราะห์กรดอิทาโคนิก (ดัดแปลงจาก Voet และ Voet (1990) และ Gong และคณะ (1983))

การสะสมกรดอิทาโคนิกจะเกิดขึ้นเมื่อมีการหยุดขั้นตอนการเปลี่ยนกรดอิทาโคนิกเป็นกรดอิทาทาร์ทาริกโดยเอนไซม์อิทาโคนิกออกซิเดส ซึ่งเอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งได้โดยสภาพความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำของการหมัก หรือจากตัวยับยั้งที่เฉพาะเจาะจง เช่น คอปเปอร์ไอออน (Lockwood และ Schweiger, 1977) หรือ แคลเซียมไอออน (Crueger และ Crueger, 1990)

การผลิตกรดอิทาโคนิก

การผลิตกรดอิทาโคนิกทำได้โดยการสังเคราะห์ทางเคมีและโดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ แต่ในปัจจุบันการผลิตกรดดังกล่าวเพื่อการค้านิยมผลิตด้วยการหมักโดยจุลินทรีย์ทั้งการหมักบนผิวหน้าอาหาร (surface process) และการหมักในอาหารเหลว (submerged process) วิธีที่นิยมใช้ในการผลิต คือ การหมักในอาหารเหลวทั้งในถังหมักที่มีการกวน (Mattey, 1992) ปฏิกรณ์แบบแอร์ลิฟท์ (air - lift bioreactor) (Okabe, Ohta และ Park,1993) เนื่องจากเป็นวิธีการผลิตที่ให้อัตราการผลิตที่สูง การผลิตกรดอิทาโคนิกต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการ

ผลิต เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ ความเป็นกรด - ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดของกล้าเชื้อที่ใช้ รวมถึงปริมาณออกซิเจนที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดอิทาโคนิก นอกจากนั้นยังต้องคำนึงถึงต้นทุนการผลิตซึ่งต้องพยายามให้มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการผลิตต่ำ แต่ได้ผลผลิตกรดสูง เช่น การใช้วัตถุดิบราคาถูก เช่น แป้งที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคสิเดส (Cros และ Schneider, 1989) กากน้ำตาล (Nubel และ Ratajak, 1962) การใช้สายใยอิสระซ้ำ (Park,Ohta และ Okabe, 1993) การใช้เซลล์หรือสายใยตรึงในการผลิตกรดซึ่งทำให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่าย สามารถนำสายใยตรึงกลับมาใช้ซ้ำได้โดยไม่ต้องเตรียมกล้าเชื้อใหม่จึงช่วยลดเวลาในการผลิตลงได้ (Kautola, 1990a ; Vassilev, Kautola และ Linko, 1992)

การตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ได้พัฒนามาจากเทคนิคการตรึงเอนไซม์ เนื่องจากการตรึงเอนไซม์มีข้อเสียหลายประการคือ การตรึงเอนไซม์ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ทำให้ค่าใช้จ่ายในการตรึงสูงขึ้น เอนไซม์ที่ตรึงแล้วไม่เสถียรเท่ากับเอนไซม์ที่มีอยู่ภายในเซลล์ ดังนั้นการตรึงเซลล์จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจเพื่อลดปัญหาดังกล่าว ซึ่งในระยะแรกของการตรึงเซลล์จะสนใจกระบวนการผลิตที่ใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์เพียงชนิดเดียว เช่น การผลิตกรดแอสพาติกโดยเอนไซม์แอสพาเตส และในระยะแรกใช้เซลล์ที่ไม่มีชีวิต ต่อมาเริ่มสนใจการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีปฏิกิริยาซับซ้อนขึ้น ซึ่งต้องมีเอนไซม์ร่วมเพื่อใช้ในปฏิกิริยานั้น ๆ เช่น การผลิตเอทานอล การผลิตอะคริลามายด์ จึงทำให้เกิดการตรึงเซลล์ที่มีชีวิตขึ้น การใช้เซลล์ตรึงจะได้ประโยชน์เมื่อเซลล์นั้นไม่มีเอนไซม์อื่นในปริมาณมากที่จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ต้องการ หรือสามารถกำจัดเอนไซม์ที่ไม่ต้องการได้ นอกจากนี้สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ต้องเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เพื่อสามารถผ่านเข้าออกจากเซลล์ที่ถูกตรึงได้ การตรึงเซลล์ยังมีข้อได้เปรียบอีกหลายประการ คือ ผลผลิตที่ได้จากกิจกรรมของเอนไซม์จากเซลล์ตรึงมีปริมาณสูง สามารถใช้ความหนาแน่นของเซลล์ตรึงต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูงได้ สามารถคงความหนาแน่นของเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ได้นานตลอดระยะเวลาการผลิต การเก็บเกี่ยวผลผลิตทำได้ง่าย และการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นเกิดได้น้อย นอกจากนี้เซลล์ตรึงยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ และใช้ในการผลิตแบบต่อเนื่องได้ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการผลิตได้วิธีหนึ่ง (Chibata, Tosa และ Sato, 1986; Brodelius และ Vandamme, 1987; Fukada, 1995)

การตรึงเซลล์นั้นไม่ใช่แนวคิดที่ค้นพบใหม่ แต่เป็นการจำลองและปรับปรุงแก้ไขจากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ เช่น จุลินทรีย์ที่ขึ้นบนใบไม้แห้งหรือบนผิวดิน ในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรมที่ใช้จุลินทรีย์โดยที่จุลินทรีย์จะเกาะติดอยู่กับผิวของแข็งหรือเกิด

ลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ บนผิวของเหลว (form film) เช่น การกำจัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมโดยกระบวนการทริกกริ้งฟิลเตอร์ (trickling filter) การผลิตเบียร์โดยยีสต์ที่เจริญบนผิวหน้าของเหลวหรือยีสต์ที่ตกตะกอนเมื่อทำการผลิต ซึ่งทำให้การเก็บเกี่ยวผลผลิตเป็นไปได้ง่าย จึงเป็นเหตุให้การตรึงเซลล์เป็นที่สนใจ (Brodelius และ Vandamme, 1987)

วิธีการตรึงเซลล์

มีการตีพิมพ์รายงานการตรึงเซลล์จุลินทรีย์หลายฉบับ แต่ยังไม่มีวิธีการใดที่เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ได้ทุกชนิด ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเลือกวิธีและภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับเซลล์แต่ละชนิด

วิธีการที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์สามารถแบ่งออกเป็นวิธีใหญ่ ๆ ได้ 2 วิธี (Fukada, 1995)

1. แอคทีฟ อิมโมบิไลเซชั่น (Active immobilization)

การตรึงเซลล์หรือสายใยโดยวิธีการนี้เกิดจากการใช้สารเคมี (chemical agent) ชนิดต่าง ๆ ช่วยทำให้เกิดการตรึงของเซลล์หรือสายใย ซึ่งมี 2 วิธี คือ

1.1 การเกิดพันธะโควาเลนต์ (covalent bonding)

การตรึงเซลล์วิธีนี้ใช้สารเคมีในการกระตุ้น (activate) วัสดุตรึงให้เกิดหมู่จำเพาะ (specific group) บนผิวของวัสดุตรึงนั้น สารที่ใช้กระตุ้นมีทั้งสารที่ทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ (cross - linking agent) เช่น กลูตารัลดีไฮด์ หรือ โทลูอีน ไดไอโซไซยาเนต (toluene diisocyanate) และสารที่ทำให้เกิดการรวมเข้ามา (coupling agent) เช่น พอลิไอโซไซยาเนต (polyisocyanate) หรือ คาร์โบไดไอไมด์ (carbodiimide) จากนั้นจึงเกิดการเชื่อมเซลล์กับหมู่จำเพาะที่อยู่บนผิวเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ เช่น หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล หรือ หมู่ฟีนอลของโปรตีน

อย่างไรก็ดีสารเคมีที่ใช้กระตุ้นวัสดุตรึงนี้จะทำให้เอนไซม์เสียความสามารถในการทำกิจกรรม (activity) และยังเป็นอันตรายต่อเซลล์อีกด้วย

1.2 การกักขังเซลล์ (entrapment in gels)

เป็นวิธีการที่กักเซลล์ไว้ภายในโครงร่างของสารพอลิเมอร์ ซึ่งโครงร่างจะต้องสามารถกักเซลล์ไม่ให้หลุดออกมาในขณะที่สารตั้งต้นและสารผลิตภัณฑ์สามารถผ่านเข้าออกได้ การตรึงเซลล์วิธีนี้เซลล์ไม่ได้เชื่อมกับเจล จึงเป็นวิธีที่ไม่รุนแรง และนิยมใช้อย่างกว้างขวางในการตรึงเอนไซม์ เซลล์และสายใยจุลินทรีย์ องค์ประกอบของเซลล์ (organelles) หรือแม้กระทั่งเซลล์ของสัตว์และพืช วัสดุตรึงที่นิยมใช้ในการตรึงโดยวิธีนี้มีหลายประเภทดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างวัสดุตรึงที่ใช้ในการตรึงเซลล์โดยวิธีกักขังเซลล์ (Fukada, 1995)

ประเภทวัสดุ	วัสดุตรึง
พอลิเมอร์สังเคราะห์	พอลิอะคริลามายด์ (polyacrylamide) พอลิเมทอะคริลามายด์ (polymethacrylamide) โฟโต้ - ครอส - ลิงค์เอเบิ้ล เรซิน พรีพอลิเมอร์ (photo - cross - linkable resin prepolymer) ยูรีเทน พรีพอลิเมอร์ (urethane prepolymer) พอลิเอทีลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) พอลิไวนีล อัลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) อีพอกซี เรซิน (epoxy resin)
พอลิแซคคาไรด์	อัลจิเนต (alginate) แคปปา - คาร์ราจีแนน (κ - carrageenan) วุ้น (agar) ไคโตแซน (chitosan)
โปรตีน	คอลลาเจน(collagen) เจลาติน (gelatin) อัลบูมิน (albumin)

การตรึงเซลล์โดยวิธีกักขังเซลล์มีข้อจำกัดบางประการ เช่น การตรึงเซลล์ในพอลิอะคริลามายด์ โมโนเมอร์ของอะคริลามายด์และสารเชื่อมไขว้ เช่น บิส (BIS) ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ จะทำให้เอนไซม์เสียความสามารถในการทำกิจกรรมไปในระหว่างการตรึงเซลล์ หรือการตรึงเซลล์ในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่า แคลเซียมอัลจิเนตจะสูญเสียความเสถียรเมื่อมีสารที่มีประจุลบ (complexing anion) อยู่ในระบบ เช่น ฟอสเฟต ซิเตรต อีดีทีเอ เป็นต้น

2. พาสซีฟ อิมโมบิไลเซชั่น (Passive immobilization)

เป็นวิธีการที่เซลล์เกิดการตรึงกับวัสดุตรึงได้เองตามธรรมชาติ มี 2 วิธี คือ

2.1 การเกาะติดบนวัสดุตรึง (adsorption)

การเกาะติดของเซลล์เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเองโดยอาศัยแรงดึงดูดทางไฟฟ้าระหว่างผิวเซลล์และวัสดุตรึง วัสดุตรึงที่ใช้ตรึง คือ เซลลูโลส เดกซ์แตรน และเรซินสังเคราะห์

2.2 เซลล์หรือสายใยเจริญภายในวัสดุตรึง (colonization)

วัสดุตรึงที่ใช้มีลักษณะเป็นรูพรุน หรือมีโครงสร้างที่เป็นร่างแหสานกันอยู่ ทนต่อสารเคมี ทนความร้อนได้ดีสามารถนำไปทำให้ปลอดเชื้อได้ การตรึงเซลล์หรือสายใยทำได้โดย เติมวัสดุตรึงในถังหมัก ทำให้ปลอดเชื้อ แล้วผ่านขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อตามปกติโดยเติมเซลล์หรือสปอร์ราลงไป เซลล์จะเจริญหรือสปอร์ราจะงอกเป็นสายใยและถูกตรึงอยู่ภายในวัสดุตรึงเองในระหว่างการเพาะเลี้ยง วัสดุตรึงที่นิยมใช้ในการตรึงโดยวิธีนี้ เช่น ชิ้นเหล็กปลอด สนิม พอลิเอสเตอร์โฟม พอลิอีเทอร์โฟม พอลิยูรีเทนโฟม ซิลิโคนโฟม พอลิไวนิล ฟอร์มัลเรซิน และเซลลูโลสที่มีรูพรุน

ตารางที่ 3 ตัวอย่างวัสดุตรึงชนิดต่าง ๆ ที่นิยมใช้ตรึงเซลล์หรือสายใยรา

วัสดุตรึง	จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
เซลลูโลส	*Saccharomyces cerevisiae*	เอธานอล	Gainer และคณะ, 1980
เซรามิค	*Acetobacter aceti*	กรดอะซิติก	Ghommidh, Navarro และ Durand, 1981
พอลิอะคริลามายด์	*Aspergillus terreus*	กรดอิทาโคนิก	Horitsu และคณะ, 1983
เส้นใยไนลอน	*Gluconobacter suboxydans*	กรดกลูโคนิก	Seiskari, Linko และ Linko, 1985
แคปปา - คาร์ราจิแนน	*Serratia marcescens*	แอล - อาร์จินีน	Fujimura และคณะ, 1984
แคลเซียมอัลจิเนต	*Gibberella fujikuroi* *S. cerevisiae*	กรดจิบเบอเรลลิก ไซลิทอล	Nava Saucedo, Barbotin และ Thomas, 1989 Roca, Meinander และ Hahn-Hägerdal, 1996
เรซินที่เชื่อมไขว้โดยแสง	*Zymomonas mobilis*	เอธานอล	Iida และคณะ, 1993
พอลิยูรีเทนโฟม โดยวิธีทำให้สายใยเจริญในวัสดุตรึง	*Aspergillus terreus*	กรดอิทาโคนิก	Vassilev และคณะ, 1992

วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุตรึงที่ใช้ในการตรึงสายใยในงานวิจัยนี้มี 2 ชนิด คือ

ชิ้นเส้นใยบวบหอม บวบหอมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Luffa cylindrica (L.) Roem* วงศ์ *Cucurbitaceae* เป็นพืชที่ชอบขึ้นในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ผลบวบหอมมีรูปร่างเรียวยาว คล้ายบวบเหลี่ยมแต่ผิวของเปลือกเรียบกว่า เมื่อผลแก่และแห้งสนิท สามารถลอกเปลือกออกได้ เส้นใยของชิ้นบวบมาใช้ประโยชน์ เส้นใยของชิ้นบวบหอมค่อนข้างหยาบและแข็ง (วิทิต วัฒนาวิบูล, 2527) การตรึงสายใยราในชิ้นเส้นใยบวบหอมจะเป็นการให้ราเติบโตอยู่บนผิวเส้นใยของชิ้นเส้นใยบวบหอม

วัสดุตรึงอีกชนิดที่ใช้ตรึงสายใยในงานวิจัยนี้ คือ พอลิยูรีเทนโฟม (PUF) ชนิดโครงสร้างเปิด ซึ่งพอลิยูรีเทนโฟมเป็นสารพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่มีหมู่ไอโซไซยาเนต (isocyanate) เป็นหมู่ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชั่น สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ ชนิดโครงสร้างแบบปิด (closed shape) ชนิดโครงสร้างแบบเปิด (opened shape) และ ชนิดโครงสร้างแบบผสม (mixed) (บรรเลง ศรานิล, 2535)

การตรึงเซลล์หรือสายใยใน PUF สามารถทำได้ 2 แบบ คือ

1. การตรึงเซลล์หรือสายใยโดยวิธีกักขังเซลล์ใน PUF

เตรียมโดยผสมสารพรีพอลิเมอร์ของพอลิยูรีเทนกับสารละลายของเซลล์ จากนั้นเติมยูเรียซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชั่นของหมู่ไอโซไซยาเนตที่ปลายทั้งสองข้างของสารพรีพอลิเมอร์เกิดโครงร่างตาข่ายของสายพอลิเมอร์และได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อิสระ ซึ่งทำให้ชิ้น PUF เกิดรูพรุน เซลล์จะถูกตรึงอยู่ในโครงร่างตาข่าย วิธีการตรึงนี้ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากมีขั้นตอนยุ่งยาก และทำให้ความเสถียรของเอนไซม์ลดลง (Klein และ Wagner, 1983; Brodelius และ Vandamme , 1987)

2. การตรึงเซลล์หรือสายใยโดยวิธีการทำให้เซลล์หรือสายใยเจริญใน PUF

ทำโดยเติมวัสดุตรึงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ทำให้ปลอดเชื้อ จากนั้นเติมเซลล์หรือสปอร์ราลงไป ทำการเพาะเลี้ยงตามปกติ เซลล์จะถูกตรึงเข้าไปใน PUF ส่วนสปอร์ราจะงอกเป็นสายใยอยู่ภายใน PUF ซึ่งมีโครงสร้างเป็นรูพรุน วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก ราคาไม่แพง วัสดุตรึงทนต่อแรงเฉือนสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ และอัตราการถ่ายเทมวลของสารตั้งต้นสูง ทำให้การผลิตสารผลิตภัณฑ์ภายในวัสดุตรึงสูงด้วย ขั้นตอนการตรึงไม่ต้องใช้สารเคมีที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ นอกจากนั้นการผลิตในระดับขยายส่วนเป็นไปได้ง่ายอีกด้วย (Fukada, 1995)

ตารางที่ 4 ตัวอย่างการใช้จุลินทรีย์ที่ตรึงใน PUF โดยวิธีทำให้เซลล์หรือสายใยเจริญภายใน PUF เพื่อผลิตสารผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ

จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
Methanogen sp.	มีเทน	Fynn และ Whitemore, 1982
Mucor ambiguus	กรดแกรมมาลิโนลีนิก	Fukada และ Morikawa, 1987
Botrycococcus braunii	ไฮโดรคาร์บอน	Bailliez และคณะ, 1988
Penicillium funiculosum	เซลลูเลส	Linko และคณะ, 1988
Rhizopus chinensis	ไลเปส	Nakashima และคณะ, 1988
Rhizopus arrhizus	กรดฟูมาริก	Kautola และ Linko, 1989
Phanerochaete chrysoporium	ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส	Capdevila, Corrieu และ Asther, 1989
Aspergillus niger	กรดซิตริก	Lee, Lee และ Chang, 1989 ; Vassilev และ Vassileva, 1990
Aspergillus terreus	กรดอิทาโคนิก	Kautola, Vassilev และ Linko, 1989 ; Vassilev และคณะ, 1992
Penicillium chrysogenum	เพนนิซิลิน	Kobayashi และคณะ, 1990
Thiobacillus ferroxidans	ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของเหล็กในรูปเฟอรัส	Armentia และ Webb, 1992
Trichoderma reesei	เซลลูเลสและไซแลนเนส	Haapala และคณะ, 1995
Rhizopus oryzae	กรดแลคติก	Sun, 1996

แบบของปฏิกรณ์ที่ใช้ในการผลิตสารผลิตภัณฑ์โดยเซลล์หรือสายใยตรึง

ปฏิกรณ์ที่ใช้ในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ด้วยเอนไซม์ตรึง เซลล์หรือสายใยตรึง มีหลายแบบ เช่น ถังหมักที่มีการกวน (stirred tank reactor) หรืออาจใช้เทคนิคฟลูอิดไดเซชั่น (fluidization) โดยอาจใช้ปฏิกรณ์แบบฟิกซ์เบด (fixed bed reactor) และปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบด (fluidized bed reactor) (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2528) อาจทำการผลิตแบบต่อเนื่อง (continuous culture) หรือแบบนำสายใยตรึงมาใช้ซ้ำ (repeated batch culture) ถังหมักที่มีการกวนนั้นนิยมใช้กันมากกับเซลล์หรือสายใยอิสระ เนื่องจากควบคุมอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างในถังหมักได้ง่ายและเกิดการกวนผสมดี แต่พบว่าเซลล์ตรึงจะถูกทำลายด้วยแรงเฉือน (shear force) ที่เกิดจากใบพัด ส่วนปฏิกรณ์แบบฟิกซ์เบด ใช้ได้กับทั้งเซลล์ตรึงที่ไม่มีชีวิตและ

เซลล์ตรึงที่มีชีวิต แต่จะมีปัญหาการอุดตันเนื่องจากการเติบโตของเซลล์ตรึง ถังหมักที่นิยมใช้ในการผลิตสารผลิตภัณฑ์โดยเซลล์หรือสายใยตรึง ซึ่งมักเป็นเซลล์ที่มีชีวิต คือ ปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบด (Fukada, 1995)

การเลือกปฏิกรณ์เพื่อใช้ในการผลิตสารผลิตภัณฑ์นั้นมีความสำคัญ และต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิต ไม่ว่าจะเป็นเซลล์หรือสายใยที่ถูกตรึง ชนิดของวัสดุตรึง ภาวะทางกายภาพต่าง ๆ รวมไปจนถึงค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ (Venkatasubramanian, Karkare และ Vieth, 1983)

ฟลูอิดไดเซชั่น คือ กระบวนการหรือวิธีการที่ของแข็งซึ่งมีรูปร่างลักษณะเป็นเม็ดหรือชิ้นสัมผัสกับของไหลแล้วเม็ดของแข็งเหล่านี้จะมีคุณสมบัติคล้ายของไหล อาจเป็นก๊าซหรือของเหลวผ่านมาทางด้านล่างของตะแกรงที่รองรับเม็ดของแข็ง ผ่านชั้นเม็ดของแข็ง แล้วไหลออกทางส่วนบนของหอทดลอง เพิ่มความเร็วของไหลขึ้นเรื่อย ๆ จนในที่สุด จะเห็นเม็ดของแข็งขยับตัวและลอยตัวขึ้นเป็นอิสระไม่เกาะติดกัน เรียกของแข็งในสถานะนี้ว่า ฟลูอิดไดเซชั่น (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2538) ฟลูอิดไดเซชั่นมี 2 ประเภท คือ

1. ฟลูอิดไดเซชั่นสองสถานะ (two-phase fluidization) ในหอทดลองประกอบด้วยของสองสถานะ คือ ของแข็งกับของไหล แบ่งเป็น 2 แบบ คือ ก๊าซฟลูอิดไดเซชั่น (gas fluidization) ประกอบด้วยของแข็งกับก๊าซ และ ฟลูอิดไดเซชั่นของเหลว (liquid fluidization) ประกอบด้วยของแข็งกับของเหลว

2. ฟลูอิดไดเซชั่นสามสถานะ (three-phase fluidization) ภายในหอทดลองประกอบด้วย ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ

ปฏิกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ ปฏิกรณ์แบบคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (glass bubble column) ซึ่งเป็นปฏิกรณ์ที่ไม่มีการกวนโดยใบกวน แต่มีการให้อากาศผ่านแผ่นกระจายอากาศ เช่น ซินเตอร์กลาส (sintered glass) ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ มีข้อดี คือ ใช้พลังงานในการดำเนินการน้อยกว่าถังหมักแบบมีใบกวน การให้อากาศเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ง่ายต่อการออกแบบและการสร้างปฏิกรณ์ นอกจากนั้นการดำเนินการและการบำรุงรักษายังไม่ยุ่งยากอีกด้วย (Gbewonyo และ Wang, 1983)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยเซลล์หรือสายใยตรึง

1. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดอิทาโคนิก

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตกรดอิทาโคนิก แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดชนิดนี้มีหลายชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลไซโลส (Mattey, 1992) น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายไม้ (wood hydrolysate) (Kobayashi,

1978) โดยทั่วไปนิยมใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากให้ผลผลิตกรดอิทาโคนิกสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่น (Elnaghy and Megalla, 1975 ; อุษา กรีอักษร, 2539) การผลิตกรดอิทาโคนิกในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เพื่อลดต้นทุนการผลิต ดังนั้นจึงใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย เช่น กากน้ำตาลอ้อย กากน้ำตาลจากหัวบีท (Nubel และ Ratajak, 1962) นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้ว ยังต้องคำนึงถึงปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมด้วย ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในการผลิตกรดอิทาโคนิกด้วยสายใยตรึงของ *A. terreus* ในวัสดุตรึงอยู่ในช่วง 6 - 14 เปอร์เซ็นต์ (Kautola และคณะ, 1989 ; Kautola, 1990a) แหล่งไนโตรเจนเป็นอีกองค์ประกอบหนึ่งที่มีความสำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งไนโตรเจนที่ใช้สามารถใช้ทั้งในรูปไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต (Ju และ Wang, 1986 ; Vassilev และคณะ,1992) แอมโมเนียมไนเตรต (Horitsu และคณะ,1983 ; Kautola และคณะ, 1991) และไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น คอร์นสตีพลิเคอร์ (corn steep liqour) (Kautola,1990b) แต่แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ คือ แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดโดยสายใยอิสระไม่ควรมีปริมาณมากนัก เพราะจะทำให้จุลินทรีย์มีการเติบโตมาก การผลิตกรดจะน้อยลง (Milsom และ Meers, 1985) อุษา กรีอักษร (2539) ได้ทดลองผลิตกรดอิทาโคนิก โดยสายใยอิสระของ *A. terreus* I10 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์เดียวกับที่ใช้ในการทดลองนี้ พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.75 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงในระดับขวดเขย่า Vassilev และคณะ (1992) พบว่าสามารถผลิตกรดอิทาโคนิกได้โดยไม่ต้องเติมแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด นอกจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแล้ว แร่ธาตุก็เป็นองค์ประกอบหนึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตกรดอิทาโคนิก เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องการแร่ธาตุทั้งเพื่อการเติบโตและการผลิตกรด แร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อการผลิตกรด ได้แก่ แมกนีเซียม แคลเซียม ส่วนทองแดง สังกะสี และเหล็ก ต้องการในปริมาณที่เหมาะสม สำหรับแมกนีเซียมจะช่วยส่งเสริมการเติบโตและการผลิตกรดโดยจะช่วยให้เชื้อรามีความทนกรดเพิ่มขึ้น และยังช่วยต้านพิษของอะลูมิเนียมในภาชนะที่ใช้ในการผลิตกรดด้วย (Lockwood และ Reeves, 1945) ส่วนแคลเซียมจะยับยั้งเอนไซม์อิทาโคนิกแอซิด ออกซิเดส ซึ่งจะเปลี่ยนกรดอิทาโคนิกไปเป็นกรดอิทาทาร์ทาริก ทำให้เกิดการสะสมกรดอิทาโคนิกขึ้น (Batti และ Schweiger, 1963 ; Riviere, Moss และ Smith, 1977 ; Crueger และ Crueger, 1990) Gyamerah (1995a) ศึกษาถึงผลของแร่ธาตุบางชนิดต่อการเติบโตของ *A. terreus* NRRL1960 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับผลผลิตกรดอิทาโคนิก พบว่า แคลเซียม สังกะสี และเหล็กในองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้การเติบโตของรามีลักษณะเป็นก้อนกลมขนาดเล็ก

สายใยราที่รวมเป็นก้อนนั้นอยู่แบบหลวม ๆ (frayed mycelial pellet) ทำให้อัตราการผลิตกรดและผลผลิตกรดสูง

2. การให้อากาศ

การให้อากาศมีความจำเป็นต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกของจุลินทรีย์ เนื่องจากการผลิตกรดนี้เป็นการหมักแบบใช้อากาศ นอกจากจะเป็นการให้ออกซิเจนแก่ระบบแล้วในปฏิกรณ์แบบที่มีการให้อากาศด้านล่าง เช่น ปฏิกรณ์แบบแอร์ลิฟท์ คอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง การให้อากาศยังทำให้เกิดการผสมผสานระหว่างจุลินทรีย์ ออกซิเจน และสารอาหารต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเติบโตและการผลิตกรดอิทาโคนิกได้ การผลิตกรดอิทาโคนิกโดยการหมักในอาหารเหลวนั้นต้องการการให้อากาศอย่างต่อเนื่องตลอดการผลิต แต่ไม่ต้องการการให้อากาศที่แรงเกินไป (Lockwood, 1979) Gyamerah (1995b) ได้ทดลองถึงผลกระทบของออกซิเจนต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยระหว่างที่ทำการผลิตกรดอิทาโคนิก ได้หยุดการให้อากาศเป็นเวลา 0 - 10 นาที พบว่า เมื่อหยุดให้อากาศตั้งแต่ 5 นาทีขึ้นไป จะทำให้การผลิตกรดอิทาโคนิกหยุดชะงัก ในขณะที่ Lockwood (1979) กล่าวว่า เวลาที่ทำให้การผลิตกรดหยุดชะงักลงสั้นเพียง 15 วินาทีเท่านั้น ทั้งนี้ช่วงเวลาที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์เช่นนี้ขึ้นกับปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในขณะนั้น ถ้ามีปริมาณต่ำกว่าความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำที่ทำให้เชื้อราสามารถผลิตกรดได้ก็จะทำให้เชื้อราหยุดการผลิตกรด เมื่อเริ่มให้อากาศอีกครั้งเชื้อจะสามารถผลิตกรดอิทาโคนิกหลังจาก 24 ชั่วโมง ในช่วงที่หยุดการให้อากาศนั้นกระบวนการสังเคราะห์สารภายในสายใยรายังคงดำเนินไปภายใต้ภาวะแวดล้อมภายนอกเซลล์ที่มีความเป็นกรด ออกซิเจนนั้นมีผลต่อการสังเคราะห์ ATP เนื่องจากออกซิเจนจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron - transport chain) ซึ่งจะได้ ATP ที่เป็นแหล่งพลังงานภายในเซลล์ และการสังเคราะห์กรดอิทาโคนิกเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) จากนั้นจะต้องส่งผ่านออกภายนอกเซลล์ซึ่งมีความเป็นกรดมากกว่าภายในเซลล์ เพื่อรักษาระดับความเป็นกรด - ด่างภายในเซลล์ให้อยู่ในช่วง 6 - 7 ซึ่งเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ ดังนั้นในการส่งผ่านกรดออกนอกเซลล์ในภาวะเช่นนี้จึงต้องใช้พลังงาน จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นทำให้ออกซิเจนมีผลต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกมาก ดังจะเห็นว่าในการทดลองการผลิตกรดอิทาโคนิกไม่ว่าจะผลิตโดยใช้สายใยอิสระหรือสายใยตรึงการศึกษาถึงอัตราการให้อากาศนั้นเป็นสิ่งสำคัญและต้องทำการศึกษา เช่น การศึกษาถึงผลของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำและความเร็วปลายใบพัดต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยอิสระของ *A. terreus* ของ Park และคณะ (1993) การผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยอิสระของ *A. terreus* ในปฏิกรณ์แบบแอร์ลิฟท์ที่มีการติดตั้งอุปกรณ์เสริม (Okabe และ

คณะ, 1993) การผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* ในพอลิอะคริลามายด์เจล (Horitsu และคณะ, 1983)

3. กล้าเชื้อ

ขนาดและอายุของกล้าเชื้อสายใยตรึงมีความสำคัญต่อการผลิตกรดอิทาโคนิก เนื่องจากกล้าเชื้อสายใยตรึงที่ใช้ในการผลิตกรดที่มีขนาดและอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมจะทำให้เวลา ที่ใช้ในการผลิตกรดลดลง และปริมาณกรดที่ผลิตได้สูงขึ้น Horitsu และคณะ (1983) ทำการทดลองผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* ในพอลิอะคริลามายด์เจล ได้ศึกษาผลของอายุของกล้าเชื้อที่มีผลต่อการผลิตกรดอิทาโคนิก โดยเปรียบเทียบอายุกล้าเชื้อ 72 96 120 และ 144 ชั่วโมง พบว่า กล้าเชื้อสายใยตรึงอายุ 120 ชั่วโมง ให้อัตราการผลิตกรดสูงสุด 20 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (0.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 150 กรัมต่อลิตร ขนาดของกล้าเชื้อหรือปริมาณเซลล์ภายในชิ้นวัสดุตรึงก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน เนื่องจากเมื่อปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการผลิตน้อยเกินไปการผลิตกรดจะช้า แต่เมื่อความหนาแน่นของเซลล์ภายในวัสดุตรึงซึ่งมีปริมาณจำกัดนั้นมากเกินไปทำให้การผ่านของอาหารและออกซิเจนเข้าไปภายในชิ้นวัสดุตรึงได้น้อยลง มีผลทำให้เซลล์ที่อยู่ลึกลงไปภายในชิ้นวัสดุตรึงนั้นเสียความสามารถในการทำกิจกรรมไปหรือตายไป (Fukada, 1995)

4. ชนิดของวัสดุตรึง

ในการตรึงเซลล์หรือสายใยสิ่งที่ต้องพิจารณาเป็นอันดับแรก คือ วัสดุตรึง ซึ่งต้องคำนึงถึงจุดประสงค์ในการนำไปใช้ผลิตสารผลิตภัณฑ์ใด ใช้กับจุลินทรีย์ชนิดใด เนื่องจากในการตัดสินใจเลือกใช้วัสดุตรึงใดนั้นมีข้อควรพิจารณามากมาย ทั้งสมบัติทางกายภาพของวัสดุตรึง เช่น ความทนทานต่อความดันที่เกิดขึ้นในปฏิกรณ์ระหว่างการผลิต พื้นที่ผิวสัมผัสต้องมาก ต้องมีรูพรุนและพื้นที่ว่างพอให้จุลินทรีย์เติบโตได้ อาหารและอากาศผ่านเข้าออกได้ซึ่งเป็นปัจจัยจำกัดที่เกิดขึ้นในการใช้เซลล์หรือสายใยตรึงในการผลิต เมื่อตรึงเซลล์หรือสายใยแล้ววัสดุตรึงจะต้องมีสมบัติที่ทนหรือไม่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์หรือสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเซลล์จุลินทรีย์ จุลินทรีย์ยังคงความมีชีวิตและมีความสามารถในการผลิตสารผลิตภัณฑ์นั้นอยู่ นอกจากนั้นค่าใช้จ่ายในการดำเนินการไม่ว่าจะเป็นราคาของวัสดุตรึง อุปกรณ์หรือสารเคมีพิเศษที่ใช้ รวมถึงความเป็นไปได้เมื่อนำไปใช้ผลิตระดับขยายส่วน ใช้ในการผลิตแบบต่อเนื่องได้ มีอายุการใช้งานสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งนำไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป (Bickerstaff, 1997) วัสดุตรึงที่ใช้ในการผลิตกรดอิทาโคนิกมีหลายชนิด เช่น พอลิอะคริลามายด์เจล

(Horitsu และคณะ, 1983) ซีไลท์ แคลเซียมอัลจิเนต (Kautola และคณะ, 1985) ไนลอน (Kautola, 1990b) พอลิยูรีเทนโฟม (Vassilev และคณะ, 1992)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง

Horitsu และคณะ (1983) เป็นนักวิจัยคณะแรกที่ตรึงสายใยของ *A. terreus* เพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิก โดยทำการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดอิทาโคนิกแบบกะ (batch cultivation) ด้วย *A. terreus* G - 026 ที่ตรึงในพอลิอะคริลามายด์เจลรูปลูกบาศก์ขนาด 4 มิลลิเมตร สำหรับการผลิตแบบกะโดยใช้สายใยตรึงซ้ำจำนวน 5 กะ ๆ ละ 24 ชั่วโมงในปฏิกรณ์แบบแอร์ลิฟท์ขนาด 400 มิลลิลิตร ปริมาตรใช้งาน100 มิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิทาโคนิก คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสและแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 150 และ 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ กล้าเชื้อสายใยตรึงอายุ 120 ชั่วโมง หนัก 20 กรัม (น้ำหนักเปียก) ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 2.5 อัตราการให้อากาศเท่ากับ 7 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 0.12 0.24 1.44 และ 3.6 กรัมต่อลิตร ในกะที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ โดยให้ผลผลิตกรดสูงสุดในกะที่ 5 เท่ากับ 4.8 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรดในกะที่ 5 เท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่เมื่อผลิตกรดแบบต่อเนื่อง โดยใช้อายุกล้าเชื้อสายใยตรึงและอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับที่ทำการทดลองแบบกะ แต่ใช้น้ำหนักกล้าเชื้อสายใยตรึงเท่ากับ 40 กรัม (น้ำหนักเปียก) อัตราการให้อากาศเท่ากับ 14 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที อัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อ (flow rate) เท่ากับ 4 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ได้อัตราการผลิตกรดเท่ากับ 0.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และไม่พบการเติบโตของสายใยตรึง จะเห็นได้ว่าสามารถใช้สายใยตรึงของ *A. terreus* ในการผลิต กรดอิทาโคนิกได้ทั้งแบบกะและแบบต่อเนื่อง โดยที่การผลิตแบบต่อเนื่องจะให้อัตราการผลิตกรดที่สูงกว่าการผลิตแบบกะ

Kautola และคณะ (1985) ได้ทดลองผลิตกรดอิทาโคนิกแบบกะโดยใช้สายใยตรึงซ้ำและแบบต่อเนื่องโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* NRRL 1960 ในวุ้น (agar) บนซีไลท์ (Celite) และในแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อตรึงสายใยในวุ้นแล้วตัดเป็นรูปลูกบาศก์ขนาด 3 มิลลิเมตรและในแคลเซียมอัลจิเนตซึ่งเป็นเม็ดทรงกลม แล้วนำมาผลิตกรดอิทาโคนิกในระดับขวดเขย่าใช้สายใยตรึงซ้ำผลิตทั้งสิ้น 18 กะ ๆ ละ 5 วัน ใช้น้ำตาลไซโลส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน สายใยที่ตรึงในวุ้นให้ผลผลิตแต่ละกะไม่คงที่ โดยกะที่ 1 ถึงกะที่ 11 ให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 5.14 7.72 4.00 2.00 2.29 2.14 3.43 3.72 5.72 9.14 และ 13.70 ตามลำดับ ให้ผลผลิตกรดสูงสุดในกะที่ 12

เท่ากับ 13.8 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรดเท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นผลผลิตกรดจะลดลง แต่สายใยที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตให้ผลผลิตกรดอิทาโคนิกสูงสุดในกะที่ 2 ซึ่งเท่ากับ 7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรด 0.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลผลิตกรดจะคงที่จนถึงกะที่ 18 จากนั้นได้ทำการผลิตกรดอิทาโคนิกแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์แพคเบดขนาด 16 x 70 มิลลิลิตร โดยใช้สายใยที่ตรึงบนซีไลท์ อาร์ - 626 ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลตั้งต้น 60 กรัมต่อลิตร) แอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราการให้อากาศ 0.7 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เวลาที่อยู่ในปฏิกรณ์ (residence time) 9 ชั่วโมง พบว่า ได้อัตราการผลิตกรดค่อนข้างคงที่ โดยได้ปริมาณกรดอิทาโคนิก 11.5 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราผลิตกรดเป็น 1.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและได้ปริมาณกรดอิทาโคนิก 5 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดเป็น 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน จะเห็นได้ว่า การใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดอิทาโคนิกจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่าเมื่อใช้น้ำตาลไซโลส และการผลิตกรดแบบต่อเนื่องโดยสายใยที่ตรึงบนซีไลท์จะมีผลผลิตและอัตราการผลิตกรดสูงกว่าการผลิตแบบกะโดยสายใยตรึงในวุ้นและแคลเซียมอัลจิเนต

Ju และ Wang (1986) ได้ทำการผลิตกรดอิทาโคนิกแบบต่อเนื่องโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* NRRL 1960 บนแผ่นเหล็กพรุนปลอดสนิมซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นลวดสานกันเป็นตาข่าย 4 ชั้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผ่นเหล็กเท่ากับ 12 เซนติเมตรซึ่งหมุนตลอดเวลาคล้ายการทำงานของระหัดวิดน้ำ โดยศึกษาถึงผลของอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเร็วของการหมุนแผ่นเหล็กพรุนปลอดสนิมที่มีสายใยตรึง และอัตราเร็วในการนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ (feed rate)ต่อปริมาณการผลิตกรด ปฏิกรณ์ที่ใช้ทำด้วยพลาสติกรูปทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14 เซนติเมตร ความยาว 24 เซนติเมตร มีความจุ 3.6 ลิตร และมีแกนเหล็กปลอดสนิมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ซึ่งมีแผ่นเหล็กพรุนปลอดสนิมที่มีสายใยตรึงจำนวน 8 แผ่น แต่ละแผ่นห่างกัน 2 เซนติเมตร ภายในปฏิกรณ์บรรจุอาหาร 1.5 ลิตร มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 3.3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน กำหนดปริมาตรของอากาศที่ให้เท่ากับ 0.1 ลิตรต่อนาที เมื่อแปรผันอุณหภูมิในช่วง 30 - 40 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 2.4 - 3.2 พบว่า อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ 36 องศาเซลเซียส และ 3.0 ตามลำดับ ส่วนความเร็วของการหมุนแผ่นเหล็กพรุนปลอดสนิมที่มีสายใยตรึงจะแปรผันในช่วง 3 - 16 รอบต่อนาที ซึ่งพบว่า ความเร็วของการหมุนไม่มีผลต่อลักษณะของสายใยที่เติบโตอยู่บนผิวหน้าของแผ่นเหล็กพรุนปลอดสนิม

แต่จะมีผลต่อการสร้างสปอร์ของราเมื่อความเร็วของการหมุนลดลงจนเท่ากับ 3 รอบต่อนาที และความเร็วของการหมุนเท่ากับ 8 รอบต่อนาทีจะให้ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 18.2 กรัมต่อลิตร สำหรับอัตราเร็วในการนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบจะแปรผันในช่วง 30 - 75 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราเร็วในการนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบจะไม่มีผลต่อปริมาณกรดอิทาโคนิกที่ผลิตได้และปริมาณสายใย แต่จะมีผลต่ออัตราการผลิตกรดซึ่งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามการเพิ่มอัตราเร็วในการนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบจนถึง 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงหลังจากนั้นอัตราการผลิตกรดจะค่อนข้างคงที่ อัตราเร็วในการนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบเท่ากับ 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงเป็นอัตราเร็วที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุด คือ 18.2 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรดเท่ากับ 0.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จะเห็นได้ว่าวัสดุตรึงและปฏิกรณ์ชนิดนี้สามารถนำมาใช้เพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกได้และให้ปริมาณที่สูง โดยต้องการการให้อากาศแก่ระบบเพียงเล็กน้อย

Kautola และคณะ (1989) ได้ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอิทาโคนิกในระดับขวดเขย่าโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* TKK 200 - 5 - 3 ในพอลิยูรีเทนโฟมรูปลูกบาศก์ขนาด 1.0 เซนติเมตร ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการแปรผันปริมาณน้ำตาลซูโครสตั้งแต่ 30 - 100 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมไนเตรตตั้งแต่ 0 - 4 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นในช่วง 1.5 - 3.0 พบว่า ภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้น้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 2.75 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3 ได้ปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุด 13.3 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรดเท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตรต่อวัน (0.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) นอกจากนั้นได้เปรียบเทียบการผลิตกรดอิทาโคนิกซ้ำโดยสายใยตรึงและสายใยอิสระจำนวน 4 ซ้ำ (5 กะ) พบว่า ผลผลิตกรดเฉลี่ยที่ได้จากสายใยตรึงเท่ากับ 9.7 กรัมต่อลิตร ส่วนผลผลิตกรดเฉลี่ยที่ได้จากสายใยอิสระมีค่าเท่ากับ 4.5 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าการผลิตกรดโดยสายใยตรึงให้ปริมาณกรดสูงกว่าการผลิตกรดโดยสายใยอิสระถึง 2 เท่า

Kautola (1990a) ทำการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* TKK 200 - 5 - 2 ในพอลิยูรีเทนโฟมรูปลูกบาศก์ทั้งการผลิตแบบกะโดยใช้สายใยตรึงซ้ำในระดับขวดเขย่าและการผลิตแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์แบบแอร์ลิฟท์และปฏิกรณ์แบบแพคเบด ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลกเป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดแบบกะโดยใช้สายใยตรึงซ้ำ 5 กะ ๆ ละ 14 วัน เมื่อแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสตั้งต้นในช่วง 50 - 200 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตอยู่ในช่วง 0.5 - 7.0 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 2.25 - 3.75 พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตกรดอิทาโคนิกสูงเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด - ด่างตั้งต้น

ต่ำและปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตน้อยในขณะที่จะต้องมีปริมาณน้ำตาลไซโลสสูง คือ ค่าความเป็นกรด - ด่างตั้งต้นเท่ากับ 2.5 แอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 1.6 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลไซโลส 174.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้ผลผลิตกรดสูงสุด 1.6 กรัมต่อลิตร ในกะที่ 4 คิดเป็นอัตราการผลิต 0.004 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยที่ผลผลิตกรดจะเพิ่มขึ้นจากกะที่ 1 จนได้ปริมาณกรดสูงสุดในกะที่ 4 จากนั้นปริมาณกรดจะลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนการผลิตแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์แบบแพคเบดขนาด 130 มิลลิลิตร ปริมาตรใช้งาน 95 มิลลิลิตร ทำการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสตั้งต้นในช่วง 50 - 200 กรัมต่อลิตรเช่นเดียวกับการผลิตแบบกะ อัตราการให้อากาศในช่วง 0 - 1.6 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที และเวลาที่อยู่ในปฏิกรณ์ในช่วง 24 - 216 ชั่วโมง พบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรด คือ ใช้น้ำตาลไซโลสตั้งต้น 50 กรัมต่อลิตร อัตราให้อากาศ 0.6 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เวลาที่อยู่ในปฏิกรณ์ 160 ชั่วโมง ให้อัตราการผลิตกรด 0.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตกรดเท่ากับ 6.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งเท่ากับ 12.4 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลไซโลสตั้งต้น ปริมาณกรดและผลผลิตกรดที่ได้จากการผลิตแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์แบบแพคเบดสูงกว่าที่ได้จากการผลิตแบบกะ โดยที่การผลิตทั้งสองแบบใช้ชิ้นพอลิยูรีเทนโฟมรูปลูกบาศก์ขนาด 1.0 เซนติเมตร ส่วนการผลิตกรดอิทาโคนิกแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์แบบแอร์ลิฟท์ ซึ่งเป็นคอลัมน์แก้วขนาด 700 มิลลิลิตร ปริมาตรใช้งาน 620 มิลลิลิตร ใช้น้ำตาลไซโลสตั้งต้น 60 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 0.8 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เวลาที่อยู่ในปฏิกรณ์ 110 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโดยใช้ชิ้นพอลิยูรีเทนโฟมรูปลูกบาศก์ขนาดต่างกัน คือ ขนาด 0.5 และ 1.0 เซนติเมตร พบว่า เมื่อใช้ชิ้นพอลิยูรีเทนโฟมขนาด 0.5 เซนติเมตรได้ปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุด 2.54 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรดเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าปริมาณกรดสูงสุดที่ผลิตได้เมื่อใช้ชิ้นพอลิยูรีเทนโฟมขนาด 1.0 เซนติเมตร ที่ได้ผลผลิตกรดเท่ากับ 0.76 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรดเท่ากับ 0.007 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงถึง 3.3 เท่า ดังนั้นชิ้นวัสดุตรึงที่มีขนาดเล็กกว่าจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่าวัสดุตรึงที่มีขนาดใหญ่กว่า และจากผลผลิตกรดแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์สองชนิดจะเห็นว่าการผลิตกรดในปฏิกรณ์แบบแพคเบดให้ปริมาณกรดสูงกว่าการผลิตกรดในปฏิกรณ์แบบแอร์ลิฟท์ อาจจะแสดงว่าความต้องการออกซิเจนเพื่อการผลิตกรดชนิดนี้มีไม่มากนัก

Kautola และคณะ (1991) ได้ทดลองการผลิตกรดอิทาโคนิกแบบกะโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* TKK200 - 5 - 1 ในพอลิยูรีเทนโฟมรูปลูกบาศก์ขนาด 1.0 เซนติเมตรโดยการใช้สายใยตรึงซ้ำในระดับขวดเขย่าจำนวน 4 กะ ๆ ละ 14 วัน ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส ผลการทดลองพบว่า ได้ปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุด 51 กรัมต่อลิตร เมื่อมีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมไนเตรต 4 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราการผลิตกรด

0.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตกรด 34 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นในการผลิตครั้งแรก เมื่อผลิตกรดเป็นจำนวน 4 กะ ได้ปริมาณกรดสูงสุดในกะที่ 4 เท่ากับ 11.4 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตกรดที่ได้จากการใช้สายใยอิสระในกะที่ 4 (1.3 กรัมต่อลิตร) ผลผลิตกรดที่ได้จากสายใยตรึงจะมากกว่าถึง 8 เท่า นอกจากนี้ยังศึกษาถึงผลกระทบของแร่ธาตุบางชนิดต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง พบว่า การเติมแมกนีเซียม แคลเซียม และทองแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกรดอิทาโคนิกได้ ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 5 กรัมต่อลิตร 10 กรัมต่อลิตร และ 13 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Vassilev และคณะ (1992) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต และค่าความเป็นกรด - ด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* TKK200 - 5 - 1 ในพอลิยูรีเทนโฟมรูปลูกบาศก์ขนาด 1.0 เซนติเมตรในระดับขวดเขย่า และผลของแอมโมเนียมไนเตรตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์แบบแพคเบด เมื่อทำการผลิตกรดอิทาโคนิกในขวดเขย่าเป็นเวลา 14 วัน โดยแปรความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นเป็น 50 - 150 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตเป็น 0 - 4 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรด - ด่างตั้งต้นเท่ากับ 1.72 - 3.75 พบว่า เมื่อไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นทำให้ผลผลิตกรดอิทาโคนิกเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังต้องการค่าความเป็นกรด - ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นด้วย โดยปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 7 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตรต่อวัน (0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 150 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด - ด่างตั้งต้นเท่ากับ 3.75 แต่เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นและการเพิ่มค่าความเป็นกรด - ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดอิทาโคนิกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยได้ผลผลิตกรดเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดเท่ากับ 0.36 กรัมต่อลิตรต่อวัน (0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 150 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตกรดแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์แบบแพคเบด ขนาด 130 มิลลิลิตร ปริมาตรใช้งาน 95 มิลลิลิตร ปริมาตรอากาศที่ให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาที่อยู่ในปฏิกรณ์เท่ากับ 190 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมไนเตรต 2.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในช่วงแรกของการผลิต (85 ชั่วโมง) ให้ปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุด 26 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรด 0.33 กรัมต่อวันต่อวัสดุตรึง 1 กรัม (3.5 กรัมต่อลิตรต่อวัน) หลังจากนั้นใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแอมโมเนียมไนเตรต (ชั่วโมงที่ 85 ถึงชั่วโมงที่ 125) จะให้ปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุด 18 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดเท่ากับ 0.227 กรัม

ต่อวันต่อวัสดุตรึง 1 กรัม จากผลการทดลองจะเห็นว่าในการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* TKK200 - 5 - 1 ในชิ้นพอลิยูรีเทนโฟมรูปลูกบาศก์ไม่จำเป็นต้องใช้แอมโมเนียมไนเตรตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนมากนัก แต่จะต้องให้ปริมาณไนโตรเจนมีสัดส่วนที่เหมาะสมกับปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้ด้วยจึงจะได้ผลผลิตกรดสูงขึ้น

จากงานวิจัยที่กล่าวแล้วข้างต้นจะเห็นได้ว่าการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยวิธีตรึงสายใยมีความเป็นไปได้ และให้ผลผลิตกรดสูง แต่วัสดุตรึงบางชนิดที่ใช้ในการตรึงเซลล์หรือสายใยมีราคาแพงหรือมีวิธีในการตรึงเซลล์ที่ยุ่งยาก ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะตรึงเซลล์หรือสายใยราในวัสดุตรึงราคาถูก หาง่าย และขั้นตอนไม่ยุ่งยาก วัสดุตรึงที่น่าสนใจ คือ พอลิยูรีเทนโฟมและชิ้นเส้นใยบวบหอม เนื่องจากราคาถูก หาได้ง่าย และมีวิธีการตรึงเซลล์ที่ไม่ยุ่งยาก จากการที่อุษา กรีอักษร สามารถคัดเลือก *A. terreus* I10 ได้จากดินในประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ. 2536 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดอิทาโคนิกได้จากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลหลายชนิด นอกจากนี้เมื่อได้ศึกษาถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่า น้ำตาลซูโครสและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่จะผลิตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เมื่อผลิตกรดดังกล่าวภายใต้ภาวะความเป็นกรด - ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ได้ผลผลิตกรด 21.31 กรัมต่อลิตร (32.29 เปอร์เซ็นต์เทียบกับแหล่งคาร์บอนตั้งต้น) (อุษา กรีอักษร,2539) ซึ่งเป็นปริมาณที่น่าสนใจและจากรายงานข้างต้นพบว่าการผลิตกรดอิทาโคนิกด้วยสายใยตรึงก็ให้ผลผลิตกรดสูงเช่นกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะผลิตกรดอิทาโคนิกโดยใช้สายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในวัสดุตรึงที่แตกต่างกัน คือ พอลิยูรีเทนโฟมซึ่งเป็นตัวแทนของวัสดุสังเคราะห์และชิ้นเส้นใยบวบหอมซึ่งเป็นตัวแทนของเส้นใยจากธรรมชาติ การตรึงสายใยในวัสดุตรึงทั้งสองชนิดนี้ใช้วิธีเดียวกัน คือ พาสซีฟ อิมโมบิไลเซชั่น โดยที่การตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมเป็นแบบที่ให้สายใยเกาะติดบนวัสดุตรึง (adsorption) แต่การตรึงในชิ้นพอลิยูรีเทนโฟมเป็นแบบที่ให้สายใยเจริญภายในวัสดุตรึง (colonization) รวมทั้งหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการตรึงสายใยและการผลิตกรดอิทาโคนิกทั้งในระดับขวดเขย่าและในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง และใช้สายใยตรึงซ้ำในการผลิตกรดอิทาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยใช้สายใยตรึงของ *Aspergillus terreus* I10 ในพอลิยูรีเทนโฟมและเส้นใยจากพืชในระดับขวดเขย่าและในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column) รวมทั้งการใช้สายใยตรึงซ้ำในการผลิตกรด

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการตรึงสายใยและการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงในเส้นใยพืชในระดับขวดเขย่า

2. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดอิทาโคนิกด้วยสายใยตรึงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างโดยใช้ทั้งสายใยตรึงในพอลิยูรีเทนโฟมและเส้นใยจากพืช

3. ศึกษาการใช้สายใยตรึงซ้ำในการผลิตกรดอิทาโคนิก