บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์ ของแบคทีเรีย 5 ชนิดที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว ได้แก่ *Bacillus licheniformis* ATCC 21667 (Sardinas and Conn, 1973), *Bacillus subtilis* ATCC 21610(Oomori and Suzue, 1973), *Brevibacterium flavum* ATCC 21682, *Achromobacter nucleoacidoves* ATCC 21683 และ *Corynebacterium fascians* ATCC 21684 (Suzuki *et al*, 1974) นำแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดมาเปรียบเทียบการเจริญในอาหาร BM ที่เพิ่มปริมาณน้ำตาลในอาหารจากเดิม 1 กรัมต่อลิตรเป็น 5 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์จากเดิม 1 กรัมต่อลิตรเป็น 4 กรัมต่อลิตร พบว่า *Bacillus subtilis* ATCC 21610, *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 และ *Bacillus licheniformis* ATCC 21667 เจริญได้ดีกว่า *Achromobacter nucleoacidoves* ATCC 21683 และ *Corynebacterium fascians* ATCC 21684 เนื่องจากน้ำตาลอาจเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญสำหรับแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ เพราะรายงานการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรียทั้งสองใช้แหล่งคาร์บอนเป็นนอร์มอลพาราฟิน (Suzuki *et al*, 1974) เนื่องจาก *B. subtilis* ATCC 21610 และ *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 มีการเจริญดีกว่า *B. licheniformis* ATCC 21667 ในอาหารเตรียมหัวเชื้อ จึงนำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Bacillus subtilis* ATCC 21610 มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวสูงกว่า *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 โดยสามารถผลิตกรดมะนาวได้ประมาณ 45 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง

นำ *B. subtilis* ATCC 21610 มาศึกษาการผลิตกรดมะนาวในอาหาร BM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ พบว่าเริ่มมีการผลิตมากขึ้นที่ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก และมีการผลิตมากขึ้นเรื่อยๆ จนที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก (120 ชั่วโมง) สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 20.24 กรัมต่อลิตร จากผลผลิตกรดมะนาวจากแป้งที่ผ่านการย่อยแล้ว พบว่าให้ผลการผลิตต่ำกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลตรงกับที่ Shah และคณะ (1993) และประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ศึกษาถึงการใช้แป้งที่ผ่านการย่อยแล้วในการผลิตกรดมะนาวโดย *Yerrowia lipolytica* และ *Candida oleophila* C-73

ตามลำดับ พบว่าให้ผลการผลิตต่ำกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งอาจเนื่องมาจากสารเจือปนอื่นๆ ในแป้งที่ผ่านการย่อยแล้ว มีผลทำให้เชื้อผลิตกรดมะนาวลดลง ในการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาว เริ่มจากการศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว เนื่องจาก Mckay และคณะ (1994) และ Sokolov และคณะ (1996) รายงานว่าการผลิตกรดมะนาวจะเริ่มผลิตหลังจากแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้หมดแล้ว และจากรายงานของ Suzuki และคณะ (1974) ใช้สารสกัดจากยีสต์ 1 กรัมต่อลิตรในการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรีย แต่อาหาร BM ที่ใช้นั้นมีสารสกัดจากยีสต์อยู่ถึง 4 กรัมต่อลิตรอาจมากเกินไปที่จะใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตกรดมะนาว จากการทดลองพบว่า *B. subtilis* ATCC 21610 สามารถผลิตกรดมะนาวในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตร ที่ 72 ชั่วโมง สามารถผลิตได้เพียง 12.97 กรัมต่อลิตรเท่านั้น แต่เมื่อไม่เติมสารสกัดจากยีสต์สามารถผลผลิตได้สูงถึง 25.30 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีแหล่งไนโตรเจนอีกชนิดหนึ่งคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งเป็นอนินทรีย์ไนโตรเจน พบว่าต้องใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มขึ้นจากเดิมที่ใช้ 1.30 กรัมต่อลิตรเป็น 2 กรัมต่อลิตรจึงจะให้ผลการผลิตกรดมะนาวสูงที่สุด เท่ากับ 28.51 กรัมต่อลิตรที่ 72 ชั่วโมง แสดงว่า *B. subtilis* ATCC 21610 สามารถใช้อนินทรีย์ไนโตรเจนได้ดีกว่าอินทรีย์ไนโตรเจน และสารเสริมต่างๆ ในสารสกัดจากยีสต์อาจไม่จำเป็นต่อการผลิตกรดมะนาวของแบคทีเรียดังกล่าว สำหรับผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดมะนาว เนื่องจากมีรายงานการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรียว่าสามารถผลิตกรดมะนาวได้ที่อุณหภูมิ 28 , 30 และ 37 องศาเซลเซียส (Sardinas and Conn, 1973; Suzuki *et al*, 1974) ในการทดลองจึงแปรผันอุณหภูมิเป็น 5 ระดับคือ 28, 30, 33, 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 28 เป็น 37 องศาเซลเซียส ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของ *B. subtilis* ATCC 21610 เพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวลดลง ซึ่งตรงกันข้ามกับการผลิตกรดมะนาวในยีสต์ ดังที่สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ (2539) รายงานว่ายีสต์ *Candida oleophila* NNU-48 ให้ผลผลิตที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียมากกว่ายีสต์จึงทำให้สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีกว่า ดังนั้นจึงใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับปัจจัยอื่นๆ ต่อไป การผลิตกรดมะนาวจากการทดลองที่ผ่านมาใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตรทำให้มีน้ำตาลเหลือหลังการหมักอยู่มาก (20 กรัมต่อลิตร) จึงลดระดับความเข้มข้นน้ำตาลเป็น 75 กรัมต่อลิตร พบว่าผลการผลิตกรดมะนาวที่ได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรมาก จึงยังใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 100 กรัมต่อลิตรต่อไป เนื่องจากแมกนีเซียมเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ในวัฏจักรเครบส์ ได้แก่ ไอโซซิเทรตดีไฮโดรจีเนส และ 2-ออกโซกลูตาเรทดีไฮโดรจีเนสคอมเพล็กซ์ ในการทดลองพบว่าเมื่อมีปริมาณแมกนีเซียม

ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเพิ่มขึ้น (0 - 0.25 กรัมต่อลิตร) ปริมาณกรดมะนาวเพิ่มขึ้น แต่เมื่อปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตมีมากกว่า 0.25 กรัมต่อลิตร (ระดับที่ใช้อยู่เดิม) การผลิตกรดมะนาวจะลดลง สำหรับผลของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตนั้น เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวและแหล่งฟอสฟอรัสที่นิยมคือโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในการทดลองพบว่าปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมคือ 0.3 กรัมต่อลิตร โดยจะให้ผลผลิตกรดมะนาวเป็น 45.35 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวของ *B. subtilis* ATCC 21610 มาก และที่ปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมากกว่า 0.3 กรัมต่อลิตร จะให้กรดมะนาวลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากฟอสเฟตที่มากเกินมีผลส่งเสริมการเจริญแต่จะลดการผลิตกรดมะนาว (Miall, 1978) ผลของเฟร์ริกคลอไรด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในสูตรอาหาร แม้ว่าจะมีรายงานว่าในการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้น เหล็กจะทำให้กรดไอโซซิทริกเพิ่มมากขึ้นและกรดมะนาวลดลง (Furukawa, 1977) แต่ Takayama และคณะ (1975) รายงานว่าสายพันธุ์กลายของยีสต์ *Candida zeylanoides* เจริญได้ดีในอาหารที่มีเหล็กซัลเฟตปริมาณ 0.2-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าที่ปริมาณ 0.02 กรัมต่อลิตรซึ่งเป็นปริมาณที่ใช้อยู่เดิมให้ผลการผลิตดีที่สุด และในอาหารที่ไม่มีเฟร์ริกคลอไรด์อยู่เลยก็ให้ผลการผลิตน้อยกว่า และจากการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีพบว่าเหล็กไม่มีผลทำให้มีการสะสมของกรดไอโซซิทริก อาจเนื่องมาจากการที่ *B. subtilis* ATCC 21610 สามารถเปลี่ยนไอโซซิทริกเป็นกรดมะนาวได้ เพราะ Oomori และคณะ(1973) รายงานว่าสามารถผลิตกรดมะนาวได้ถึง 58.6 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในอาหารที่มี 0.3% กลูโคสและ 6% ไอโซซิทริก สำหรับปริมาณสารควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งที่ใช้ในการทดลองคือ แคลเซียมคาร์บอเนตนั้น พบว่าปริมาณที่ใช้อยู่คือ 50 กรัมต่อลิตรให้ผลการผลิตกรดมะนาวดีที่สุด และสามารถควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างไว้ที่ 7.0 ได้ตลอดการทดลอง (ที่ 72 ชั่วโมง) จะเห็นได้ว่าปริมาณองค์ประกอบในอาหารทุกองค์ประกอบมีความสำคัญต่อการผลิตกรดมะนาวทั้งสิ้น หลังจากที่ได้ภาวะที่เหมาะสมแล้วนำมาทดลองเปรียบเทียบผลการผลิตกรดมะนาวอีกครั้งกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมที่ยังไม่ได้ปรับปรุง พบว่าให้ผลการผลิตกรดมะนาวต่างกันมาก ประมาณ 33 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมักเท่ากันที่ 72 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อคิดเป็นร้อยละของการผลิตกรดมะนาวเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป สามารถผลิตได้ประมาณร้อยละ 60 จากการศึกษาการผลิตกรดมะนาวเมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมแล้วในระดับขวดเขย่าพบว่า เริ่มมีการผลิตกรดมะนาวมากขึ้นที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ซึ่งเร็วกว่าภาวะที่เดิมที่ยังไม่ได้ทำการปรับปรุงให้เหมาะสมถึง 24 ชั่วโมง โดยสามารถผลิตกรดมะนาวได้มากกว่า ความสามารถในการใช้น้ำตาลดีขึ้น แม้จะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่า และยังสามารถควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างไว้ที่ 7.0 ได้

ตลอดการทดลองอีกด้วย และเมื่อนำภาวะดังกล่าวมาทดลองผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรพบว่าการผลิตกรดมะนาวจะเร็วขึ้นโดยเริ่มมีการสะสมมากขึ้นที่ชั่วโมงที่ 16 ของการหมัก และที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก (72 ชั่วโมง) สามารถผลิตกรดะนาวได้ 48.93 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรดมะนาวจาก *B. subtilis* ATCC 21610 ไม่มีปัญหาจากเกี่ยวกับการหนืดของน้ำหมักที่ได้จากการทดลองด้วย ซึ่งเป็นปัญหามากในการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

จากรายงานการผลิตกรดมะนาวโดย *B. subtilis* ATCC 21610 (Oomori and Conn, 1973) สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 58.6 กรัมต่อลิตรจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.3% กลูโคสและ 6% ไอโซซิทริก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 39 ชั่วโมง ซึ่งสามารถผลิตได้มากกว่าที่งานวิจัยนี้ผลิตได้และใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยกว่าด้วย เนื่องมาจากในการทดลองของ Oomori และคณะ เป็นการเปลี่ยนไอโซซิทริกมาเปลี่ยนเป็นกรดมะนาวโดยใช้แบคทีเรียดังกล่าว ไม่ได้เป็นการผลิตกรดมะนาวจากน้ำตาลโดยตรง สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการผลิตกรดมะนาวจากน้ำตาลที่ได้จากแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์และใช้อาหารที่มีราคาถูก คืออาหาร BM เมื่อเริ่มต้นศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากอาหารและมีแหล่งคาร์บอนดังกล่าว ที่ 72 ชั่วโมงของการหมัก สามารถผลิตกรดมะนาวได้เพียง 13 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถผลิตได้เพิ่มขึ้นเป็น 46 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าเดิมถึง 3.5 เท่า โดยที่ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากงานวิจัยสรุปได้ว่าในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย น้ำตาลที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์ 100 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.25 กรัม, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.30 กรัม, เฟร์ริกคลอไรด์ 0.02 กรัม, แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 0.07 กรัม และแคลเซียมคาร์บอเนต 50 กรัม เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จากข้อมูลผลการทดลองทั้งหมด แม้ว่าในการผลิตกรดมะนาวของแบคทีเรียนั้นจะใช้เวลาในการเตรียมหัวเชื้อและระยะเวลาในการหมักน้อยกว่ายีสต์ และอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงแม้จะสูงกว่า คือสามารถเลี้ยงเพื่อใช้ในการผลิตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งในยีสต์นั้นอุณหภูมิที่สูงยังเป็นปัญหา เพราะที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสมีผลทำให้การผลิตกรดมะนาวของยีสต์ *Candida oleophila* ต่ำลงมาก (สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ, 2539) แต่เมื่อนำผลผลิตที่ได้เทียบกับยีสต์แล้วถือว่ายังให้ผลผลิตน้อยกว่า และปริมาณน้ำตาลที่ใช้ถ้ามีความเข้มข้นมากจะส่งผลให้การผลิตกรดมะนาวลดลงอีกด้วย แต่ยีสต์สามารถใช้ปริมาณน้ำตาลความเข้มข้นสูงถึง 220 กรัมต่อลิตรได้ จากข้อสรุปดังที่กล่าวมาแล้วทำให้ *B. subtilis* ATCC 21610 ไม่น่าที่จะเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากอาจจะไม่เป็นประโยชน์ในด้านการลดต้นทุนการผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ ตามที่ได้คาดหวังเอาไว้ เนื่องจากแม้ว่าจะสามารถลดต้นทุนในด้านการควบคุมอุณหภูมิถังหมักได้ แต่ผลผลิตกรดมะนาวยังมีปริมาณน้อยกว่าคือได้ประมาณ 39 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตที่ได้จากยีสต์ (เชาวรีย์

เรืองวิไลทรัพย์, 2539) สำหรับแนวทางการพัฒนาการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรีย หากต้องการให้ *B. subtilis* ATCC 21610 มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวมากขึ้น อาจต้องทำการปรับปรุงพันธุ์ และปรับปรุงกระบวนการสำหรับการหมักต่อไป