บทที่ 1

บทนำ

ประวัติความเป็นมา

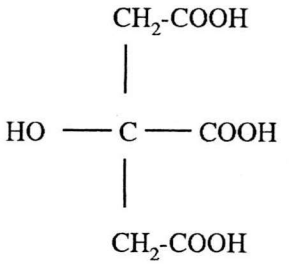
กรดมะนาว (citric acid) หรือกรด 2-ไฮดรอกซี-1,2,3-โพรเพนไตรคาร์บอกซิลิก เป็นกรดอินทรีย์ที่สำคัญ พบทั่วไปในพืชและสัตว์ พบมากในผลไม้หลายชนิด เช่น ผลไม้ตระกูลส้ม สับปะรด ลูกแพร์ ลูกพีช ผลมะเดื่อ เป็นต้น Scheele สามารถสกัดแยกและตกผลึกกรดมะนาวได้เป็นครั้งแรกจากน้ำมะนาวในปี ค.ศ. 1784 (อ้างถึงใน Kubicek and Rohr,1986) การผลิตกรดมะนาวเป็นการค้าในระยะแรก ๆ นั้น จะผลิตจากน้ำผลไม้ โดยการตกตะกอนสารละลายของกรดมะนาวในน้ำผลไม้ในรูปของเกลือแคลเซียมซิเตรต เรียกกรดมะนาวที่ผลิตโดยวิธีนี้ว่า natural citric acid เพื่อให้แตกต่างจากกรดมะนาวที่ได้จากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ (fermentation citric acid) แต่การผลิตกรดมะนาวจากน้ำผลไม้ได้ผลผลิตต่ำ ต้องใช้ผลไม้ 30-40 ตัน จึงจะได้กรดมะนาว 1 ตัน (อ้างถึงใน Rohr and Kubicek, 1980) ประกอบกับความต้องการกรดมะนาวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้การผลิตกรดมะนาวธรรมชาติไม่เพียงพอต่อความต้องการและมีราคาสูงขึ้นทำให้มีผู้คิดค้นวิธีการอื่น ๆ เช่น ในปี 1880 Grimoux และ Adams ค้นพบการสังเคราะห์กรดมะนาวจากกลีเซอรอล แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสมเนื่องจากต้นทุนสูง ต้องใช้ปฏิกิริยาเคมีหลายขั้นตอน ใช้สารที่เป็นอันตรายและให้ผลผลิตไม่คุ้มค่า (Grimoux and adams, 1880 อ้างถึงใน Mattey,1992) ต่อมาในปี ค.ศ. 1893 Wehmer ค้นพบการผลิตกรดมะนาวโดยจุลินทรีย์เป็นครั้งแรก โดยพบว่าเชื้อรา 2 ชนิดคือ Mucor และ Citromyces (ปัจจุบันคือ Penicillium) สามารถผลิตกรดมะนาวจากอาหารที่มีซูโครสเป็นองค์ประกอบ(อ้างถึงใน Marison,1988) แม้ว่ายังไม่สามารถผลิตกรดมะนาวเป็นการค้าได้ แต่การค้นพบนี้ก็นำไปสู่งานวิจัยที่สำคัญ ๆ ต่อมา ในปีค.ศ. 1917 Currie ได้รายงานการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา Aspergillus niger ใช้การหมักในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ ๆ ซึ่งให้ผลผลิตสูงและคุ้มค่า การค้นพบนี้ทำให้สามารถผลิตกรดมะนาวได้ในระดับอุตสาหกรรม (อ้างถึงใน Presscott and Dunn,1959 ; Kubicek and Rohr,1986) โดยโรงงานแห่งแรกที่ใช้เชื้อรา Aspergillus niger ถูกก่อตั้งในประเทศเบลเยียม ในปี 1919 หลังจาก

นั้นได้มีการก่อตั้งโรงงานอีกหลายแห่งในยุโรป ใช้วิธีการหมักบนผิวอาหารเหลว (Surface culture method) โดยใช้ซูโครสและกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบและต่อมาได้พัฒนามาเป็นกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว (Submerged culture process) ประมาณปี ค.ศ. 1940 (อ้างถึงใน Rohr and Kubicek,1980; Mattey,1992)

การผลิตกรดมะนาวโดยจุลินทรีย์นั้นนอกจากเชื้อราแล้วยังพบว่าแบคทีเรียและยีสต์หลายจีนัส ก็สามารถผลิตกรดมะนาวได้เช่นกัน Wieland และ Sanderhoff ได้รายงานการผลิตกรดมะนาวโดยใช้ยีสต์เป็นครั้งแรกในปีค.ศ. 1932 ซึ่งเป็นการผลิตกรดมะนาวจากอะซิเตต (อ้างถึงใน Cartledge, 1987) ต่อมาประมาณปี ค.ศ. 1965 ได้มีการพัฒนาการผลิตกรดมะนาวจากยีสต์โดยใช้การหมักในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตและนอร์มัล-อัลเคน (อ้างถึงใน Mattey,1992) สำหรับแบคทีเรียนั้นเนื่องจากให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์และรา จึงไม่ได้รับความสนใจที่จะพัฒนาสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรม (Marison,1988)

<u>คุณสมบัติของกรดมะนาว</u>

กรดมะนาวมีชื่อทางเคมีว่า กรด 2-ไฮดรอกซี-1,2,3-โพรเพนไตรคาร์บอกซิลิก เป็นกรดอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอมใน 1 โมเลกุล มีหมู่คาร์บอกซิล 3 หมู่ และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 1



<u>รูปที่ 1</u> สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว

กรดมะนาวที่อยู่ในรูปที่ปราศจากน้ำ (anhydrous citric acid) มีสูตรโมเลกุล $C_6H_8O_7$ น้ำหนักโมเลกุล 192.13 ผลิตได้จากการตกผลึกสารละลายเข้มข้นของกรดมะนาวในขณะที่ร้อน (อุณหภูมิสูงกว่า 36.6 องศาเซลเซียส) มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 153 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นเท่ากับ 1.665 ส่วนกรดมะนาวชนิดที่มีน้ำอยู่ 1 โมเลกุล (citric acid monohydrate) มีสูตรโมเลกุล $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ น้ำหนักโมเลกุล 210.14 ได้จากการตกผลึกสารละลายที่เย็น (อุณหภูมิ

ต่ำกว่า 36.6 องศาเซลเซียส) มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส กรดมะนาวมีค่า pK ที่ 25 องศาเซลเซียสดังนี้ pKa_1 = 3.128, pKa_2 = 4.761 และ pKa_3 = 6.396 ลักษณะทั่วไปเป็นผลึกสีขาวมีรสเปรี้ยว มีความเป็นพิษต่ำย่อยสลายได้ง่าย ละลายได้ดีในน้ำ โดยขึ้นกับอุณหภูมิ อุณหภูมิยิ่งสูงก็จะละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น (Bouchard and Merritt,1979)

มาตรฐานของกรดมะนาว

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางเคมีตามมาตรฐานของกรดมะนาว

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด	
		กรดซิตริกโมโนไฮเดรต	กรดซิตริกอันไฮดรัส
1	ความบริสุทธิ์ $C_6H_8O_7$ คำนวณในสภาพแห้ง ร้อยละ	99.5 ถึง 101.0	99.5 ถึง 101.0
2	น้ำ ร้อยละ	7.5 ถึง 8.8	ไม่เกิน 0.5
3	กากที่เหลือจากการเผา ร้อยละ ไม่เกิน	0.05	0.05
4	ออกซาเลต มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	350	350
5	ซัลเฟต มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	150	150
6	สารหนู มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	3	3
7	โลหะหนัก (คำนวณเป็นตะกั่ว) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	10	10
8	แบเรียม	สารละลายตัวอย่างต้องไม่ขุ่นกว่าสารละลายมาตรฐานสอบเทียบ	
9	แคลเซียม มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	200	200
10	เหล็ก มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
11	คลอไรด์ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
12	สารที่สลายให้คาร์บอนได้ง่าย (readily carbonizable substance)	สีของสารละลายตัวอย่างต้องไม่เข้มกว่าสีของสารละลายสีมาตรฐาน	

ที่มา พระราชบัญญัติมาตรฐานอุตสาหกรรม (กรดซิตริก)

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

ยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตกรดมะนาวได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Candida parapsilosis (Omar and Rehm , 1980) , Candida utilis (Cassio and Leao, 1991) , Saccharomyces lipolytica(Kim and Roberts,1990) Candida sp. , Hansenula sp. , Pichia sp. , Debaromyces sp. , Torulopsis sp. , Kloeckera sp. , Trichosporon sp. , Saccharomysis sp. , Rhodotorula sp. , Sporobolomysis sp. , Zygosaccharomysis sp. (Marison , 1988) เป็นต้น ปัจจุบันการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ ได้รับความสนใจมากขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากยีสต์มีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา ได้แก่ ยีสต์สามารถใช้สารแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดทำให้มีโอกาสเลือกสับสเตรทที่เหมาะสมที่สุด ยีสต์เจริญเร็วกว่าราทำให้ใช้เวลาในการหมักน้อยกว่า การเพาะเลี้ยงยีสต์ทำได้ง่ายกว่าราและสามารถพัฒนาการผลิตเป็นแบบกระบวนการต่อเนื่องได้ (Marison,1988) แต่การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์มีข้อเสียที่สำคัญคือ มักพบปัญหาการปนเปื้อนของกรดไอโซซิตริก ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ ตลอดจนหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้กรดมะนาวปริมาณมากแต่มีกรดไอโซซิตริกเพียงเล็กน้อย

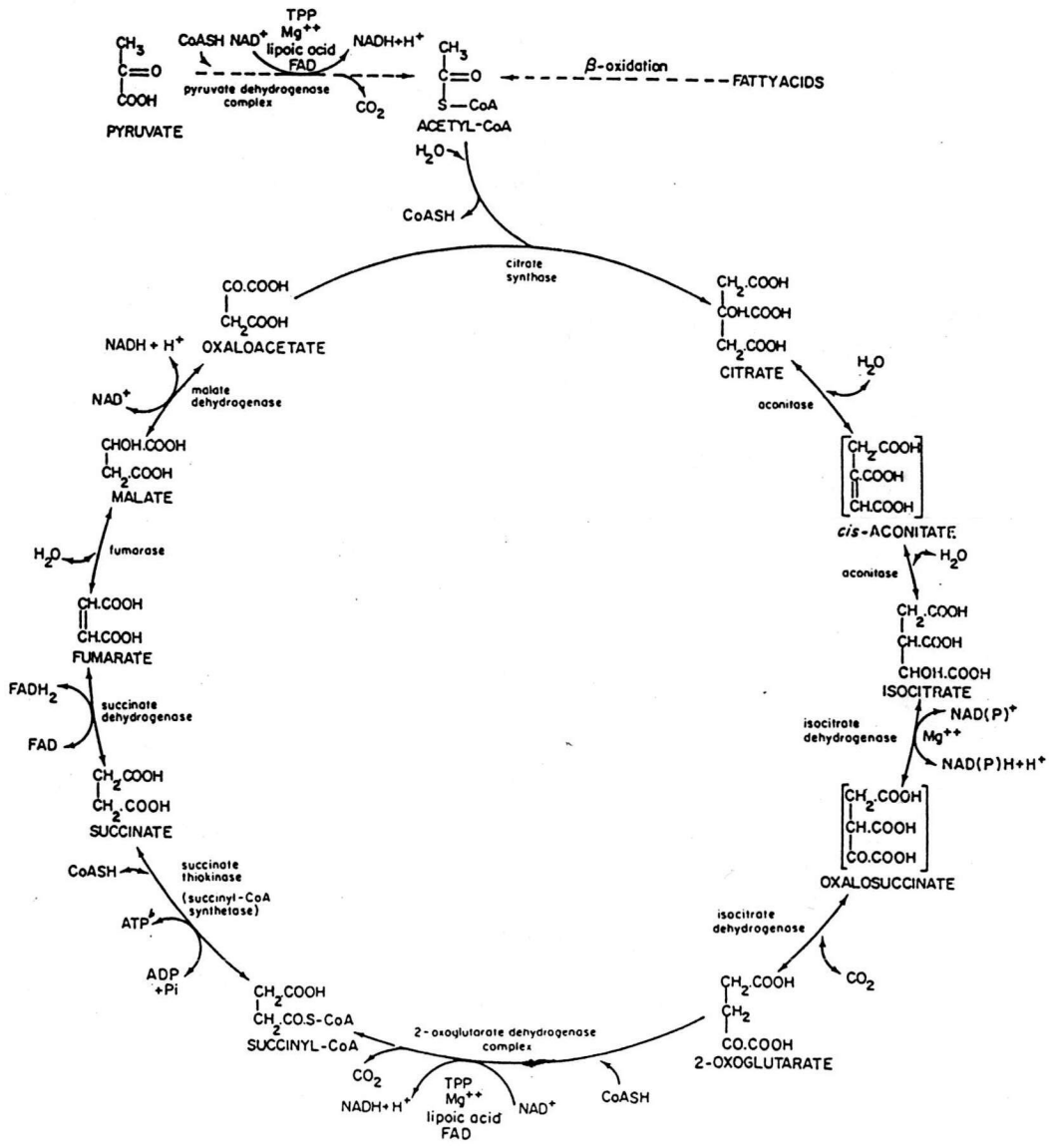
กระบวนการหมักสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้ยีสต์ เป็นกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลวเนื่องจากให้ผลผลิตสูง ใช้แรงงานต่ำอีกทั้งใช้พื้นที่น้อยและสามารถควบคุมภาวะต่าง ๆ ระหว่างการหมักได้ดี โดยใช้อุปกรณ์ที่ทันสมัยและใช้เทคโนโลยีการผลิตขั้นสูง ถังหมักที่ใช้มีหลายแบบได้แก่ ถังหมักแบบหอสูง (tower fermentor) ถังหมักแบบกวน (stirred tank fermentor) (Rohr and Kubicek,1983) และถังหมักแบบแอร์ลิฟท์ (air-lift fermentor)(Mattey,1992) ซึ่งวัสดุที่ใช้ทำถังหมักต้องเป็นเหล็กกล้าทนการกัดกร่อนของกรดได้ดี ระหว่างการหมักจะต้องควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ให้เหมาะสมเช่น ในเรื่องของอุณหภูมิ, การกวน ค่าความเป็นกรดด่างและการกำจัดฟอง เป็นต้น

รายงานการผลิตกรดมะนาวโดยใช้ยีสต์ส่วนใหญ่ใช้การหมักแบบแบทช์ เนื่องจากสามารถป้องกันการปนเปื้อนได้ง่าย การหมักแบบอื่น ๆ ก็มีรายงานไว้เช่นกันคือการหมักแบบแบ่งเติมสารอาหารบางอย่าง (fed-batch fermentation)(Rane and Sims,1995) การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation)(Aiba and Matsuoka,1979; Enzminger and Asenjo,1986; Klasson, Clausen and Gaddy,1989) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์โดยใช้คาร์ราจิแนนและอัลจิเนต เป็นต้น (Kautola et al.,1991;Rymowicz et al.,1993)

ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

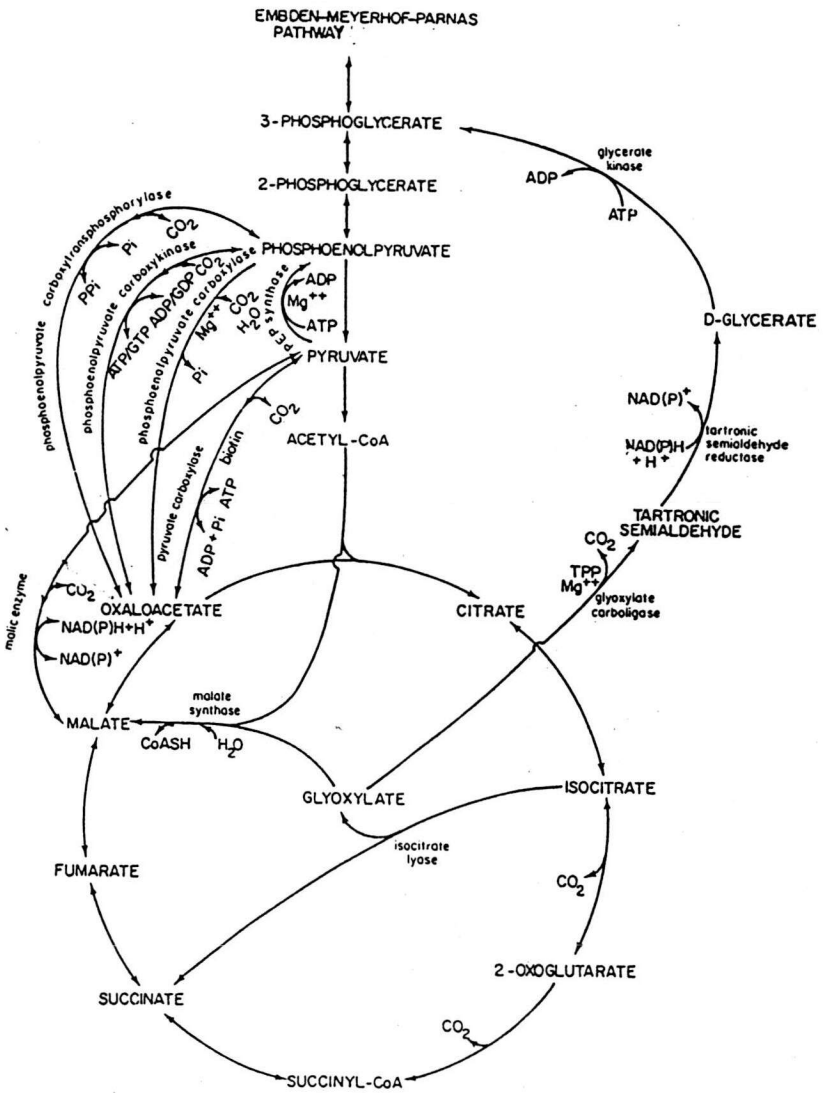
กรดมะนาวเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle หรือ Tricarboxylic acid cycle หรือ citric acid cycle) ซึ่งเกิดในไมโตคอนเดรีย ในภาวะปกติจะถูกหลั่งออกนอกเซลล์ในปริมาณเล็กน้อย ดังนั้นถ้ากรดชนิดนี้ถูกผลิตขึ้นในปริมาณสูง ย่อมแสดงถึงความไม่สมดุลของเมตาบอลิซึม และความบกพร่องของจีนส์ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์บางชนิดในวิถีดังกล่าว (Goldberg , Peleg ,and Rokem,1991) การผลิตและสะสมกรดมะนาวจะถูกควบคุมโดยเอนไซม์หลัก ๆ คือซิเตรตซินเธส อะโคนิเตส และไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส ในช่วงของการผลิตกรดมะนาว เอนไซม์ 2 ชนิดหลังจะมีกิจกรรมในระดับต่ำ ในขณะที่เอนไซม์ชนิดแรกมีกิจกรรมในระดับสูง (Ermakova et al. , 1986)ชักนำให้เกิดการรวมตัวของอะซิทิลโคเอ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 2 อะตอมกับออกซาโลอะซิเตต ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 4 อะตอมได้จากไพรูเวท หรือจากฟอสโฟอีนอลไพรูเวท หรือจากวัฏจักรเครปส์เอง เกิดเป็นกรดมะนาวซึ่งมีคาร์บอน 6 อะตอม และเมื่อกรดมะนาวสะสมในปริมาณมากขึ้น ๆ ก็จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเตส และไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส เพื่อเปลี่ยนแปลงกรดมะนาวเป็นสารตัวกลางตัวอื่น ๆ ในวัฏจักรต่อไป (Kubicek and Rohr,1986) ดังนั้น การจะทำให้ได้กรดมะนาวมาก ๆ จึงต้องหาทางชะลอการทำงานของวัฏจักรไว้ที่การผลิตกรดมะนาวโดยลดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสอง ซึ่งสำหรับเอนไซม์อะโคนิเตสอาจทำได้โดยให้มี Fe^{2+} ในความเข้มข้นต่ำ ๆ หรือใช้สารยับยั้ง เช่น ฟลูออโรอะซิเตต (Akiyama et al., 1973 ; Cartledge,1987;Tani,Sakai and Chou,1990) ซึ่งจะยับยั้งเอนไซม์นี้แบบแข่งขัน (Compettitive inhibition) และสำหรับเอนไซม์ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนสนั้นจะลดกิจกรรมได้โดยเติมสารยับยั้ง เช่น โปแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ (Marison,1988)

การผลิตกรดมะนาวโดยการหมักนั้น นอกจากวัฏจักรเครปส์แล้ว จุลินทรีย์ยังต้องมีวิถีเมตาบอลิซึมอื่น ๆ อีกเพื่อเปลี่ยนสับสเตรตในน้ำหมักให้เป็นออกซาโลอะซิเตตและอะซิทิลโคเอ เช่น วิถีไกลโคไลซิส ซึ่งเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวทเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ วัฏจักรไกลออกซีเลต ซึ่งจะช่วยสร้างสารตัวกลางบางชนิดเพิ่มให้กับวัฏจักรเครปส์ เช่น มาเลต ซัคซิเนต เป็นต้น และปฏิกิริยาอะแนปเลอโรทิคซีเควนซ์ (anaplerotic sequences reaction) เพื่อเพิ่มออกซาโลอะซิเตตอันเป็นสารตัวกลางที่สำคัญของวัฏจักรเครปส์ (Marison,1988)



<u>รูปที่ 2</u> วัฏจักรเครปส์หรือวัฏจักรกรดมะนาว

<u>ที่มา</u> Singleton and Sainsbury ,1988



<u>รูปที่3</u> ความสัมพันธ์ของวัฏจักรเครปส์ วัฏจักรไกลออกซีเลต และปฏิกิริยาอะแนปเลอโรทิค ซีเควนซ์

<u>ที่มา</u> Singleton and Sainsbury ,1988

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้นจะสำเร็จหรือไม่ขึ้นกับปัจจัยหลัก ๆ 2 ประการคือ สายพันธุ์ยีสต์ และภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงตามสายพันธุ์ และวิธีการที่ใช้ ดังนั้น ปัจจัยทั้ง 2 ประการนี้ต้องศึกษาควบคู่กัน

1. สายพันธุ์ของยีสต์

มีรายงานมากมายเกี่ยวกับการศึกษา เพื่อหาสายพันธุ์ยีสต์ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ รายงานของ Nout (1972); Finogenova et al. (1986); Wojtatowicz, Rymowicz,and Kautola (1991) เป็นต้น ปัจจุบันพบว่า ยีสต์หลายสายพันธุ์โดยเฉพาะในกลุ่ม Candida sp. สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดี การเลือกใช้สายพันธุ์ยีสต์สำหรับการผลิตกรดมะนาวควรมีหลักดังนี้คือ มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดมะนาวและจีนส์ที่ควบคุมการผลิตกรดมะนาว คงทน ให้ผลผลิตสม่ำเสมอ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ให้กรดชนิดอื่นที่ไม่ต้องการในปริมาณน้อย ทนต่อโลหะหนักที่มีผลต่อการผลิตได้สูง มีกิจกรรมของเอ็นไซม์อะโคนิเตสต่ำ และใช้เวลาในการหมักสั้น

2. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

2.1 สารแหล่งคาร์บอน

ยีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ดังมีรายงานการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์จากสารแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆได้แก่ กลูโคส(Ermakova et al.,1986;Rane and Sims,1993) แอลกอฮอล์ กลีเซอรอล กรดไขมัน นอร์มัล-พาราฟฟิน (Ikeno et al.,1975) ไฮโดรคาร์บอน(Gledhill , Hill , and Hodson,1973) เซลลูโลสที่ผ่านการย่อยแล้ว(Asenjo, Szuhay, and Chiu,1982 ;Maddox et al.,1985) ซึ่งสารใดจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวนั้น ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ อีกทั้งความเหมาะสมในด้านราคา และควรเป็นสารที่หาได้สม่ำเสมอเพื่อความเป็นไปได้ในการขยายการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารแหล่งคาร์บอนก็มีความสำคัญต่อปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ ถ้าความเข้มข้นน้อยเกินไปก็จะได้ผลผลิตน้อยด้วย แต่หากความเข้มข้นเริ่มต้นสูงเกินไป ยีสต์ไม่สามารถใช้ได้หมดก็จะเป็นการสิ้นเปลือง และยังทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ของเมตาบอลิซึมในการรับส่งอิเล็คตรอนเพื่อสร้างพลังงาน(respiratory enzyme)ทำให้มีผลต่อการเจริญของยีสต์อีกด้วย เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า คาตาบอไลท์ รีเพรสชัน (Phaff, Miller, and Mrak,1978)

2.2 สารแหล่งไนโตรเจน

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้นจำเป็นจะต้องควบคุมปริมาณสารแหล่งไนโตรเจนให้เพียงพอต่อการเจริญเท่านั้น เนื่องจากการสะสมกรดมะนาวจะเกิดขึ้นหลังจากที่แหล่งไนโตรเจนในอาหารถูกใช้หมดแล้ว (Mckay, Maddox, and Brooks, 1994) สำหรับชนิดของสารแหล่งไนโตรเจน พบว่ายีสต์สามารถใช้ได้ทั้งในรูปของอินทรีย์ และอนินทรีย์ไนโตรเจน อินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน และคอร์นสตีปลิเคอร์ ส่วนอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต โซเดียมไนเตรต เป็นต้น ชนิดของสารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ ซึ่งอาจเลือกใช้ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือใช้ควบคู่กันก็ได้ (Abou-Zeid and Ashy, 1984)

2.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นธาตุหลักชนิดที่สามที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดถึงกลไกการควบคุมทางชีวเคมีและทางชีวภาพ แต่อาศัยหลักความจริงที่ว่าฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อเมตาบอลีซึม เพื่อให้ได้พลังงาน และฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบของส่วนสำคัญต่างๆในเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิค นิวคลีโอไทด์ และฟอสฟอลิปิด เป็นต้น การจำกัดปริมาณฟอสเฟตจะทำให้เกิดการสะสมของกรดมะนาว(Kubicek and Rohr , 1986) รูปของฟอสเฟตที่นิยมใช้คือ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

2.4 แร่ธาตุ

แร่ธาตุหลายชนิดมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ ได้แก่ แมกนีเซียม แมงกานีส เหล็ก ทองแดง สังกะสี ตะกั่ว เป็นต้น แมกนีเซียมเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิดภายในเซลล์ที่สำคัญคือ เอนไซม์จำพวกไคเนส (Marison, 1988) Shimizu และคณะ(1970) พบว่า แมกนีเซียมซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟตเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการผลิตกรดมะนาว (อ้างถึงใน Abou-Zeid and Ashy , 1984) Fried (1972) ได้รายงานว่า การเลี้ยงเชื้อ Candida ในอาหารที่มีตะกั่วปริมาณ 0.5-1.5 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้กรดมะนาวสูงกว่าอาหารที่ไม่เติมตะกั่ว เหล็กไอออนเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเตส ทำให้กรดมะนาวถูกเปลี่ยนเป็นกรดไอโซซิตริก ส่วนทองแดงไอออนเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเตส Furukawa และคณะ (1977) ได้รายงานว่า การเติมเหล็กซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อ Candida ผลิตกรดมะนาวได้น้อยลงแต่ผลิตกรดไอโซซิตริกมากขึ้น แต่การเติมทองแดงซัลเฟตให้มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้ปริมาณกรดมะนาวเพิ่มขึ้น และการเพิ่มปริมาณ

ทองแดงซัลเฟตจะทำให้การผลิตกรดไอโซซิตริกลดลง Takayama และคณะ (1975) รายงานว่า ยีสต์สายพันธุ์กลายของ Candida zeylanoides จะเจริญได้ดีในอาหารที่เติมเหล็กซัลเฟต 0.2-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.5 สารเสริมอื่นๆ

นอกจากสารต่างๆดังกล่าวข้างต้นแล้วยังมีการเติมสารบางชนิด ซึ่งเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญ และการผลิตกรดมะนาวของยีสต์ เช่น ไธอะมีนซึ่งจะใช้ในรูปของไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ กรดนิโคตินิกและไบโอติน เป็นต้น (Kubicek and Rohr ,1986) หรืออาจใช้ในรูปของสารประกอบ เช่น สารสกัดจากยีสต์ คอร์นสตีปลิเคอร์ เป็นต้น (Abou-Zeid and Ashy , 1984)

2.6 ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวโดยใช้ยีสต์นั้น แตกต่างจากการใช้เชื้อราอย่างเห็นได้ชัด ตามปกติเชื้อรา A. niger ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวสามารถทนต่อปริมาณกรดที่สร้างขึ้นมาได้สูง ดังนั้นไม่จำเป็นต้องเติมสารที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นกลาง (neutralizing agent) ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างของอาหารจะลดลงถึงประมาณ 2 (Mattey, 1992) แต่ยีสต์ส่วนใหญ่มีความทนต่อปริมาณกรดที่สร้างขึ้นต่ำกว่าเชื้อรามาก ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องเติมสารที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรดด่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม คือ 4.5-6.5 (Kubicek and Rohr, 1986) การเลือกใช้สารใดย่อมขึ้นอยู่กับความเหมาะสม สำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่านิยมใช้แคลเซียมคาร์บอเนตโดยเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ต้น ส่วนการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักนั้น การใช้โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์และสารประกอบของโซเดียม ทำให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำกว่าที่ควร เนื่องจากโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์จะทำให้กรดมะนาวสลายตัว เกิดเป็นกรดออกซาลิกและกรดอะซิติก (Bouchard and Merritt, 1979) ส่วนโซเดียมปริมาณสูงมีผลต่อเซลล์ยีสต์ เป็นต้น

2.7 อุณหภูมิ

อุณหภูมิในระหว่างการหมักมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญ การผลิตและการสะสมกรดมะนาวของยีสต์ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้ แต่โดยทั่วไปจะอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส (Marison, 1988)

2.8 การให้อากาศ

กระบวนการหมักกรดมะนาวเป็นการหมักแบบต้องการอากาศ ดังนั้นจึงต้องให้ออกซิเจนมากพอในระหว่างกระบวนการหมัก ปริมาณออกซิเจนจะขึ้นกับสายพันธุ์ยีสต์ องค์ประกอบและสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้ และขนาดของถังหมัก และเพื่อให้มีการกระจายของออกซิเจน จึงต้องมีการกวนพร้อมกับการให้อากาศ Okoshi และคณะ(1987) ได้รายงานว่า ความเข้มข้นของออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวโดย Candida tropicalis OT-1 คือ 60 ppm Rane and Sims (1993,1995) รายงานว่าการเพิ่มค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะทำให้ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida lipolytica Y 1095 สูงขึ้น สำหรับการเลี้ยงยีสต์ในระดับขวดเขย่า จะใช้วิธีเขย่าภาชนะที่เลี้ยงเชื้อ ซึ่งนิยมเขย่าแบบวงกลมมากกว่าการเขย่าแบบเส้นตรง เพราะการเขย่าแบบวงกลมทำให้อัตราการแลกเปลี่ยนออกซิเจนสูงกว่าการเขย่าแบบเส้นตรง

นอกจากปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นแล้วยังอาจต้องเพิ่มเติมปัจจัยอื่น ๆ อีกตามความเหมาะสม เช่น ถ้าใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์ เป็นแหล่งคาร์บอน ก็ต้องเติมสารลดแรงตึงผิวเป็นต้น

ประโยชน์ของกรดมะนาว

ปัจจุบันทั่วโลกมีความต้องการใช้กรดมะนาวอย่างมาก และยังต้องการเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (ประมาณร้อยละ 2-3 ต่อปี)(Goldberg, Peleg , and Rokem ,1991) เนื่องจากกรดมะนาวมีความสามารถในการละลายสูง ความเป็นพิษต่ำ และให้รสเปรี้ยวที่ยอมรับได้ จึงสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้มาก ประเทศที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตกรดมะนาวคือ สหรัฐอเมริกา ซึ่งผลิตได้ประมาณ 180 ล้านกิโลกรัมต่อปี จากกรดมะนาวที่ผลิตได้ทั้งหมด จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และ เครื่องดื่มประมาณร้อยละ 70 ใช้ในอุตสาหกรรมเภสัชกรรมประมาณร้อยละ 12 และอีกประมาณร้อยละ 18 ถูกใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ (Marison , 1988) ซึ่งรายละเอียดของการใช้ประโยชน์จากกรดมะนาวมีดังนี้

1.อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

นิยมใช้กรดมะนาวเพื่อเพิ่มรสชาติ ป้องกันการบูดเสียในเครื่องดื่ม เนยแข็งและเนยเหลว ป้องกันการขุ่นและการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในไวน์ ป้องกันการตกผลึกของน้ำผึ้งและการเปลี่ยนสีของหัวหอม ป้องกันการหืนในอาหารแช่แข็งและอาหารที่มีไขมัน ใช้แต่งสีและใช้เป็นอีมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์นม ช่วยเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์ในเครื่องดื่มประเภทซอฟท์ดริงค์ ใช้เป็นสารปรับกรดในอาหารกระป๋อง น้ำขวดและผลิตภัณฑ์นม ขนมหวานจำพวกแยม เยลลี เจลาติน ผักและผลไม้กระป๋อง แตงกวาดอง ซึ่งตัวปรับกรดที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่มมีมากมาย แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้กรดมะนาว คือใช้ประมาณร้อยละ 73 รองลงมาเป็นกรดฟอสฟอริกประมาณร้อยละ 15 ส่วนที่เหลือจะเป็นกรดอื่น ๆ เช่น กรดฟูมาริก กรดมาลิก กรดแลคติก และกรดทาร์ทาริก เป็นต้น (Goldberg , Peleg , and Rokem ,1991)

2.อุตสาหกรรมทางเภสัชกรรม

ใช้กรดมะนาวในยาลดกรดในกระเพาะอาหารโดยใช้ผสมกับไบคาร์บอเนต-คาร์บอเนต ซึ่งทำให้เกิดฟองฟู่ในน้ำดื่ม กรดมะนาวและโซเดียมซิเตรตใช้ในการเตรียมสารละลายเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดในการถ่ายเลือด และช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเตรียมวิตามิน เป็นต้น (Bouchard and Merritt , 1979)

3.อุตสาหกรรมด้านอื่น ๆ

ได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก เริ่มสนใจใช้โซเดียมซิเตรตแทนฟอสเฟตในการผลิตผงซักฟอกเนื่องจากย่อยสลายได้ง่ายกว่าฟอสเฟต และเป็นสารที่ไม่ช่วยเสริมการเจริญเติบโตของวัชพืชในน้ำ อีกทั้งไม่เป็นพิษต่อปลา ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง จะใช้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในครีมนวดผม น้ำยาดัดผม น้ำยาทำความสะอาดใบหน้าและโลชัน ในอุตสาหกรรมโลหะ ใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมในน้ำยาขัดโลหะ น้ำยาล้างสนิม นอกจากนี้ยังใช้กรดมะนาวในระบบการกำจัดกาซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในเหมืองถลุงแร่โลหะ และโรงงานที่มีการใช้ถ่านหินเป็นแหล่งพลังงาน โดยใช้สารละลายผสมของโซเดียมซิเตรต กรดมะนาว และโซเดียมไธโอซัลเฟต เป็นตัวดูดซับกาซที่เกิดขึ้น เป็นต้น(Bouchard and Merritt , 1979)

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

เนื่องจากในปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์ของกรดมะนาวอย่างมากมายในอุตสาหกรรมต่างๆดังกล่าวข้างต้น และแนวโน้มของการใช้กรดมะนาวจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทำให้ประเทศไทยต้องนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก (ตารางที่ 2) อีกทั้งประเทศไทยมีแหล่งวัตถุดิบมากมายที่สามารถใช้ผลิตกรดมะนาวได้ ดังนั้น จึงสมควรที่จะได้ศึกษาเพื่อหาแนวทางการผลิตกรดมะนาวขึ้นใช้เองภายในประเทศ ลดปริมาณการนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ทั้งในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยยีสต์สายพันธุ์กลายของ Candida oleophila ซึ่งผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวสูงขึ้นโดย สมศักดิ์ นาคซื่อตรง ในปี 2537 ผลที่ได้จากการศึกษาจะใช้เป็นข้อมูลสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนต่อไป

ขั้นตอนการวิจัย

1.คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าจากยีสต์สายพันธุ์กลายของ Candida oleophila โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเกรดทางการค้าเป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง

2.ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในระดับขวดเขย่า

3.ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 2 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวของประเทศไทยระหว่างปี 2531-2537

ปี พ.ศ.	ปริมาณ(กิโลกรัม)	มูลค่า(บาท)
2531	771,111	26,127,593
2532	1,460,893	45,802,953
2533	2,113,734	57,264,118
2534	2,398,451	64,844,372
2535	3,985,387	131,742,434
2536	2,226,539	72,735,321
2537(มค.-มิย.)	1,902,871	53,836,122

ที่มา กรมศุลกากร