บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติและความเป็นมา

กรดมะนาว(Citric acid)เป็นกรดอินทรีย์ที่สำคัญชนิดหนึ่งเนื่องจากเป็นสารตัวกลางของที่สำคัญของวัฏจักรเครปส์(Kreb's cycle) พบทั่วไปในทั้งในพืชและจุลินทรีย์ พบมากในพืชตระกูลส้ม (Citrus fruit) ได้แก่ มะนาว ส้ม องุ่น สับปรด ลูกพีท เป็นต้น กรดมะนาวแยกและตกผลึกได้ครั้งแรกจากน้ำมะนาวโดย Scheeleในปี 1784(อ้างถึงใน Matty,1992) กรดมะนาวที่ได้จากผลไม้ว่าเรียกว่า กรดมะนาวธรรมชาติ (Natural citric acid) ในปี1860 ประเทศอังกฤษได้ผลิตกรดมะนาวในรูปของเกลือแคลเซียมซิเตรท(Calcium citrate)ในระดับอุตสาหกรรม ช่วงแรกของการผลิตกรดมะนาวออกจำหน่ายได้จากการตกผลึกจากน้ำมะนาวเป็นหลักซึ่งไม่พอเพียงกับความต้องการของตลาดทำให้มีราคาแพง จึงมีผู้คิดค้นวิธีการผลิตกรดมะนาวโดยกระบวนการทางเคมีและการหมักจากจุลินทรีย์บางชนิด ในปี 1880 Grimoux และ Adam สามารถสังเคราะห์กรดมะนาวโดยกระบวนการเคมีจากกลีเซอรอลแต่ยังมีต้นทุนสูงและผลผลิตที่ได้มีคุณภาพต่ำ เนื่องจากต้องใช้ปฏิกิริยาหลายขั้นตอน (Abou-Zeid and Ashy,1984 ;Matty,1992; Milsom and Meers,1985)

ในปี 1893 Whemer นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมันนีได้ค้นพบราสายพันธุ์ *Citromyces pfefferiamis* และ *C. glaber* (ปัจจุบันคือ *Pennicillium*) สามารถผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมแต่ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ต่อมาในปี 1917 Currie พบราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน (อ้างถึงใน Grewal and

Kalra,1995; Matty,1992) จึงได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตกรดมะนาวจากราสายพันธุ์นี้อย่างต่อเนื่องจนสามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรมในเชิงการค้าได้ ซึ่งเป็นการผลิตกรดมะนาวบนผิวของอาหาร (Surface fermentation) จากวัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาล ต่อมาในปี 1923 Currie ร่วมกับบริษัท Chas,Pfizzer & Co.Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกาได้พัฒนาโดยนำเอาราสายพันธุ์ดังกล่าวไปผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมโดยการหมักในสภาพอาหารเหลว (Submerged fermentation) ใช้กลูโคสไซรับหรือกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน (อ้างถึงใน Milsom and Meers, 1985)ในปี1965ได้มีผู้ค้นพบสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวจากการหมักที่มีคาร์โบไฮเดรทและนอร์มัล-อัลเคนเป็นแหล่งคาร์บอน (Stottmister *et al.*,1982; อ้างถึงใน Milson and Meers, 1985) ปัจจุบันมีการผลิตกรดมะนาวออกในประเทศต่างๆประมาณ 500,000 ตันต่อปี ส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการหมักรา *A. niger* และบางส่วนจากยีสต์สายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* (Matty,1992; Shah *et al.*, 1993)

1.2 การผลิตกรดมะนาวโดยการหมักยีสต์

การผลิตกรดมะนาวสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น รา แบคทีเรีย และยีสต์ การผลิตกรดมะนาวในการค้าส่วนใหญ่ผลิตได้จากรา *A. niger* แต่การผลิตกรดมะนาวจากราพบว่าจะใช้ระยะเวลาในการหมักนานและสายพันธุ์ไม่คงที่ ส่วนแบคทีเรียให้ผลผลิตกรดมะนาวน้อยมาก สำหรับการผลิตกรดมะนาวจากยีสต์เป็นการหมักในสภาพอาหารเหลว ซึ่งเป็นวิธีนิยมมากในอุตสาหกรรมเพราะอัตราการเจริญและการผลิตกรดมะนาวใช้เวลาสั้นกว่ารา นอกจากนี้การผลิตกรดมะนาวจากยีสต์ยังมีข้อดีกว่าราคือ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด และยังสามารถใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องได้ง่าย ควบคุมกระบวนการหมักได้ดีกว่ารา (Grewal and

Kalra,1995; Rane and Sims,1993; Shah *et al.*,1993) ปัจจุบันการผลิตกรดมะนาวจากยีสต์มีการศึกษาทั้งกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation process) และกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation process) นอกจากนี้ยังมีการนำเอาเทคนิคการตรึงเซลล์ (Cell immobilization) มาใช้ในการผลิตกรดมะนาวจากยีสต์

ในปี 1979 Stottmeister (อ้างถึงใน Kautola *et al.*,1991) ได้ศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยการใช้เซลล์ตรึงของยีสต์ *Candida lipolytica* ตรึงบนพอลิเอไครลาไมด์ (polyacrylamide) และในปีเดียวกัน Briffaud และ Engasser ได้ตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomycopsis lipolytica* โดยใช้ wood chip พบว่ามีข้อได้เปรียบกว่าเซลล์อิสระเล็กน้อย (Kautola *et al.*,1991) ต่อมาในปี 1983 Maddox และ Kington ได้ศึกษาการตรึงเซลล์ *S.lipolytica* บนพอลิเอไครลาไมด์โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเซลล์ตรึงนี้ สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 14 วันโดยยังสามารถผลิตกรดมะนาวได้เหมือนเดิม (Maddox and Kington,1983) ในปี 1991 Kautola และคณะได้ทำการตรึงเซลล์ยีสต์ *Y. lipolytica* เพื่อผลิตกรดกรดมะนาวโดยเปรียบเทียบสารพาหะชนิดต่างๆ เช่นแคลเซียม-อัลจิเนต แคปปา-คาร์ราจิแนน พอลียูรีเทนเจล ไนลอนเวป ทำการหมักเซลล์ตรึงในขวดเขย่าพบว่าเมื่อใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะจะได้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด เมื่อเทียบกับการใช้สารพาหะชนิดอื่นและได้ศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยใช้เซลล์ตรึงในระดับถังหมักแบบแอร์ลิฟต์ (Air-lift fermentation) ในปี 1993 Rymowicz และคณะ ได้ศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *Y. lipolytica* A-101 โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะและมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยการหมักในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมักต่อเนื่องแบบแอร์ลิฟ (Continuous air-lift bioreactor) ด้วย

1.3 วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ ใช้วิธีการดัดแปลงมาจากการตรึงเอนไซม์โดยเป็นการจำกัดขอบเขตของเซลล์ให้อยู่ในบริเวณที่กำหนดแต่เซลล์ยังคงรักษาสมบัติในการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์และมีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและสามารถใช้เซลล์ตรึงนี้อย่างต่อเนื่องได้ เซลล์ตรึงอาจจะอยู่ในสถานะเซลล์ที่กำลังเจริญหรือเป็นเซลล์ระยะพักตัว หรือเซลล์ที่ตายแล้ว (Chibata and Wingard,1983)

การตรึงเซลล์ตามเทคนิคของ Chibata และคณะ(1978) มี 3 วิธีคือ วิธีการยึดด้วยสารพาหะ (Carrier-binding method) วิธีการเชื่อมไขว้(Cross-linking method) และวิธีการกักขัง (Entrapping method)

1.3.1. วิธีการยึดด้วยพาหะ หมายถึงการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์กับสารพาหะโดยตรงแบ่งได้ 2 วิธี

1.3.1.1 การเกาะกันด้วยพันธะโควาเลนท์ (Covalent binding method) เป็นวิธีการเชื่อมโดยตรงกับสารพาหะ สารที่ใช้เชื่อมนั้นสามารถต่อกับส่วนประกอบที่ยึดเซลล์ ได้แก่ กลุ่มอะมิโน กลุ่มคาร์บอกซิล กลุ่มไฮดรอกซิล กลุ่มอิมิดาโซลหรือกลุ่มฟินอลของโปรตีน ข้อดีของวิธีนี้คือ เซลล์เชื่อมอยู่ที่ผิวหน้าของสารตัวพาหะอย่างสม่ำเสมอมีความคงตัวดี และมีการหลุดของเซลล์น้อย (Cheetham, 1980) ข้อเสียของการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้คือความเป็นพิษของสารพาหะที่ใช้อาจทำให้เซลล์สูญเสียแอคติวิตีได้

1.3.1.2 วิธีการดูดซับ (Adsorption method) เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดกับสารพาหะด้วยพันธะอิออนิคหรือพันธะไฮโดรเจน (Cheetham, 1980) โดยอาศัยหลักทางธรรมชาติเคมี เนื่องจากผนังของเซลล์ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนไพเมลิค (Diaminopimelic acid)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และเฮกโซซามิน(Hexosamines) ซึ่งสามารถเกิดพันธะอิออนิคกับสารพาหะได้ (Koshcheenko,1981) โดย การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ง่ายแต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนทำให้เซลล์หลุดได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างหรือการไหลของเหลวในน้ำหรือการเกิดฟองอากาศหรือขณะมีการแบ่งเซลล์

1.3.2. วิธีการเชื่อมไขว้ เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยการเชื่อมเซลล์เข้ากับสารพาหะ โดยใช้สารพวก 2 หมู่ฟังชั่น (bi-functional reagent) หรือสารมัลติฟังชั่น (Multifunctional reagent) เช่น กลูทาอัลดีไฮด์(Glutaaldehyde) และไทลูอิน ไดไอโซไซยาเนต(Toluene diisocyanate) เป็นต้น การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะต้องทำมีภายใต้ภาวะที่รุนแรงอาจทำให้เซลล์ตายได้

1.3.3. การกักขัง แบ่งได้ 2 วิธี

1.3.3.1 การตรึงเซลล์แบบไมโครแคปซูล(Microencapsulation) เป็นการกักขังเซลล์ในเยื่อกึ่งผ่าน(Semipermeable membrane) เช่น สารพวกคอลลอยด์ หรือซิลิโคน ซึ่งสามารถป้องกันซึมผ่านเยื่อของเซลล์ได้แต่ยอมให้ซับสเตรทและผลผลิตซึมผ่านเยื่อได้อย่างอิสระ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ง่ายแต่เซลล์ตรึงไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหาการคกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย (Cheetham, 1980)

1.3.3.2 การตรึงเซลล์แบบแลททิช (Lattic type) เป็นการตรึงเซลล์โดยการกักขังเซลล์ไว้ภายในช่องว่าง 3 มิติในเจลของสารโพลิเมอร์ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสบผลสำเร็จมากที่สุดเนื่องจากสามารถใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิด การตรึงเซลล์ด้วยวิธีกักขังนิยมใช้สารพวก biochemically inert hydrogel เป็นตัวกักขัง โดยใช้หลักการเกิดเจลซึ่งทำให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติ ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน กลไกการเกิดขึ้นกับสารพาหะที่ใช้ แสดงในตารางที่ 1 (ภาวิณี,2531)

ในการเตรียมเซลล์ตรึงมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับสมบัติของสารพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์ แต่ละวิธีมีข้อปลีกย่อยแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาคล้ายคลึงกัน

ตารางที่1 แสดงกลไกการเกิดเจลโดยสารพาหะเมื่อใช้วิธีกักขัง

กลไกการเกิดเจล	สารพาหะ
พอลิเมอร์ไรเซชั่น(polymerization)	พอลิอะคริลลาไมด์ (polyacrylamide) พอลิเมตาคริลเลท (polymetacrylate)
การกักขัง (entrapment)	พรีพอลิเมอร์ (prepolymer) โปรตีน
พอลิคอนเดนเซชั่น (polycondensation)	พอลิยูรีเทน (poly-uretane) เอพอกซีเรซิน (epoxyresin)
การเกิดเจลเนื่องจากความร้อน	คอลลาเจน เจลาติน เอการ์/เอกาโรส แคปปา-คาร์ราจิแนน
การเกิดเจลแบบไอโอโนโทปิก	อัลจิเนต ชิโทซาน
การตกตะกอน	เซลลูโลส เซลลูโลสไตรอะซิเตรต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คือ สมบัติทางกลศาสตร์(mechanical property) สมบัติทางกายภาพ(physical property) ความแข็งแรง(strength) ความชอบน้ำ(hydrophilicity) สภาพให้ซึมผ่าน(permeability) ทนต่อสภาพแวดล้อมทางกายภาพ สารเคมี การย่อยสลายของจุลินทรีย์ นอกจากนี้การตรึงเซลล์จะต้องให้อยู่ในสภาวะที่ปลอดเชื้อจึงต้องเลือกสารที่ทนต่อความร้อนและความดันสูง สารพาหะไม่ควรเป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม และไม่ควรกระทบกระเทือนต่อระบบเมตาบอลิซึม นอกจากนี้อาจพิจารณาในด้านราคา การยอมรับ และความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก

1.4 สารพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

1.4.1. อัลจิเนต เป็นสารที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นพอลิเมอร์ของ D-manuroate (M) และ L-guluronate (G) residues อัลจิเนตจะเกิดเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะ เช่น อะลูมิเนียมไอออน (Al^{3+}) หรือแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) โดยมีการแทนที่ของไอออนของสารโลหะเหล่านี้ทำให้เกิดเจลโครงสร้าง 3 มิติ เรียกการเกิดเจลชนิดนี้ว่า ไอโอโนโทรปิค (ionotropic gelation)

การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตนี้ ทำได้โดยผสมเซลล์จุลินทรีย์ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตก่อน แล้วหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดเป็นเม็ดเจลของแคลเซียมอัลจิเนต หลังจากนั้นควรแช่เม็ดเจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อย่างน้อย 20 นาทีเพื่อให้เกิดเม็ดเจลอย่างสมบูรณ์ (Bucke,1987) คุณสมบัติของเม็ดเจลที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณอัลจิเนตที่ใช้ด้วย (Cheethem *et al.*,1979) การใช้แคลเซียมอัลจิเนตในการตรึงเซลล์มีข้อดีคือสามารถทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว จึงนิยมใช้แคลเซียมอัลจิเนตในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต เป็นวิธีที่ปลอดภัยเนื่องจาก

แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารไม่เป็นพิษ และยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในสารอาหารมาเป็นเวลานาน นอกจากนี้เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตสามารถแบ่งตัวได้ภายในเม็ดเจล ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีอยู่เป็นเวลานาน แต่เซลล์บางส่วนอาจหลุดออกนอกเม็ดเจลอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนในผลผลิต

1.4.2 คาร์ราจิแนน เป็นชื่อทั่วไปของ galactans เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง ประกอบด้วย 3,6-anhydrous-β-D galactose คาร์ราจิแนนที่สกัดได้นี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ แคปปา(kappa) ไอโอตา(iota) และแลมดา(lamda) แต่ส่วนที่สามารถเกิดเจลได้มี 2 ส่วนคือ แคปปาและไอโอตา การเกิดเจลโดยใช้ความร้อน การตรึงเซลล์โดยทั่วไปนิยมใช้แคปปา-คาร์ราจิแนน(ภาวิณี,2531)

การตรึงเซลล์ด้วยแคปปา-คาร์ราจิแนน ทำได้โดยการเตรียมสารละลายคาร์ราจิแนนให้ร้อนประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้คาร์ราจิแนนละลาย และผสมเซลล์ลงไปในคาร์ราจิแนนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วหยดลงในสารละลายของเกลือโปตัสเซียม หรือเกลือแอมโมเนียมที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียสเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดเม็ดเจล(Chibata *et al.*,1987) การใช้แคปปา-คาร์ราจิแนนในการตรึงเซลล์มีข้อดีคือ วิธีการง่าย สะดวกรวดเร็วและปลอดภัยคาร์ราจิแนนเป็นสารที่ยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในสารอาหารและเครื่องสำอางค์ ซึ่งทำหน้าที่เป็น gelling thicking และ stabilizing agent และการตรึงเซลล์ใช้ภาวะที่ไม่รุนแรง ไม่มีสารเคมีในการทำลายแอคติวิตีของเอนไซม์ของเซลล์ เซลล์ที่ถูกตรึงนี้สามารถเจริญและแบ่งเซลล์ภายในเจลได้เช่นเดียวกันกับ อัลจิเนต

1.4.3 เจลลาติน เป็นอนุพันธ์ที่ได้จากการย่อยคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนสายยาว มีมวลโมเลกุลเฉลี่ย 69,000-80,000 นอกจากนี้ยังเป็นโปรตีนธรรมชาติ มีความชอบน้ำสูง ดังนั้น

เมื่อนำมาผสมกับน้ำทำให้พองตัวได้ดี และลดความต้านทานการเคลื่อนที่ของเซลล์ ตลอดจนการแพร่ ของซับสเตรตและการเกิดปฏิกิริยาของผลิตภัณฑ์ ซึ่งได้นำมาใช้ในการตรึงเซลล์ เจลลาตินเป็นสารที่ยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในสารอาหารได้เช่นเดียวกับอัลจิเนต และแคปปา-คาร์ราจิแนน (ภาวิณี,2531)

การตรึงเซลล์โดยเจลลาติสามารถทำได้โดยผสมเซลล์กับสารละลายเจลลาตินที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นลงจะได้เม็ดเจลที่กักขังเซลล์เอาไว้ การเกิดเม็ดเจลที่อุณหภูมิต่ำและสามารถแปรผันกลับได้โดยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและกลไกการเกิดเม็ดเจลไม่เสถียร แต่อย่างไรก็ตามอาจแก้ไขได้โดยการใช้สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์เป็นสารช่วยในการแข็งตัวของเม็ดเจล (Scardi,1987)

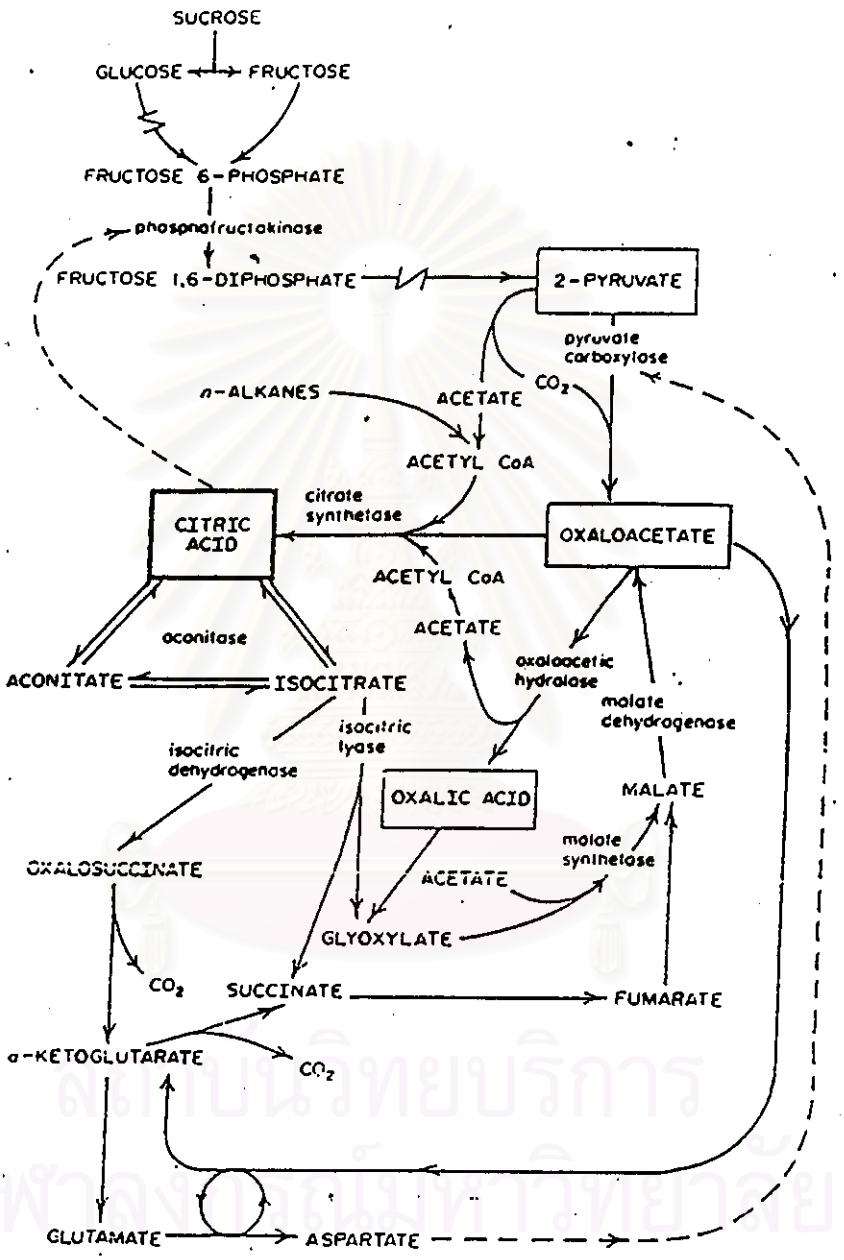
1.5 ประวัติของการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

การตรึงเซลล์ เกิดขึ้นจากแนวความคิดของการสังเกตธรรมชาติ จากการใช้จุลินทรีย์ทางอุตสาหกรรมบางชนิด ที่เซลล์จุลินทรีย์จับที่ผิวของของแข็งหรือสร้างเป็นแผ่นฟิล์ม แล้วนำมาดัดแปลงเป็นเทคนิคการตรึงเซลล์นั้น มีการอธิบายถึงการตรึงเซลล์ครั้งแรกในปี 1960 โดย Hottori และ Furusaka ได้ตรึงเซลล์ที่มีชีวิตของ *Escherichia coli* และ *Azetobactor agile* ไว้บนโดวเวกซ์-1(Dowwex-1) พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงนี้สามารถออกซิไดซ์กลูโคสและกรดซัคซินิคได้ (อ้างถึงใน Chibata *et al.*,1978) งานวิจัยที่ใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ได้เพิ่มมากขึ้นและประสบผลสำเร็จในอุตสาหกรรมในปี 1973 โดยมีการนำเซลล์ตรึงของ *E. coli* มาใช้ในกระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่องของกรดแอล-แอสพาร์ติค (L-aspartic acid) ซึ่งนับเป็นโรงงานอุตสาหกรรมแห่งแรกของโลกที่ใช้ระบบเซลล์ตรึง(Chibata *et al.*,1974) ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ตรึงในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์โดยเซลล์ตรึงของยีสต์ (Nguyen and Shieh, 1992) กระบวนการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้

เซลล์ตรึงของยีสต์(Hecker *et al.*,1990) การผลิตกรดแลคติคโดยเซลล์ตรึงของแบคทีเรีย (Champagne *et al.*,1989) การผลิตกรดมะนาวจากรา(Garg and Sharma, 1992) และการผลิตกรดมะนาวโดยการตรึงเซลล์ยีสต์(Kautola *et al.*,1991; Rymowicz *et al.*,1993) จะเห็นว่าความสามารถในการนำเอาเทคนิคการตรึงเซลล์มาใช้กับจุลินทรีย์ทั้งรา แบคทีเรียและยีสต์

1.6 ชีวเคมีของกรดมะนาว

กรดมะนาวเป็นสารตัวกลางของวัฏจักรเครปส์ ดังรูปที่ 1 ในการผลิตกรดมะนาวจากน้ำตาลกลูโคสนั้น น้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวต (pyruvate) โดยวิถีการไกลโคไลซีส (glycolysis pathgway) ไพรูเวตที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิทิล-โคเอ(acetyl Co-A) แล้วเข้าสู่วิถีการผลิตกรดมะนาว อะซิทิลโคเอจะรวมกับออกซาโลอะซิเตด (oxaloacetate) โดยอาศัยเอนไซม์ซิเตรต ซินธีเตส(citrate synthetase) ได้กรดมะนาวเกิดขึ้น ในระหว่างการสะสมของกรดมะนาวออกซาโลอะซิเตดถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาการสร้างทดแทน(anaplerotic reaction) ซึ่งเกิดจากไพรูเวตรวมกับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอาศัยเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส pyruvate carboxylase) (Milsom and Meers,1985) การสะสมกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นโดยเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ อะโคนิเตส (aconitase) และ ไอโซซิเตรต ดีไฮโดรจิเนส(isocitrate dehydrogenase) ซึ่งในช่วงที่มีการผลิตกรดมะนาวเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีแอคติวิตีลดลง ในขณะที่เอนไซม์ซิตรต ซินติเตสมีแอคติวิตีสูงขึ้น(Marison,1988)



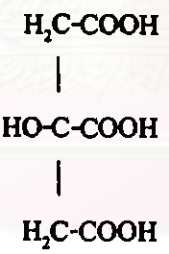
รูปที่1 วิถีการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ผ่านวัฏจักรเครปส์

ที่มา: Milsom and Meers (1985)

--------หมายถึง การยับยั้งแบบย้อนกลับ (Feed back inhibition)

1.7 คุณสมบัติของกรดมะนาว

กรดมะนาวหรือ กรด- 2 ไฮดรอซี-1,2,3-โพรเพนไตรคาร์บอกซิลิค (2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid) มีสูตรทางเคมีคือ $C_6H_8O_7$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 192.13 สูตรโครงสร้างทางเคมีแสดงดังรูปที่ 2 กรดมะนาวมีค่า pKที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสหลายค่า เช่น pKa_1 เท่ากับ 3.128 pKa_2 เท่ากับ 4.761 และ pKa_3เท่ากับ 6.396 (Bouchard and Merritt,1979) ลักษณะทั่วไปของกรดมะนาวมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีรสเปรี้ยว ความสามารถในการละลายน้ำได้สูงขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ มีความเป็นพิษต่ำและย่อยสลายได้ง่าย กรดมะนาวส่วนใหญ่ผลิตในรูปกรดมะนาวแอนไฮดรัส (anhydrous citric acid) กรดมะนาวโมโนไฮเดรด (monohydrate citric acid) และเกลือเอสเทอร์ของกรดมะนาว (Marison,1988)



รูปที่ 2 โครงสร้างของกรดมะนาว

ที่มา: Bouchard and Merritt (1979)

1.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ ในกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวได้แก่ สายพันธุ์ยีสต์ อาหารและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว

1.8.1. สายพันธุ์ของยีสต์

ปัจจุบันพบว่ามียีสต์หลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวในระหว่างการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยวเชื้อ เช่น *Yarrowia lipolytica Sacharomycopsis lipolytica Candida oleophila C. tropicalis C. citroformans* และ *Zygosaccharomyces* sp. พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. (Marison, 1988) และสายพันธุ์ *Yarrowia lipolitica* (Mattey, 1992) เป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง สายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ต้องมีความสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง ในขณะเดียวกันผลิตกรดไอโซซิตริคต่ำ เป็นสายพันธุ์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดและใช้เวลาในการหมักสั้น

1.8.2. แหล่งอาหาร

1.8.2.1 แหล่งคาร์บอน

การผลิตกรดมะนาวของยีสต์ในระดับอุตสาหกรรมสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กลูโคส กากน้ำตาล ไฮโดรคาร์บอน อะซิเตรต อัลกอฮอร์ กรดไขมันและน้ำมันธรรมชาติเป็นต้น (Marrison,1988 ; Grewal and Karla, 1995) โดยแหล่งคาร์บอนที่เลือกใช้ต้องมีราคาถูก และหาได้ง่ายเพื่อลดต้นทุนการผลิต น้ำตาลกลูโคสจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ยีสต์นำไปใช้ได้ดีและรวดเร็วแต่ราคาแพง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาแหล่งคาร์บอนที่ถูกกว่า Shah และคณะ (1993) ได้รายงานว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้ว(tapioca starch hydrolysate) ที่สมมูลเดกซ์โตสร้อยละ

94-95 สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีสำหรับผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Y. lipolytica* (DS-1)

1.8.2.2 แหล่งของไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ไนโตรเจนและสารอนินทรีย์ไนโตรเจน แหล่งของอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ เปบโตน ส่วนแหล่งของสารอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมอะซิเตรด ยูเรีย และแอมโมเนีย เป็นต้น การใช้แหล่งของไนโตรเจนอาจจะใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือใช้ควบคู่กันก็ได้ ในการผลิตกรดมะนาวจากเชื้อจุลินทรีย์ควรจะใช้ในปริมาณที่จำกัดเนื่องจากการสะสมกรดมะนาวจะเกิดขึ้นหลังจากแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดไปแล้ว (Kubicek and Rohr,1989 ;Mckay *et al.*,1994; Potvin *et al.*,1988; Rane and Sims,1993) ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.5-1.0 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.8.2.3 แหล่งของฟอสเฟต

ฟอสเฟตก็เป็นสารที่จำเป็นสำหรับยีสต์ในการเจริญและผลิตกรดมะนาว การสะสมของกรดมะนาวจะเกิดขึ้นเมื่อมีฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่จำกัด (Kubicek and Rohr, 1986; Mckay *et al.*,1993) ในปี 1970 Shimizu และคณะ รายงานว่าโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งของฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดมะนาว โดยยีสต์สายพันธุ์ *Candida sp.* (อ้างถึงใน Abou-zeid and Ashy, 1984)

1.8.2.4. แร่ธาตุ(Trace elements)

แร่ธาตุก็เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของจุลินทรีย์ มีแร่ธาตุหลายชนิดเช่น Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, และ Mn^{2+} มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวของรา *A. niger* (Grewal and

Kalra, 1995) ปริมาณความต้องการแร่ธาตุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ในการผลิตกรดมะนาวจากเชื้อยีสต์พบว่าแร่ธาตุหลายชนิดมีความสำคัญต่อการผลิตกรดมะนาว เช่น $MgSO_4$,$MnSO_4$,$FeSO_4$ และ$CuSO_4$ ในปี 1977 Marchal และคณะรายงานว่า Fe^{2+} มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวมากที่สุด พบว่าถ้าเติม $FeSO_4.7H_2O$ ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 400 มิลลิกรัมต่อลิตรจะทำให้ผลผลิตกรดมะนาวของ *Saccharomycopsis lipolytica* ลดลงร้อยละ 30 ในปี1970 Tabuchi รายงานว่าความเข้มข้นของ Fe^{2+} สูงๆ จะไปเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์อะโคนิเตสให้สูงขึ้น มีผลทำให้กรผลิตกรดมะนาวลดลง Hamissa และคณะ(1978) พบว่าการผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเติม $FeSO_4.7H_2O$ 0.05 กรัมต่อลิตร และ $MnSO_4.4H_2O$ 0.02 กรัมต่อลิตร Fried (1972) การเลี้ยงยีสต์ *Candida sp.* ในอาหารที่มีตะกั่วในปริมาณ 0.5-1.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าอาหารที่ไม่ได้เติมตะกั่ว Rymowicz และคณะ (1993) รายงานว่าการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึง *C. lipolytica* จะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีส่วนประกอบของ $FeSO_4.7H_2O$ เข้มข้น 21 มิลลิกรัมต่อลิตรและ $MnSO_4$ เข้มข้น 0.02 กรัมต่อลิตร

1.8.2.5 ไขมัน

เมื่อเติมไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น น้ำมันพืช และกรดไขมัน จะเพิ่มผลิตกรดมะนาว เนื่องจากไขมันจะแตกตัวให้กลีเซอรอลและกรดไขมันซึ่งจะเข้าสู่ขบวนการไกลโคไลซีส

1.8.2.6. สารเสริมอื่นๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวจะมีการเติมสารเสริมบางชนิดซึ่งเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการผลิดกรดมะนาว เช่น ไธอะมิน กรดนิโคตินิกและไบโอติน โดยเฉพาะไธอะมิน เป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของยีสต์ในการผลิตกรดมะนาว (Kubicek and Rohr,1986) ในปี 1980

Hamissa และคณะ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มี ไธอะมิน กรดนิโคตินิกและไบโอติน เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งเสริมให้ *C. lipolytica* ผลิตกรดมะนาวได้มากขึ้น

1.8.3 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวใช้ในการหมัก

1.8.3.1 ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การควบคุมความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์และวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้นในระหว่างการหมักจะมีการสะสมกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้นมีผลทำให้น้ำหมักเป็นกรดมากขึ้นดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงลดลงซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์มีผลทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง (Moresi *et al.*,1980) โดยทั่วไปแล้วการผลิตกรดมะนาวจะเติมสารบางอย่างลงไปเพื่อควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต (Kautola *et al.*, 1991; Shah *et al.*,1993; Rymowicz *et al.*,1993) ซึ่งนิยมเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น ปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดมะนาวที่เชื้อนั้นผลิต โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Wejtatowicz *et al.*,1991; Mckay *et al.*,1994) จะเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการหมัก และแคลเซียมไฮดรอกไซด์(Rottini and Cardini, 1981)จะเตรียมในรูปสารแขวนลอยในน้ำและเติมลงในอาหารเลี้ยงชื้อระหว่างการหมัก เป็นต้น

ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์อยู่ในช่วง 4.5 - 6.5 (Kubicek and Rohr, 1986)

1.8.3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ โดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส (Marison,1988) ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์

1.8.3.3 อัตราการกวนและการให้อากาศ

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ ต้องมีการให้อากาศในระหว่างการหมัก โดยเฉพาะช่วงที่ที่เชื้อมีการเจริญจำเป็นต้องให้อากาศอย่างเพียงพอ การถ่ายเทอากาศในถังหมักขึ้นอยู่กับอัตราการให้อากาศ อัตราการกวน องค์ประกอบและสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความดันและอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (Rane and Sims,1994)

1.8.3.4 ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักกรดมะนาวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการหมัก อาหารและสภาวะที่ใช้ในการหมัก

1.8.4 กระบวนการหมักกรดมะนาว

1.8.4.1 กระบวนการหมักบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Surface fermentation)

เป็นกระบวนการผลิตที่ใช้ผลิตกรดมะนาวในอุตสาหกรรมครั้งแรกจากรา *A. niger* เป็นกระบวนการหมักที่ใช้พลังงานและค่าใช้จ่ายต่ำ การหมักแบบนี้จุลินทรีย์จะเจริญอยู่บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้กากน้ำตาล ที่ผ่าการฆ่าเชื้อบรรจุใส่ถาดที่มีขนาด 50-100 ลิตร มีพื้นที่ผิว 5 ตารางเมตร ความลึกของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5-20 เซนติเมตร ถาดอาหารทำด้วยอลูมิเนียมบริสุทธิ์หรือ เหล็กกล้า ถาดแต่ละถาดจะบรรจุอยู่ในชั้นเรียงอยู่ในตู้หมัก(Fermentation chamber) ที่ปราศจากเชื้อที่ปนเปื้อน ปัจจัยการหมักจะต้องควบคุมอย่างดี เช่น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์และการหมุนเวียนอากาศเป็นต้น

4.2 กระบวนการหมักในอาหารเหลว (Submerge fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่นิยมใช้ผลิตกรดมะนาวในปัจจุบัน เนื่องจากใช้พื้นที่ในการหมักน้อย ใช้แรงงานต่ำและให้ผลผลิตสูง เป็นการหมักในถังหมักที่มีระบบควบคุมการกวน การให้อากาศ ถังหมักมีการออก

แบบหลายชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักมีการฆ่าเชื้อก่อนการหมักทุกครั้ง กระบวนการหมักแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนการเจริญ ขั้นตอนที่ 2 คือขั้นตอนการผลิตกรดมะนาว เป็นขั้นตอนที่ถ่ายหัวเชื้อจากขั้นตอนที่1ลงในถังหมัก ควบคุมสภาวะต่างๆในการหมักเช่น อุณหภูมิ การกวน การให้อากาศ และ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะเวลาในการหมักขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

การหมักแบบนี้แบ่งตามวิธีการหมักได้หลายแบบ เช่นการหมักแบบ Bacth การหมักแบบต่อเนื่อง(Continuous fermentation) การหมักแบบ fed-batch fermentation

กระบวนการหมักแบบ fed-batch fermentation เป็นการหมักที่มีการที่มีการเติมสารอาหารลงไปในระหว่างการหมัก โดยไม่มีการดึงเอาน้ำหมักออกจากถังหมักในระหว่างการหมัก ปริมาณน้ำหมักจะเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก การหมักแบบนี้เป็นการหลีกเลี่ยงปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่มากเกินไปซึ่งปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มากเกินไปนี้จะทำให้เกิด product repression ทำให้ผลผลิตกรดมะนาวลดลง

1.9 ประโยชน์ของกรดมะนาว

กรดมะนาวถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆเนื่องจากกรดมะนาวมีรสเปรี้ยว ละลายน้ำได้สูงมีความเป็นพิษต่ำ มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะและการเป็นบัฟเฟอร์ กรดมะนาวที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมจะอยู่ในรูปแอนไฮดรัส โมโนไฮเดรต ในรูปของเกลือและเอสเทอร์ของกรดมะนาว ประมาณร้อยละ 70 ของกรดมะนาวใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ประมาณร้อยละ 12 ใช้ในอุตสาหกรรมทางด้านเภสัชกรรม และร้อยละ 18 ของกรดมะนาวใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ (Shah *et al.*, 1993) ซึ่งประโยชน์ของกรดมะนาวในอุตสาหกรรมมีดังนี้

1.9.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

กรดมะนาวนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เนื่องจากกรดมะนาวสามารถละลายน้ำได้สูง ย่อยสลายได้ง่าย มีความเป็นพิษต่ำ มีรสเปรี้ยวที่ยอมรับได้และเพิ่มรสชาติในน้ำผลไม้และป้องกันการเน่าเสียของน้ำเชื่อม น้ำหวาน ลูกกวาด เยมและเยลลี ใช้เป็นตัวปรับกรด(acidulant)ในอาหารกระป๋องหรือน้ำขวด ป้องกันการเกิดออกซิไดซ์ของกรดเอสคอบิค (ascorbic acid) หรืออิริธอร์บิค (erythobic acid) และควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารจำพวกเยลลี เจลลาติน เพื่อให้เกิดเจลได้นานที่สุด ช่วยเพิ่มรสชาติในอาหารผลิตภัณฑ์พวกเนยแข็งและเนยเหลว ใช้ป้องกันการเหม็นหืนในอาหารที่มีไขมัน ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในอาหารแช่แข็ง ป้องกันการเปลี่ยนสีของเนื้อสัตว์จำพวกปลาและกุ้งที่มีไขมันโดยการจุ่มลงในสารละลายผสมระหว่างกรดมะนาวกับกรดแอสคอบิค ใช้ป้องกันการตกผลึกของน้ำผึ้ง ป้องกันการเปลี่ยนสีของหัวน้ำหอม

1.9.2 อุตสาหกรรมทางด้านเภสัชกรรม

กรดมะนาวที่ใช้ในการทำยามักจะอยู่ในรูปเกลือของกรดมะนาว เพื่อใช้ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นส่วนผสมของยาลดกรดในกระเพาะอาหารที่ทำให้เกิดฟองฟู่เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดมะนาวกับไบคาร์บอเนต-คาร์บอเนตในน้ำเกิดเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เฟอร์ริคซิเตรด (ferric citrate) ใช้เป็นแหล่งธาตุเหล็กสำหรับคนที่เป็นโรคโลหิตจาง โซเดียมซิเตรดใช้เติมลงไปในเลือดที่เจาะออกจากร่างกายเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และเกลือของกรดมะนาวใช้เป็นบัฟเฟอร์ในยาบางชนิดเพื่อให้เกิดการคงตัวของส่วนผสมของยา ใช้เป็นตัวปรับกรด-ด่างของเครื่องสำอาง ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นซึ่งเกิดจากโลหะหนักบางตัวในเครื่องสำอาง เป็นส่วนผสมของยาสระผม ครีมนวดผม โลชั่น เป็นต้น

1.9.3 อุตสาหกรรมอื่นๆ

กรดมะนาวนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆอีกจำนวนมากเนื่องจากไม่เป็นพิษ ไม่กัดกร่อน ย่อยสลายได้ง่าย อุตสาหกรรมที่สำคัญที่ใช้กรดมะนาว นอกเหนือจากที่กล่าวข้างต้นได้แก่

1.9.3.1 อุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก

ใช้กรดมะนาวในรูปโซเดียมซิเตรทแทนการใช้เตตราโปแตสเซียมไพโรฟอสเฟตที่เป็นส่วนผสมของผงซักฟอก เนื่องจากเป็นสารที่ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของวัชพืชในน้ำเช่น สาหร่ายบางชนิดเป็นต้น ไม่เป็นพิษต่อปลาและมีวงจรห่วงโซอาหารสั้นกว่าฟอสเฟต นอกจากนั้นอาจใช้แทนแคลเซียมหรือโซเดียมคาร์บอเนต เพื่อเป็นการลดการเกิดคราบหินปูนเกาะติดเครื่องซักผ้า

1.9.3.2 อุตสาหกรรมผลิตพลาสติค

ใช้กรดมะนาวในรูปไตรเอทธิล (triethyl) อะซิติล ไตรเอทธิล(acethyl triethyl) ในการทำพลาสติคจำพวกสารประกอบพอลิไวนิล คลอไรด์ (polyvinyl chloride) และทำฟิล์มเซลลูโลลิค (cellulolic films) นอกจากนั้นยังใช้ทำพลาสติคที่ใช้ห่อหุ้มอาหาร โดยผ่านการตรวจรับรองจากอาหารและยา ของสหรัฐอเมริกา (FAD) แล้วว่าปลอดภัย

1.9.3.3 ระบบการจำกัดซัลเฟอร์ไดออกไซด์

ในระบบการจำกัดก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ในเหมืองถ่านหินและโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้ถ่านหินเป็นแหล่งพลังงาน จะใช้สารละลายผสมของโซเดียมซิเตรด กรดมะนาว และโซเดียมไฮโอซัลเฟต เป็นตัวดูดซับก๊าซที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังใช้ในการชำระล้างสนิมและน้ำมันดินออกจากโลหะ ใช้ทำความสะอาดหม้อน้ำโรงงานอุตสาหกรรมโดยการจับกับอิออนของโลหะบางชนิด เช่น นิคเกิล เหล็ก และทองแดง เกิดเป็นสารที่ละลายน้ำได้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.10 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

จากการที่กรดมะนาวมีความสำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมยา เป็นต้น ประเทศไทยมีความต้องการสูงจึงต้องนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศเป็นจำนวนมากเพื่อให้พอเพียงกับความต้องการของตลาดทำให้มูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวเพิ่มสูงขึ้นทุกปี แสดงดังตารางที่ 2 ประกอบกับการผลิตกรดมะนาวนั้นสามารถทำได้สามารถผลิตได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตจึงจำเป็นอย่างยิ่ง นอกจากการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น การพัฒนากระบวนการผลิตโดยการนำเอาเทคนิคใหม่ๆมาใช้ เช่น เทคนิคการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถรักษาสมบัติของเซลล์ที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ ให้มีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและการที่สามารถนำเอาเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่อย่างต่อเนื่องได้นั้น จะเป็นการลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้การนำเอาวัตถุดิบที่ผลิตได้ภายในประเทศเช่น มันสำปะหลังมาเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตกรดมะนาว นอกจากจะเป็นการลดต้นทุนการผลิตแล้วยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่วัตถุดิบชนิดนั้นๆด้วย แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่ผลิตได้จากหัวมันสำปะหลังซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ได้ทำการเพาะปลูกมันสำปะหลังในปริมาณมากทำให้ราคามันสำปะหลังมีราคาถูก ประเทศไทยได้ส่งแป้งมันสำปะหลังเป็นสินค้าออกไปขายทั่วโลกแต่มูลค่าการส่งออกค่อนข้างต่ำ (ตารางที่ 3) แป้งมันสำปะหลังมีส่วนประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรทเป็นส่วนใหญ่ เหมาะสำหรับที่จะนำไปเป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมการหมัก ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้นำเอาแป้งมันสำปะหลังมาย่อยด้วยเอนไซม์ จะได้น้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ Shah และคณะ(1993) รายงานว่าแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีสมมูลเดกซ์โตสร้อยละ 90-95 เหมาะที่นำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาว

ตารางที่ 2 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าและส่งออกกรดมะนาวในประเทศไทย ระหว่างปี 2531-2540

ปี พ.ศ.	การนำเข้า		การส่งออก	
	ปริมาณ (กิโลกรัม)	มูลค่า (บาท)	ปริมาณ (กิโลกรัม)	มูลค่า (บาท)
2531	771,111	26,127,503	122,335	4,497,815
2532	1,460,893	45,802,953	26,800	958,788
2533	2,113,734	57,264,118	-	-
2534	2,398,451	64,844,372	-	-
2535	3,985,387	131,742,434	1,600	79,788
2536	2,226,539	72,735,321	-	-
2537	3,484,410	101,905,659	-	-
2538	3,826,454	144,210,978	123,137	4,779,426
2539	3,056,073	102,561,454	6,725	3,901,360
2540*	4,232,122	137,960,999	19,524	12,930,205
ม.ค.-ต.ค.				

ที่มา : กรมศุลกากร

จากการศึกษาของ เรวดี เลิศไตรรักษ์ (2535) ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัลพาราฟฟินส์ พบว่ายีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีคือ *C. oleophila* C-73 จากการศึกษาของประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) พบว่า *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และจากการศึกษาการนำเอาเทคนิคการตรึงเซลล์ยีสต์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาวโดย ภรณี ลิมปิสุต (2538) เมื่อใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะในการตรึงเซลล์พบว่าเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดี เซลล์ตรึงมีความเสถียรสูง สามารถเก็บเซลล์ตรึงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีการศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกแป้งมันสำปะหลังของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2534-2540

ปี พ.ศ.	ปริมาณที่ส่งออก (กิโลกรัม)	มูลค่าการส่งออก (บาท)
2534	295,140,190	1,787,450,241
2535	318,562,014	1,840,411,172
2536	216,113,635	1,158,301,128
2537	466,767,684	2,619,651,418
2538	447,624,757	3,487,743,769
2539	451,124,862	3,358,476,469
2540* (ม.ค.-ต.ค.)	516,104,973	3,624,919,536

ที่มา : กรมศุลกากร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.11 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์ *C. oleophila* C-73 โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะในการตรึงให้ได้ปริมาณมากและรวดเร็ว

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้เซลล์ตรึงของยีสต์ *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.12 ขั้นตอนการทำวิจัย

1. ศึกษาการเจริญของ *C. oleophila* C-73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญ

2. ศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.ศึกษาผลการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตกรดมะนาว โดยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

4. ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในการผลิตกรดมะนาว โดยเซลล์ตรึง *C. oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย