บทที่ 1

บทนำ

ความหมายและประวัติของการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

1. ความหมายของการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

การตรึงเซลล์ได้ดัดแปลงมาจากการตรึงเอนไซม์ โดยเป็นการจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางฟิสิกส์ของเซลล์ให้อยู่ในบริเวณที่ที่กำหนด แต่เซลล์ยังคงรักษาสมบัติในการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ ให้มีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและสามารถใช้เซลล์ตรึงนี้ซ้ำและใช้อย่างต่อเนื่องได้ โดยเซลล์ที่ถูกตรึงนี้อาจอยู่ในสถานะเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพักหรือเซลล์ที่ตายแล้ว (Chibata and Wingard,1983) นอกจากนี้การตรึงเซลล์ยังเป็นการลดขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยไม่ทำให้เสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา

2. วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

เทคนิคในการตรึงเซลล์มี 3 วิธีคือ การยึดด้วยตัวนำ (Carrier-binding method) การเชื่อมแบบไขว้ (Cross-linking method) และการกักขัง (Entrapment method) (Chibata et al.,1978)

2.1 การยึดด้วยตัวนำ (Carrier-binding method) หมายถึงการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์กับสารพาหะโดยตรง แบ่งได้ 2 วิธี คือ

2.1.1 การใช้พันธะโควาเลนท์ (Covalent binding method) เป็นวิธีการเชื่อมเซลล์โดยตรงกับสารพาหะ โดยสารที่ใช้เชื่อมนั้นสามารถต่อกับส่วนประกอบที่ยึดเซลล์ ได้แก่ กลุ่มอะมิโน กลุ่มคาร์บอกซิล กลุ่มซัลฟไฮดริล กลุ่มไฮดรอกซิล กลุ่มอิมิดาโซล หรือกลุ่มฟินอลของโปรตีน วิธีนี้มีข้อดี คือเซลล์เชื่อมอยู่กับผิว

หน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดี และการรั่วไหลของเซลล์น้อย (Cheetham, 1980) แต่ก็มีข้อเสียเนื่องจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ค่อนข้างรุนแรง และความเป็นพิษของสารที่ใช้อาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้

2.1.2 การเกาะหรือดูดซับ (Adsorption method) เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับกับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิก หรือพันธะไฮโดรเจน (Cheetham,1980) โดยอาศัยหลักทางธรรมชาติเคมี เนื่องจากผนังของเซลล์ประกอบด้วย diaminopimelic acid และ hexosamines ซึ่งสามารถเกิดพันธะไอออนิกกับตัวนำได้ (Koshcheenko,1981) การตรึงวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนและมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่าย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง การไหลของน้ำ การเกิดฟองอากาศ และเมื่อมีการแบ่งเซลล์

2.2 <u>การเชื่อมไขว้</u> (Cross-linking method) หมายถึงการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกัน โดยใช้สารพวกไบ-(bi-) หรือ มัลติฟังชั่นนอลรีเอเจน (multifunctional reagent) เช่น กลูทาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และโทลูอีน ไดไอโซไซยาเนต (toluene diisocyanate) (Chibata et al.,1978) เป็นต้น วิธีนี้จะใช้สารเคมีภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างจะรุนแรง ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการดำรงชีวิตได้

2.3 <u>การกักขัง</u> (Entrapping method) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ

2.3.1 การตรึงแบบไมโครแคปซูล (Microencapsulation) หมายถึง การกักขังเซลล์ไว้ในเยื่อกึ่งผ่านได้ (semipermeable membrane) เช่น collodian หรือ silicone ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่ยอมให้ซับสเตรตและผลผลิตซึมผ่านได้อย่างมีอิสระ การตรึงด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายแต่ไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหาการตกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย (Cheetham,1980)

2.3.2 การตรึงแบบแลททิช (Lattic type) หมายถึงการตรึงเซลล์โดยการกักขังไว้ภายในช่องว่าง 3 มิติ ในเจลของสารโพลิเมอร์ การตรึงเซลล์โดยวิธีกักขังทั่วไปจะหมายถึงแบบแลททิช ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิด ในขณะที่วิธีการอื่นมีข้อจำเพาะและข้อเสียเปรียบมากกว่า (Cheetham,1980) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการกักขังนี้นิยมใช้สารพวก bichemically inert hydrogel เป็นตัวกักขัง โดยใช้หลักการเกิดเจลซึ่งทำให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติ ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน โดยกลไกในการเกิดเจลขึ้นกับสารพาหะที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 1 (ภาวิณี,2531)

เนื่องจากการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลายวิธี ดังนั้นสมบัติของสารพาหะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีอาจมีข้อปลีกย่อยแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกันคือ สมบัติทางกลไก (mechanical properties) สมบัติทางฟิสิกส์ (physical properties) ความแข็งแรง (strength) ความชอบน้ำ (hydrophilicity) สภาพให้ซึมได้ (permeability) ทนต่อสภาพแวดล้อมทางฟิสิกส์ สารเคมีและการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เนื่องจากการตรึงเซลล์ต้องทำในสภาวะปลอดเชื้อ (sterile) ต้องเลือกสารพาหะที่ทนต่อความร้อนและความดันได้สูง สารพาหะไม่ควรเป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม และไม่ควรกระทบกระเทือนต่อระบบเมตาบอลิซึม (metabolism) นอกจากนี้อาจพิจารณาในด้านราคา การยอมรับและความสามารถในการนำกลับมาใช้ได้อีก (วิเชียร,2524 และ ภาวิณี,2531)

3. สารพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

3.1 อัลจิเนต เป็นสารที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลเช่น *Macrocystis pyrifera* เป็นต้น มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นโพลิเมอร์ร่วมของ D-manuronate (M) และ L-guluronate (G) residues อัลจิเนตสามารถเกิดเจลได้ เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะ เช่น อะลูมิเนียมไอออน (Al^{3+}) หรือแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) โดยมีการแทนที่ของไอออนของสารโลหะเหล่านี้ ทำให้เกิดเจลเป็นโครงสร้าง 3 มิติ เรียกการเกิดเจลชนิดนี้ว่าไอโอโนโทรปิค (ionotropic gelation)

ตารางที่ 1 แสดงกลไกการเกิดเจลโดยสารพาหะ เมื่อใช้วิธีการกักขัง

กลไกการเกิดเจล	สารพาหะ
พอลิเมอร์ไรเซชั่น	พอลิเอไครลาไมด์
	พอลิเมทาไครเลท
การเชื่อมไขว้	พรีพอลิเมอร์
	โปรตีน
พอลิคอนเดนเซชั่น	พอลิยูเรเทน
	เอพอกซีเรซิน
การเกิดเจลเนื่องจากความร้อน	คอลลาเจน
	เจลลาติน
	เอการ์/เอกาโรส
	แคปปา-คาร์ราจิแนน
การเกิดเจลแบบไอโอโนโทปิก	อัลจิเนต
	ชิโทซาน
การตกตะกอน	เซลลูโลส
	เซลลูโลสไตรอะซิเตต

การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตนี้ ทำได้โดยการผสมเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต แล้วหยดลงบนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดเป็นเจลของแคลเซียมอัลจิเนตขึ้นทันที หลังจากนั้นควรแช่เจลที่ได้ไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้การเกิดเจลอย่างสมบูรณ์ (complete gelation) (Bucke,1987) คุณสมบัติของเจลที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของอัลจิเนตที่ใช้ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิด ความเข้มข้นของไอออนโลหะและปริมาณเซลล์ที่ใช้ด้วย (Cheethem et al.,1979)

การใช้แคลเซียมอัลจิเนตในการตรึงเซลล์ มีข้อดีหลายประการคือ สามารถทำได้ง่ายในสภาวะปกติ สะดวกและรวดเร็ว ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต และการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตยังเป็นวิธีที่ปลอดภัย เนื่องจากอัลจิเนตเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ และยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร (food additive) มาเป็นเวลานาน เนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตสามารถแบ่งเซลล์ได้ภายในเจล ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีอยู่เป็นเวลานาน แต่เซลล์บางส่วนอาจหลุดออกนอกเจล ทำให้เกิดการปนเปื้อนในผลผลิตได้

3.2 <u>คาร์ราจิแนน</u> เป็นชื่อทั่วไปของ galactans เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดงพวก *Chondrus*, *Gigartina* และ *Eucheuma* เป็นต้น ประกอบด้วย 3,6-anhydrous-β-D galactose คาร์ราจิแนนที่สกัดได้นี้สามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน คือ แคปปา (kappa) ไอโอตา (iota) และ แลมดา (lamda) แต่ส่วนที่สามารถเกิดเจลได้มี 2 ส่วนคือ แคปปา และ ไอโอตา โดยเป็นการเกิดเจลโดยใช้ความร้อน (thermal gelation) การตรึงเซลล์โดยทั่วไปนิยมใช้ แคปปา-คาร์ราจิแนน (ภาวิณี 2531)

การตรึงเซลล์ด้วยแคปปา-คาร์ราจิแนน ทำได้โดยการเตรียมสารละลายคาร์ราจิแนนให้ร้อนประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้คาร์ราจิแนนละลาย เพื่อผสมเซลล์ลงไปที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส แล้วหยดลงในสารละลายของเกลือโปตัสเซียม หรือเกลือแอมโมเนียมที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดเจลขึ้น (Chibata et al.,1987)

การใช้แคปปา-คาร์ราจิแนนในการตรึงเซลล์ มีข้อดีหลายประการ คือ วิธีการง่าย สะดวกรวดเร็วและปลอดภัย เนื่องจากคาร์ราจิแนนเป็นสารที่ยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร มีการใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง ซึ่งทำหน้าที่เป็น gelling, thicking และ stabilizing agent และการตรึงสามารถตรึงเซลล์ได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง ไม่มีการใช้สารเคมีในการทำลายกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ของเซลล์ เซลล์ที่ถูกตรึงนี้สามารถเจริญและแบ่งเซลล์ภายในเจลได้ เช่นเดียวกับอัลจิเนต

3.3 <u>เจลลาติน</u> เป็นอนุพันธ์ที่ได้จากการย่อยคอลลาเจน เป็นโปรตีนสายยาว มีมวลโมเลกุลเฉลี่ย 69,000-80,000 นอกจากนี้ยังเป็นโปรตีนธรรมชาติ มีความชอบน้ำสูง ดังนั้นเมื่อผสมกับน้ำแล้วทำให้พองตัวได้เป็นอย่างดี และลดความต้านทานของการเคลื่อนที่ของมวล (mass transfer) ตลอดจนการแพร่ของซับสเตรทและการเกิดปฏิกิริยาของผลิตภัณฑ์ ซึ่งได้นำมาใช้ในการตรึงเซลล์ เจลาตินเป็นสารที่ยอมรับให้เป็นวัตถุที่เจือปนในอาหารได้เช่นเดียวกับอัลจิเนตและแคปปา-คาร์ราจิแนน (ภาวิณี 2531)

การตรึงเซลล์โดยใช้เจลลาติน สามารถทำได้โดยการผสมเซลล์กับสารละลายเจลลาตินที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วทำให้สารผสมเย็นลง จะได้เจลที่กักขังเซลล์ไว้ การเกิดเจลของเจลลาตินสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ และสามารถแปรผันกลับ (reversible) ได้โดยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและกลไกการเกิดเจลไม่เสถียร แต่อย่างไรก็ตามอาจแก้ไขได้โดยการใช้สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) เป็นสารช่วยเพิ่มความเสถียร (hardening agent) (Scardi,1987)

4. <u>ประวัติของการตรึงเซลล์จุลินทรีย์</u>

การตรึงเซลล์ เกิดขึ้นจากแนวความคิดของการสังเกตธรรมชาติ จากการใช้จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมบางชนิด ที่มีเซลล์จุลินทรีย์จับที่ผิวของของแข็งหรือสร้างเป็นแผ่นฟิลม์ แล้วนำมาดัดแปลงเป็นเทคนิคการตรึงเซลล์ขึ้น มีการอธิบายถึงการตรึงเซลล์ครั้งแรกในปี 1960 โดย Hattori และ Furusaka ได้ตรึงเซลล์ที่มีชีวิตของ *Escherichia coli* และ *Azetobactor agile* ไว้บนไดเวกซ์-1 (Dowwex-1) พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึง

นี้สามารถออกซิไดซ์กลูโคสและกรดซัคซินิคได้ (อ้างถึงใน Chibata,1978) หลังจากนั้นเป็นต้นมา งานวิจัยที่มีการใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ได้มีเพิ่มมากขึ้น และประสบผลสำเร็จในระดับอุตสาหกรรมในปี 1973 โดยมีการนำเซลล์ตรึงของ *E.coli* มาใช้ในกระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่องของกรดแอสพาร์ติก (L-aspartic acid) ซึ่งนับเป็นอุตสาหกรรมแห่งแรกของโลกที่ใช้ระบบเซลล์ตรึง (Chibata et al.,1974) ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ตรึงในกระบวนการผลิตมีมากขึ้นดังเช่น ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์โดยเซลล์ตรึงของยีสต์ (Nguyen and Shieh,1992) กระบวนการผลิตกลีเซอรอลโดยเซลล์ตรึงของยีสต์ (Hecker et al.,1990) การผลิตกรดแลคติกโดยเซลล์ตรึงของแบคทีเรีย (Champagne et al.,1989) การผลิตกรดมะนาวโดยเซลล์ตรึงของเชื้อรา (Garg and Sharma,1992) และการผลิตกรดมะนาวโดยเซลล์ตรึงของเชื้อยีสต์ (Kautola et al.,1991) จะเห็นว่าสามารถประยุกต์ใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ได้กับจุลินทรีย์ ทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์

<u>ประวัติความเป็นมาของการผลิตกรดมะนาว</u>

กรดมะนาว (citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่สำคัญชนิดหนึ่ง พบทั่วไปทั้งในพืชและสัตว์ เนื่องจากเป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) พบมากในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยวเช่น มะนาว ส้มและองุ่น เป็นต้น กรดมะนาวถูกแยกและตกผลึกเป็นครั้งแรกจากน้ำมะนาวโดย Scheels ในปี 1784 (อ้างถึงใน Marison,1988;Mattey, 1992) กรดมะนาวที่แยกได้จากน้ำผลไม้เรียกว่า กรดมะนาวธรรมชาติ (natural citric acid) ในช่วงแรกของการผลิตกรดมะนาวออกจำหน่ายได้จากน้ำมะนาวเป็นหลัก แต่การผลิตกรดมะนาวไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาด ทำให้มีราคาแพง จึงได้มีผู้คิดค้นวิธีการผลิตกรดมะนาวโดยวิธีทางเคมีและโดยเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด ในปี 1880 Grimoux และ Adam สามารถสังเคราะห์กรดมะนาวจากกลีเซอรอล แต่การใช้วิธีทางเคมีพบว่าต้นทุนสูงและได้ผลผลิตคุณภาพต่ำ เนื่องจากต้องใช้ปฏิกิริยาหลายขั้นตอน (อ้างถึงใน Abou-Zeid and Ashy,1984;Mattey,1992;Milsom and Meers,1985)

ในปี 1893 Wehmer ได้พบจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Citromyces* (ปัจจุบันคือ *Penicillium*) ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้เป็นครั้งแรก ในปี 1917 Currie ได้พบเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน (อ้างถึงใน Mattey,1992;Milsom and Meers,1985) ในปี 1923 Currie ร่วมกับ บริษัท Chas. Pfizer & Co. Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา (อ้างถึงใน Miall,1978) ได้นำเชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้กระบวนการหมักบนผิวหน้าอาหาร (surface culture) จากวัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาล เรียกกรดมะนาวนี้ว่า กรดมะนาวจากการหมัก (fermentation citric acid) หลังสงครามโลกครั้งที่ 2 ได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตเป็นการหมักในสภาพอาหารเหลว (submerged culture) จากวัตถุดิบที่เป็นกลูโคสไซรัปหรือกากน้ำตาล (Periman,1949 อ้างถึงใน Milsom and Meers,1985) ในปี 1965 ได้มีผู้ค้นพบสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวจากการหมักในอาหาร ที่มีคาร์โบไฮเดรตและนอร์มัล-อัลเคน (Stottmister et al.,1982 อ้างถึงใน Milsom and Meers,1985) ปัจจุบันมีการผลิตกรดมะนาวออกจำหน่ายทั่วโลกประมาณ 400,000 ตันต่อปี ส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยเชื้อรา *A. niger* และบางส่วนจากเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* (Mattey,1992)

<u>การผลิตกรดมะนาวโดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์</u>

กรดมะนาวสามารถผลิตได้โดยอาศัยการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรียและยีสต์ ทั้งนี้เชื้อรา *A. niger* เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมมาตั้งแต่อดีต แต่การหมักโดยใช้เชื้อราต้องใช้เวลาในการหมักนานและสายพันธุ์ไม่คงที่ ส่วนแบคทีเรียมีการศึกษาเพื่อการผลิตกรดมะนาวน้อยมาก แต่มีบางวิธีที่ใช้ได้จดสิทธิบัตร ถือเป็นกรรมสิทธิ์ตามกฎหมาย (วราวุฒิ และ รุ่งนภา,2530) สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้เชื้อยีสต์นั้น มีข้อดีของการใช้เชื้อยีสต์แทนการใช้เชื้อราคือ อัตราการเจริญและการผลิตกรดมะนาวเร็วกว่า ง่ายต่อการควบคุม ใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดและยังสามารถพัฒนากระบวนการผลิตให้เป็นแบบต่อเนื่องได้ง่ายกว่า ปัจจุบันการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ

ยีสต์ มีการศึกษาทั้งในกระบวนการหมักแบบแบทช์ (batch fermentation process) และแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation process) (Klasson et al., 1989) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ยีสต์ในการผลิตกรดมะนาวด้วย

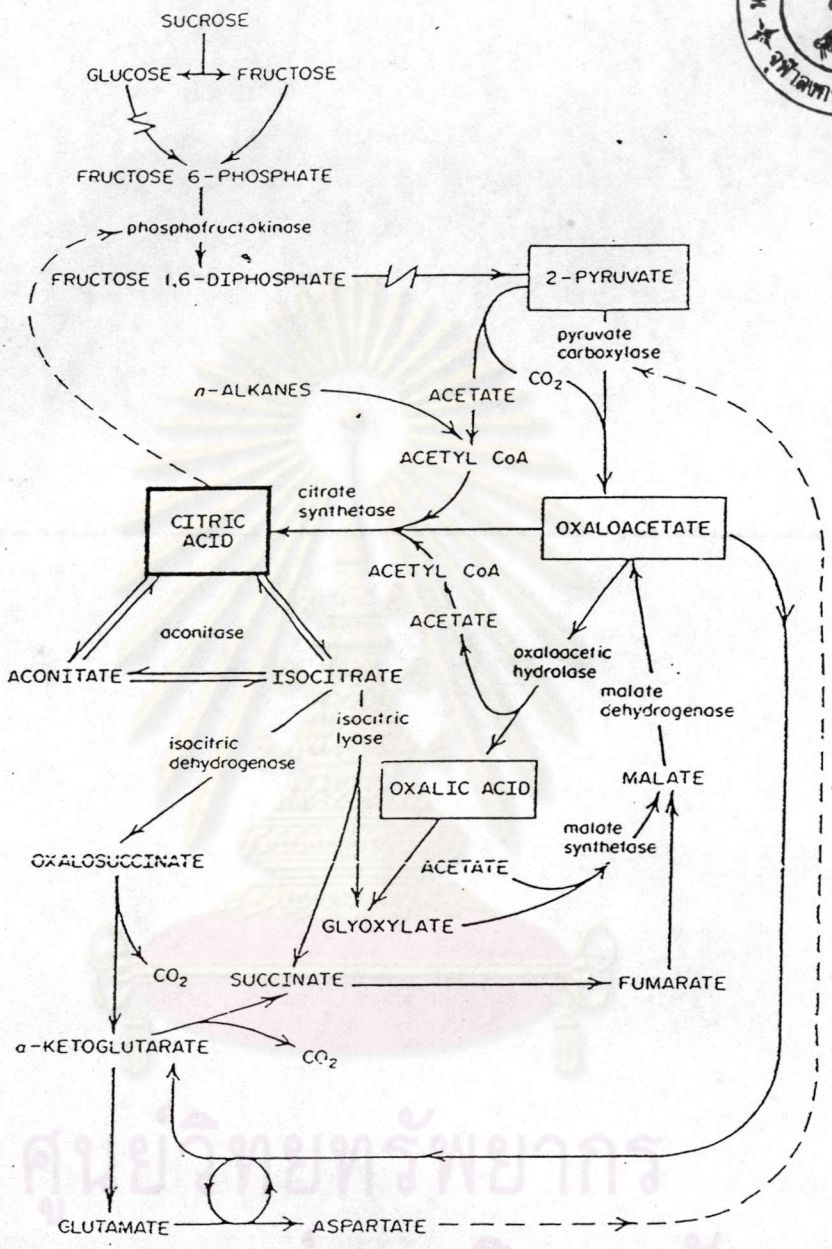
การผลิตกรดมะนาวโดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อยีสต์ มีการศึกษาในปี 1979 โดยการตรึงเซลล์ยีสต์ *Candida oleohpila* บนพอลิเอไครลาไมด์ (polyacrylamide) (Stottmeister,1979 อ้างถึงใน Kautola et al.,1991) และในปีเดียวกันนั้น Briffaud และ Engasser (1979) ได้ตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomycopsis lipolytica* โดยใช้ wood chip พบว่า เมื่อใช้เซลล์ตรึงของยีสต์มีข้อได้เปรียบในการหมักมากกว่าการใช้เซลล์อิสระเล็กน้อย ต่อมา Maddox และ Kingston (1983) ได้ใช้พอลิเอไครลาไมด์ตรึงเซลล์ *Saccharomycopsis lipolytica* ในการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีอัตราการผลิต 40-50 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยมีความเข้มข้นของกรดมะนาวเป็น 4.8 กรัมต่อลิตร และเซลล์ตรึงนี้สามารถเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน โดยไม่สูญเสียกิจกรรม (activity) และในปี 1991 Kautola และคณะ ได้ทำการตรึงเซลล์ยีสต์ *Yarrowia lipolytica* เพื่อผลิตกรดมะนาวโดยใช้สารพาหะ คือ แคลเซียมอัลจิเนต แคปปา-คาร์ราจิแนน พอลิ-ยูรีเทนเจล ไนลอนเวบ และพอลิยูรีเทนโฟม สำหรับการหมักในระดับขวดเขย่า พบว่าเมื่อใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะในการตรึงเซลล์ยีสต์ มีอัตราการผลิตกรดมะนาวสูงสุด 155 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเทียบกับการใช้สารพาหะชนิดอื่น และได้ศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยใช้เซลล์ตรึงในระดับถังหมักแบบแอร์ลิฟต์ (air lift fermentation) ด้วย นอกจากนี้ในปี 1993 Rymowicz และคณะ ได้ศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากเซลล์ตรึงของ *Yarrowia lipolytica* A-101 บนแคลเซียมอัลจิเนต ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับขวดเขย่า (repeated-batch shake flask) และระบบถังหมักต่อเนื่องแบบแอร์ลิฟท์ด้วย

ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์

กรดมะนาวเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle) ซึ่งแสดงในรูปที่ 1 สำหรับกลไกการผลิตกรดมะนาวจากน้ำตาลกลูโคสนั้น น้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวต (pyruvate) โดยวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) และไพรูเวตที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิติล-โคเอ (acetyl-CoA) เพื่อเข้าสู่วิถีการผลิตกรดมะนาว โดยอะซิติล-โคเอ ที่เกิดขึ้นจะรวมกับออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) โดยอาศัยเอนไซม์ซิเตรต ซินติเตส (citrate synthetase) ได้กรดมะนาวเกิดขึ้น ในระหว่างการสะสมกรดมะนาว ออกซาโลอะซิเตตถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาการสร้างทดแทน (anaplerotic reaction) ซึ่งเกิดจากไพรูเวตรวมกับคาร์บอนไดออกไซด์โดยอาศัยเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส (pyruvate carboxylase) (Milsom and Meers,1985) การสะสมกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นเนื่องจาก มีความผิดปกติของวัฏจักรเครปส์ โดยมีเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ อะโคนิเตส (aconitase) และไอโซซิเตรต ดีไฮโดรจิเนส (isocitrate dehydrogenase) ซึ่งในช่วงที่มีการผลิตกรดมะนาวเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ จะมีกิจกรรม (activity) ลดลง ในขณะที่เอนไซม์ซิเตรต ซินติเตส มีกิจกรรมสูงขึ้น (Marison,1988)

สมบัติของกรดมะนาว

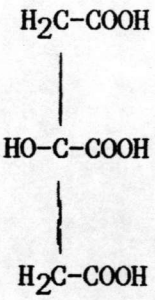
กรดมะนาว (Citric acid) หรือ กรด 2-ไฮดรอกซี-1,2,3-โพรเพนไตรคาร์บอกซิลิก (2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid) มีสูตรทางเคมีคือ $C_6H_8O_7$ น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 192.13 สูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2 กรดมะนาวมีค่า pK ที่ 25 องศาเซลเซียส ดังนี้ pKa_1 3.128, pKa_2 4.761 และ pKa_3 6.396 (Bouchard and Merritt,1979) ลักษณะทั่วไปเป็นผลึกสีขาว มีรสเปรี้ยว มีความเป็นพิษต่ำ ความสามารถในการละลายในน้ำได้สูง ขึ้นกับอุณหภูมิ และย่อยสลายได้ง่าย กรดมะนาวส่วนใหญ่ผลิตในรูปของกรดมะนาวแอนไฮดรัส กรดมะนาวโมโนไฮเดรต เกลือและเอสเทอร์ของกรดมะนาว (Marison,1988)



รูปที่ 1 วิถีการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ที่ผ่านทางวัฏจักรเครบส์

ที่มา : Milsom and Meers (1985)

---- หมายถึง การยับยั้งแบบย้อนกลับ (feedback inhibition)



รูปที่ 2 โครงสร้างของกรดมะนาว

ที่มา : Bouchard and Merritt (1979)

ประโยชน์ของกรดมะนาว

ได้มีการนำกรดมะนาวไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ในรูปแอนไฮดรัสโมโนไฮเดรต รวมทั้งในรูปของเกลือและเอสเทอร์ของกรดมะนาวด้วย ประมาณร้อยละ 75 ของกรดมะนาวใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ประมาณร้อยละ 10 ใช้ในอุตสาหกรรมทางด้านเภสัชกรรม และอีกร้อยละ 15 ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ (Bouchard and Merritt,1979 ; Mattey,1992) ซึ่งประโยชน์ของกรดมะนาวในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มีรายละเอียดต่อไปนี้

1. อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

กรดมะนาวเป็นกรดที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่มกันมาก ทั้งนี้เนื่องจากกรดมะนาวมีความสามารถในการละลายสูง ความเป็นพิษต่ำ และให้รสเปรี้ยวที่ยอมรับได้ ซึ่งจะใช้กรดมะนาวเป็นตัวปรับกรด (acidulant) ในอาหารกระป๋องหรือน้ำขวด เป็นตัวช่วยเพิ่มรสชาติ ป้องกันการบูดเสียในเครื่องดื่มและน้ำหวาน ป้องกันการเกิดออกซิไดซ์ของกรดแอสคอบิค (ascorbic acid) หรืออิริธอร์บิค (erythorbic acid) ในผลไม้แช่แข็ง และใช้เป็นตัวควบคุมความเป็นกรดด่างในขนมหวานจำพวกเยลลี่เจลลาติน เพื่อให้เกิดวุ้นขึ้นมากที่สุด และช่วยเพิ่มรสชาติ ใช้เป็นสารกันบูดและช่วยยืดอายุผลิตภัณฑ์จำพวกเนยแข็งและเนยเหลว ใช้เป็นสารป้องกันการเหม็นหืนในอาหารที่มีไขมัน

ป้องกันการเปลี่ยนสีของเนื้อสัตว์จำพวกปลาและกุ้งที่มีไขมัน · โดยการจุ่มลงในสารละลายผสมระหว่างกรดมะนาวกับกรดแอสคอบิค ใช้เป็นตัวป้องกันการตกผลึกของน้ำผึ้ง ป้องกันการเปลี่ยนสีของหัวหอม ซึ่งตัวปรับกรดที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มมีมากมายหลายชนิดด้วยกัน แต่อย่างไรก็ตามมีการใช้กรดมะนาวถึงร้อยละ 55-65 ของปริมาณทั้งหมด นอกจากนั้นก็มีการใช้กรดฟอสฟอริค (phosphoric acid) ร้อยละ 20-25 และกรดมาลิค (malic acid) ร้อยละ 5 ส่วนที่เหลือจะเป็นการใช้กรดประเภทอื่น ๆ เช่น กรดอะดิปิค (adipic acid) กรดแลคติค (lactic acid) กรดฟูมาริค (fumaric acid) และกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) เป็นต้น

2. <u>อุตสาหกรรมทางด้านเภสัชกรรม</u>

กรดมะนาวที่ใช้ในการทำยามักจะอยู่ในรูปเกลือของกรดมะนาว ได้แก่ ยาลดกรดในกระเพาะอาหาร มีส่วนผสมของกรดมะนาวกับไบคาร์บอเนต ซึ่งทำให้เกิดฟองฟู่ในน้ำดื่ม เฟอร์ริคซิเตรต (ferric citrate) ใช้เป็นแหล่งของธาตุเหล็ก สำหรับคนที่เป็นโรคโลหิตจาง หรือโซเดียมซิเตรตที่ใช้เติมลงในเลือดที่เจาะออกจากร่างกายเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด เป็นต้น

3. <u>อุตสาหกรรมทางด้านอื่น ๆ</u>

อุตสาหกรรมสำคัญที่ใช้กรดมะนาว นอกเหนือจากที่กล่าวข้างต้น ได้แก่

3.1 <u>อุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก</u>

ในระหว่างปี ค.ศ.1971-1972 อเมริกามีการออกกฎหมายควบคุมการใช้ฟอสเฟตเป็นส่วนผสมในผงซักฟอก ทำให้มีการใช้โซเดียมซิเตรตแทน เนื่องจากเป็นสารที่ไม่ช่วยเสริมการเจริญเติบโตของวัชชพืชในน้ำเช่น สาหร่ายบางชนิด เป็นต้น ไม่เป็นพิษต่อปลาและมีวงจรในห่วงโซ่อาหารสั้นกว่าฟอสเฟต นอกจากนั้นแล้วอาจใช้แทนแคลเซียมหรือโซเดียมคาร์บอเนต เพื่อลดการเกิดคราบของปูนเกาะติดเครื่องซักผ้าหรือผ้าที่ซัก

3.2 อุตสาหกรรมการผลิตพลาสติก

ใช้กรดมะนาวในรูปไตรเอทธิล (triethyl) อะซิติล ไตรเอทธิล (acetyl triethyl) ไตรบิวทิล (tributyl) หรือ อะซิติล ไตรบิวทิล (acetyl tributyl) ในการทำพลาสติกจำพวกสารประกอบ พอลิไวนิล คลอไรด์ (polyvinyl chloride) และทำฟิลม์เซลลูโลสิก (cellulosic films) นอกจากนั้นยังใช้ทำพลาสติกที่ใช้ห่อหุ้มอาหาร โดยผ่านการตรวจรับรองจากองค์การอาหารและยา ของสหรัฐอเมริกา (FAD) แล้วว่าปลอดภัย

3.3 ระบบการกำจัดกาซซัลเฟอร์ไดออกไซด์

ในระบบการกำจัดกาซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ในเหมืองที่ถลุงแร่โลหะและโรงงานที่มีการใช้ถ่านหินเป็นแหล่งผลิตพลังงาน จะใช้สารละลายผสมของโซเดียมซิเตรต กรดมะนาว และโซเดียมไฮโอซัลเฟต เป็นตัวดูดซับกาซที่เกิดขึ้น นอกจากนั้นยังใช้ในการชะล้างสนิมและน้ำมันดินออกจากโลหะ ใช้ทำความสะอาดหม้อน้ำของโรงงานอุตสาหกรรมโดยจะจับกับอิออนของโลหะบางชนิดเช่น นิเกิล เหล็ก และทองแดง เกิดเป็นสารที่ละลายน้ำได้ และป้องกันการเกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำของออกไซด์หรือไฮดรอกไซด์ ส่วนในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางจะใช้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อควบคุมความเป็นกรดด่างในครีมนวดผม น้ำยาดัดผม น้ำยาทำความสะอาดใบหน้า เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

จากการที่กรดมะนาวมีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม ประเทศไทยมีความต้องการใช้เพิ่มสูงขึ้นในแต่ละปี ต้องนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของตลาดภายในประเทศ ทำให้มูลค่าการนำเข้าสูงกว่ามูลค่าการส่งออกอย่างมาก ดังแสดงในตารางที่ 2 ประกอบกับการผลิตกรดมะนาวนั้นสามารถทำได้โดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณการผลิตจึงจำเป็นอย่างยิ่ง นอกจากการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น และการใช้วัตถุดิบที่ผลิตได้ภายในประเทศเพื่อลดต้นทุนการผลิตแล้ว การพัฒนากระบวนการผลิตโดยการนำเทคนิคการตรึงเซลล์จุลินทรีย์มาใช้ จึงมีความจำเป็นเพื่อรักษาสมบัติของเซลล์ในการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ ให้มีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และการที่สามารถใช้เซลล์ตรึงซ้ำและใช้อย่างต่อเนื่องได้นั้น จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตไปได้อีกส่วนหนึ่งด้วย

เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญและผลิตกรดมะนาวได้จากนอร์มัล-พาราฟฟินส์ (เรวดี,2535) และสามารถผลิตกรดมะนาวได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (ประเสริฐ, 2537) ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ โดยวิธีการกักขังมาประยุกต์ใช้กับยีสต์สายพันธุ์นี้ เพื่อนำเซลล์ตรึงของยีสต์นี้ไปผลิตกรดมะนาว ในระดับขวดเขย่า ให้ได้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดและสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้ด้วย และเพื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของยีสต์ในระดับขยายส่วนต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาวิธีการตรึงเซลล์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว ให้ได้ปริมาณสูงสุดและสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้เซลล์ตรึงของ *C. oleophila* C-73 ในการผลิตกรดมะนาวเปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์อิสระ ในระดับขวดเขย่า

ตารางที่ 2 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าและส่งออกของกรดมะนาวในประเทศไทย ระหว่างปี 2531-2537

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	79,477
2536	2,226,539	72,735,321	-	-
2537 (ม.ค.- ต.ค.)	3,015,358	87,925,046	-	-

ที่มา : กรมศุลกากร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการวิจัย

1. ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต
2. คัดเลือกสารพาหะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรึงเซลล์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ *C. oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73
5. ศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 เปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์อิสระ ในระดับขวดเขย่า
6. ศึกษาผลของแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว โดยใช้เซลล์ตรึงของ *C. oleophila* C-73
7. ศึกษาผลของสภาวะและระยะเวลาในการเก็บเซลล์ตรึงที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว โดยการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73
8. ศึกษาความสามารถในการใช้เซลล์ตรึงของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ซ้ำเพื่อผลิตกรดมะนาว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย