หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1. ประวัติความเป็นมา

กรดมะนาว(citric acid) มีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxy-1,2,3 propane tricarboxylic acid เป็นกรดอินทรีย์ที่พบทั้งในเซลล์พืชและสัตว์ โดยเป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle) พบมากในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะนาว สับปะรด ลูกแพร์ ลูกพีช เป็นต้น ในปี 1784 Scheele สามารถสกัดแยกและตกผลึกจากน้ำมะนาวได้เป็นครั้งแรก ดังนั้นในสมัยก่อนจึงมีการผลิตกรดมะนาวเป็นการค้าโดยสกัดจากผลไม้เรียกว่า natural citric acid ซึ่งมีความต้องการอย่างมากจึงทำให้การผลิตกรดมะนาวไม่เพียงพอ ในปี 1880 ได้มีการคิดหาวิธีการผลิตกรดมะนาวโดยการสังเคราะห์จากกลีเซอรอล ซึ่งพบว่ามีขั้นตอนยุ่งยาก และไม่คุ้มกับการผลิตเป็นการค้า ต่อมาในปี 1893 Wehmer พบว่า *Citromyces* (ปัจจุบันคือ *Penicillium*) ผลิตกรดมะนาวได้ แต่ก็ยังไม่สามารผลิตเป็นการค้า จนกระทั่งในปี 1917 Currie พบว่า *Aspergillus niger* สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน จึงมีการพัฒนากระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่องมาตลอด จนผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งมีทั้งกระบวนการหมักแบบบนผิวหน้าอาหาร (surface process) และในอาหารเหลว (submerged process) (Marison,1988 ; Mattey,1992 ; Milsom and Meers,1985 ; Presscott and Dunn,1959) สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ ได้มีรายงานครั้งแรกโดย Wieland และ Sanderhoff ในปี 1932 ซึ่งเป็นการผลิตกรดมะนาวจากอะซิเตท (อ้างถึงใน Cartledge,1987) หลังจากปี 1965 เป็นต้นมากระบวนการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ได้รับความสนใจและมีการพัฒนาอย่างมาก โดยเริ่มแรกผลิตจากสารพวกคาร์โบ-ไฮเดรต จากนั้นมีการผลิตจากนอร์มัล-พาราฟฟินส์อีกด้วย (Milsom and Meers,1985) มียีสต์หลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะ *Candida* sp. ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีในอาหาร

เลี้ยงเชื้อ ซึ่งสามารถใช้สารตั้งต้นได้หลายชนิด (Abou-Zeid and Ashy,1984 ; Cartledge,1987; Ikeno et al.,1975) ได้แก่ กลูโคส,อะซิเตท,ไฮโดรคาร์บอน, กากน้ำตาล, แอลกอฮอล์, กรดไขมัน และน้ำมันธรรมชาติ นอกจากนี้การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ยังใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงสั้น, เพาะเลี้ยงง่าย และสามารถพัฒนาการผลิตเป็นกระบวนการต่อเนื่องได้ง่าย (Marison,1988; Milsom and Meers,1985) ปัจจุบันมีการผลิตกรดมะนาวออกจำหน่ายประมาณ 400,000 ตันต่อปี ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* และบางส่วนจากเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* (Mattey,1992)

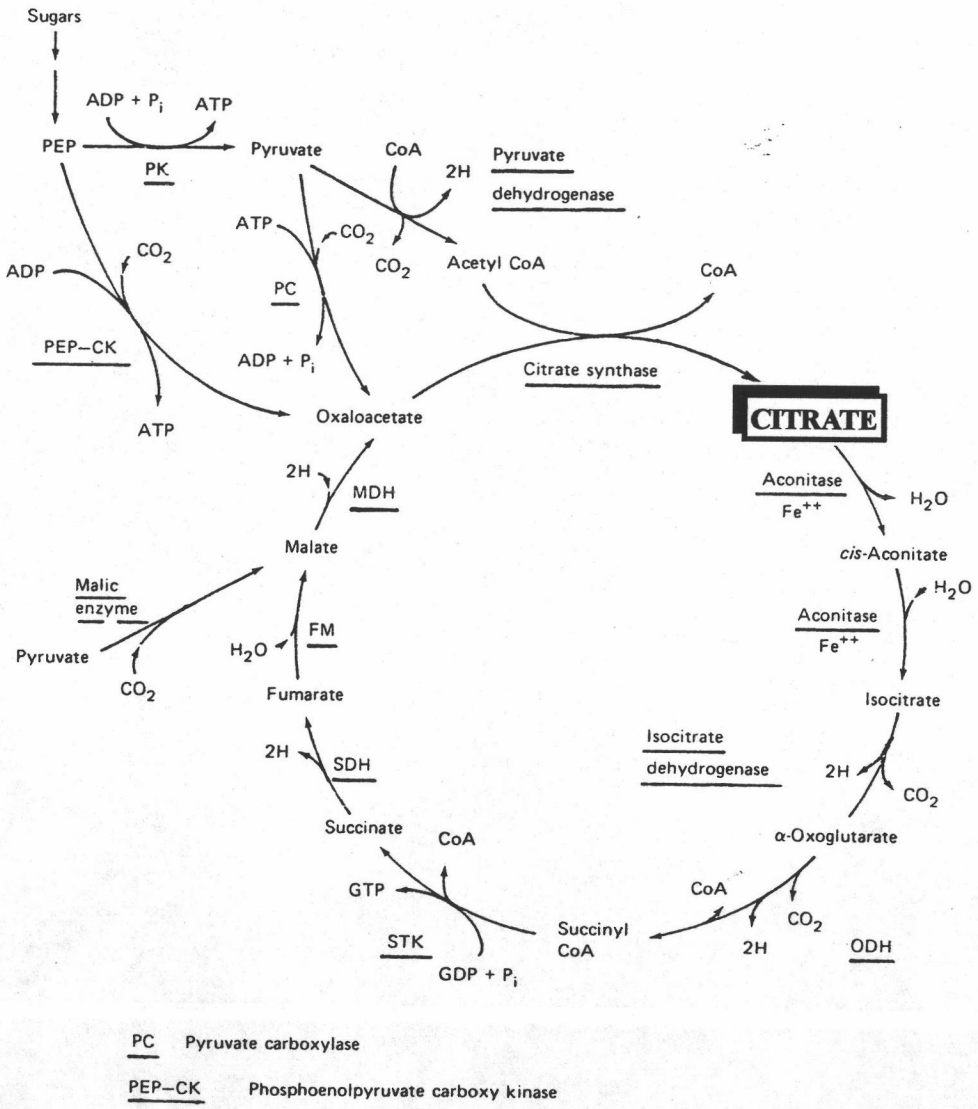
2. ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

การผลิตกรดมะนาวจากน้ำตาลกลูโคสโดยยีสต์ ซึ่งอาศัยวัฏจักรเครปส์(Krebs cycle) ดังแสดงในรูปที่ 1 จะเห็นว่ากรดมะนาวเป็นสารตัวกลางที่สำคัญ การสังเคราะห์เกิดโดยน้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (pyruvate) และอะซิติลโคเอนไซม์ เอ (acetyl-Co A) โดยกลไกไกลโคไลซิส (glycolysis) จากนั้นอะซิติลโคเอนไซม์ เอ รวมตัวกับออกซาโลอะซิเตท(oxaloacetate)โดยอาศัยเอนไซม์ ซิเตรทซินเธส(citrate synthase) เกิดเป็นกรดมะนาว ซึ่งออกซาโลอะซิเตทเกิดจากไพรูเวทรวมกับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้ปฏิกิริยาการสร้างทดแทน (anaplerotic reaction) อาศัยเอนไซม์ไพรูเวทคาร์บอกซิเลส (pyruvate carboxylase) (Milsom and Meers,1985) การสะสมกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นเนื่องจากมีความผิดปกติของวัฏจักรเครปส์ โดยมีเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ อะโคนิเตส(aconitase) และไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส(isocitrate dehydrogenase) ในช่วงที่มีการผลิตกรดมะนาวเอนไซม์ทั้งสองจะมีแอคติวิตีต่ำลง ในขณะที่เอนไซม์ ซิเตรทซินเธส มีแอคติวิตีสูงขึ้น (Marison,1988)

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

3.1 สายพันธุ์ของยีสต์

ปัจจุบันพบว่ามียีสต์หลายสายพันธุ์ ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ในอาหาร



รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนของการสร้างกรดมะนาวจากน้ำตาล ซึ่งผ่านกลไกไกลโคไลซิส(glycolysis) และอยู่ในวัฏจักรเครปส์(Krebs cycle)

ที่มา : Marison,1988

เลี้ยงเชื้อ ได้แก่ *Candida* sp. *Hansenula* sp. *Pichia* sp. *Debaromyces* sp. *Torulopsis* sp. *Kloeckera* sp. *Trichosporon* sp. *Rhodotorula* sp. *Sporobolomyces* sp. *Endomyces* sp. *Nocardia* sp. *Saccharomyces* sp. และ *Zygosaccharomyces* sp. ยีสต์สายพันธุ์ *Candida* เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง (Marison,1988) สายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมจะต้องมีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้สูง ผลิตกรดไอโซซิตริกต่ำ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดและใช้เวลาในการหมักสั้น

3.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว

3.2.1 แหล่งของคาร์บอน

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์จะต้องคำนึงถึงชนิด และปริมาณของแหล่งคาร์บอนให้เหมาะสม เนื่องจากยีสต์สามารถใช้แหล่งของคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กลูโคส กากน้ำตาล ไฮโดรคาร์บอน อะซิเตท แอลกอฮอล์ กรดไขมัน และน้ำมันธรรมชาติ เป็นต้น โดยแหล่งของคาร์บอนควรมีราคาถูก และหาได้ง่ายเพื่อลดต้นทุนการผลิต ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้สารพวกคาร์โบไฮเดรต(Milsom and Meers,1985) ในปี 1993 Shah และคณะ เพาะเลี้ยงเชื้อ *Yarrowia lipolytica* (DS-1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่า แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วทำให้สะอาดโดยมีค่าสมมูลย์เดรกโตรสร้อยละ 94-96 สามารถใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนได้ดีในการผลิตกรดมะนาว เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนที่เป็น ฟรุกโตส, ไฮดรอล(hydrol), ซูโครส,กากน้ำตาล,คีโรซีน(kerosene), ซูโครสที่ผ่านการย่อยแล้วและกากน้ำตาลที่ผ่านการย่อยแล้ว (Shah et al.,1993)

3.2.2 แหล่งของไนโตรเจน

เนื่องจากการสะสมกรดมะนาวจะเกิดขึ้นหลังจากที่แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้หมดแล้ว ดังนั้นการผลิตกรดมะนาวจะต้องจำกัดปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (Klasson ,Clausen,and Gaddy,1989; Kubicek and Rohr,1986) สำหรับชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์สามารถใช้ได้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทั้งรูปของอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน อินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน และ คอร์น สตีป ลิเคอร์(corn-steep liquor) ส่วนอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย เป็นต้น การเลือกใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอาจจะเป็นชนิดใดชนิดหนึ่งหรือใช้ควบคู่กันก็ได้ (Iizuka et al.,1971)

3.2.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นสารที่จำเป็นสำหรับยีสต์ในการเจริญและการผลิตกรดมะนาว การจำกัดปริมาณฟอสเฟตจะทำให้เกิดการสะสมของกรดมะนาว (Kubicek and Rohr,1986) Ajinomoto Co.,Inc. (1969) และ Shimizu และคณะ (1970) พบว่า โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เป็นแหล่งของฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Candida* (อ้างถึงใน Abou-Zeid and Ashy, 1984)

3.2.4 แร่ธาตุ

แร่ธาตุบางชนิดมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์อย่างเห็นได้ชัด เช่น แมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟต ซึ่งเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาว(Abou-Zeid and Ashy,1984;Iizuka et al.,1971) Fired (1972) ได้เพาะเลี้ยง *Candida* ในอาหารที่มีตะกั่ว(lead) พบว่า สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าอาหารที่ไม่เติมตะกั่ว (Fired,1972) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาผลของทองแดงอิออน (cupric ion) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อะโคนิเตส โดย Furukawa และคณะ (1977) พบว่า ความเข้มข้นของทองแดงอิออนที่เหมาะสมเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้การผลิตกรดไอโซซิตริกลดลง และเหล็กอิออน(ferrous ion) เป็นแร่ธาตุอีกชนิดหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว การเติมเหล็กอิออนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เกิดการสร้างกรดไอโซซิตริคสูงขึ้น (Furukawa et al.,1977)

3.2.5 สารเสริมอื่นๆ

ในการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ จะมีการเติมสารบางอย่างเพื่อ

เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาว สารเหล่านี้เป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ เช่น ไธอะมีน กรดนิโคตินิคและไบโอติน หรืออยู่ในรูปของสารประกอบ เช่น สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) หรือ คอร์น สตีพ ลิเคอร์ (corn steep liquor) เป็นต้น (Abou-Zeid and Ashy,1984; Iizuka et al.,1971)

3.2.6 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้น เมื่อมีการสะสมกรดมะนาวในระหว่างการหมักค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงและไปยับยั้งการทำงานของเซลล์ทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง(Moresi et al.,1980) ดังนั้นจึงได้มีการเติมสารบางชนิดเพื่อรักษาค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ ตัวอย่างเช่น แคลเซียมคาร์บอเนต (Iizuka et al.,1971;Shah et al.,1993) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Klasson et al.,1989;Wojtatowicz,Rymowicz and Kautola,1991)โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (Briffaud and Engasser,1979) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Rottigni and Cardini,1981) เป็นต้น โดยทั่วไปนิยมใช้แคลเซียมคาร์บอเนต โดยเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น ปริมาณที่เหมาะสมขึ้นกับความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม สำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์อยู่ในช่วง 4.5-6.5 (Kubicek and Rohr,1986) ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างสูงเกินไปเชื้อยีสต์จะผลิตสารพวกโพลีออลส์(polyols) อิริธริทอล(erythritol) และแมนนิทอล (mannitol) แทนการผลิตกรดมะนาว(Tabochi and Hara,1970 อ้างถึงใน Mattey, 1992)

3.2.7 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาวแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 22-30 องศาเซลเซียส(Marison,1988)

3.2.8 การให้อากาศและการกวน

การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ เป็นการหมักในสภาวะที่ต้องการออกซิเจน ซึ่งการถ่ายเทของออกซิเจนในถังหมักขึ้นกับองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น อัตรา

การให้อากาศ อัตราการกวน องค์ประกอบและสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความดันและอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (Rane and Sims,1994) ดังนั้นการให้อากาศและการกวนที่เพียงพอและเหมาะสมจึงมีความสำคัญมาก Okoshi และคณะ(1987)ได้ศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากเชื้อ *Candida tropicalis* พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 5-60 ppm การผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มสูงขึ้น แต่ถ้าเพิ่มสูงกว่า 60 ppm การผลิตกรดมะนาวจะลดลง นอกจากนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนยังทำให้การผลิตกรดไอโซซิตริคลดลงอีกด้วย (Okoshi et al.,1987)

3.2.9 ระยะเวลาในการหมัก

โดยทั่วไประยะเวลาที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวจะอยู่ในช่วง 3-6 วัน ซึ่งขึ้นกับสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ อาหารและสภาวะที่ใช้ในการหมัก (Marison, 1988) การที่ระยะเวลาในการหมักโดยยีสต์สั้นกว่าการหมักโดยเชื้อรา ทำให้ได้รับความสนใจอย่างมาก

4. การกลายพันธุ์และสิ่งก่อการกลายพันธุ์

ในปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง ทั้งทางด้านการผลิตพลังงาน,อาหาร,ยารักษาโรค,เกษตรกรรม และด้านอื่นๆ นับวันจะมีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของประชากร จึงเกิดความต้องการสูงขึ้น การนำจุลินทรีย์มาใช้ในอุตสาหกรรมเริ่มแรกนั้นจุลินทรีย์จะได้จากการคัดเลือกจากแหล่งธรรมชาติ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ตามธรรมชาติจะมีความสามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ในปริมาณต่ำ เมื่อคัดแยกจุลินทรีย์จากธรรมชาติได้แล้ว การเพิ่มผลผลิตทำได้โดยหาสภาวะที่เหมาะสม แต่การเพิ่มผลผลิตมีขอบเขตจำกัดโดยตัวจุลินทรีย์เอง ซึ่งความสามารถของการผลิตสารผลิตภัณฑ์จะขึ้นอยู่กับการควบคุมของจีโนม(genome)ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงจีโนมจะทำให้การสร้างสารผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นได้(Stanbury and Whitaker,1984)การเปลี่ยนแปลงจีโนมอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ(spontaneous mutation) ซึ่งมีโอกาสเกิดได้น้อย หรือการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induce mutation) โดยใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์ ทำให้มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าการเกิดตาม

ธรรมชาติหลายเท่า สิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้มี 2 กลุ่ม ดังนี้ (Bradley,1966)

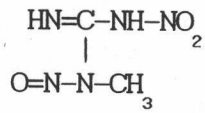
4.1 <u>แสงหรือรังสีต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์</u> (physical mutagen) ตัวอย่างเช่น รังสีอุลตราไวโอเลต (UV) ซึ่งจัดเป็นรังสีประเภท นอน-ไอออนไนซิ่ง(non-ionizing) และรังสีเอกซ์(X-ray) ซึ่งจัดเป็นรังสีประเภท ไอออนไนซิ่ง(ionizing) เป็นต้น

4.2 <u>สารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์</u>(chemical mutagen) สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่มตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับ ดีเอ็นเอ สารกลุ่มที่นิยมใช้กันมากได้แก่ สารอัลคิลเลติง(alkylating agent) โดยเฉพาะ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) โดยสารในกลุ่มนี้มีสมบัติเติมหมู่อัลคิลตั้งแต่หนึ่งหมู่ขึ้นไปให้กับโมเลกุลของ ดีเอนเอ

อุลตราไวโอเลต เป็นรังสีที่มีพลังงานระดับต่ำไม่ทำให้เกิดกระบวนการไอออน-ไนเซชัน(ionization) นิยมใช้เป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์อันดับแรกของการปรับปรุงสายพันธุ์ เพราะเป็นวิธีที่ง่าย และสะดวก สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี เมื่อเลือกใช้ช่วงเวลา และความเข้มข้นแสงที่เหมาะสม โดยทั่วไปมักใช้หลอดแสงอุลตรา-ไวโอเลตที่มีความยาวคลื่นประมาณ 253.7 นาโนเมตร เนื่องจาก ดีเอ็นเอ สามารถดูดกลืนพลังงานจากแสงอุลตราไวโอเลตได้ดีกว่าโมเลกุลอื่นๆ ภายในเซลล์เป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยจะเกิดการจับตัวของ ไพริมิดิน ไดเมอร์(pyrimidine dimer) ในสายดีเอ็นเอโพลีนิวคลีโอไทด์สายเดียวกัน ทำให้เกิดการแทนที่เบสผิดพลาดระหว่างการจำลองตัว (Fantini,1975) ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตส่วนใหญ่จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ ทรานซิชัน (Transition) จาก GC ไปเป็น AT และแบบ ทรานเวอร์ชัน (Transversion) ซึ่งพบไม่ค่อยมากนัก นอกจากนี้อาจพบการกลายพันธุ์แบบ เฟรมชิฟท์ (Frameshift) (Baltz,1986) ความผิดปกติของเบสที่เกิดจากแสงอุลตราไวโอเลต สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ด้วยแสงความยาวคลื่น 300-500 นาโนเมตร เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "photoreactivation" ซึ่งจะต้องอาศัยเอนไซม์โฟโตไลเอส(photolyase)โดยการตัดไพริมิดินไดเมอร์ เพื่อป้องกันการเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวจึงต้องพยายามไม่ให้เซลล์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลตแล้วถูกแสง visible

light ทันที (Fantini,1975;Hopwood,1970)

NTG หรือ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) เป็นสารเคมีพวกอัลคิลเลติง(alkylating agent) ที่มีประสิทธิภาพสูง นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์หลายชนิด NTG เป็นผลึกสีเหลือง มีมวลโมเลกุล 147.1 จุดหลอมเหลว (melting point) 188 องศาเซลเซียส จุดเดือด (boiling point) 123.5 องศาเซลเซียส และมีสูตรโครงสร้างทางเคมี ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ NTG

NTG เป็นสารประกอบที่ไวต่อแสงสว่าง เมื่อถูกแสงจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้ม-เขียว ละลายได้ในตัวทำละลายมีขั้ว ละลายได้น้อยในน้ำ และมีครึ่งชีวิตเมื่ออยู่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องประมาณ 200 ชั่วโมง แต่จะเหลือ 90 นาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส (Drake and Abrahamson,1977) การทำงานของ NTG ต้องมีการแตกตัวเป็นอิสระจึงสามารถเป็นสารชักนำได้ โดยในสภาวะที่เป็นกรดจะแตกตัวให้ กรดไนตรัส (nitrous acid) ส่วนในสภาวะที่เป็นด่างจะสลายตัวให้ ไดอะโซมีเธน (diazomethane) และที่ความเป็นกรดด่าง 5.5 ไม่เกิดการสลายตัว (Mandell and Greenberg,1960) โดยทั่วไปจะใช้สภาวะที่เป็นด่าง เนื่องจาก NTG จะสลายตัวให้ไดอะโซมีเธน (มีสูตรโครงสร้างเป็น $N{=}N^{+}{-}C^{-}{-}H_2$) ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สูง โดยไดอะโซมีเธนจะทำปฏิกิริยาแบบอัลคิเลชั่นกับเบสก้วนีนให้หมู่เมธิล ($-CH_3$) ที่ตำแหน่ง N^7 ทำให้เกิดเป็น เมธิลเลเทด ก้วนีน (methylated guanine) มีผลให้เกิดความผิดปกติของ ดีเอนเอ เช่น ทำให้การจับคู่ระหว่างเบสเปลี่ยนแปลงไป ทำให้การเชื่อมต่อของเบสก้วนีนกับน้ำตาลดีออกซีไรโบสฟอสเฟต(deoxyribose phosphate) หลอมตัวและหลุดออก เป็นต้น (Bautz and Freese,1960; Lowley and Brookes,1961)

5. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์

ในการคัดเลือกสายพันธุ์ จะต้องคำนึงถึงคุณสมบัติที่ต้องการเป็นสำคัญ นอกจากจะปรับปรุงในด้านการเพิ่มผลผลิตและการผลิตสารชนิดใหม่แล้ว ยังมีการปรับปรุงในด้านคุณสมบัติที่เหมาะสมกับการผลิต ซึ่งจะทำให้เกิดความสะดวกในการผลิต เป็นการลดค่าใช้จ่ายในการผลิตด้วย คุณสมบัติต่างๆ ที่ต้องการคัดเลือก คือ (Stanbury and Whitaker,1984)

ก. เชื้อต้องมีคุณสมบัติคงที่ คือ เชื้อจะต้องให้ผลผลิตคงที่ ไม่กลายพันธุ์เป็นรีเวอตแตนท์ (revertants) ที่ให้ผลผลิตน้อย

ข. เชื้อต้องต้านทานการเกิดโรคได้ การเกิดโรคของจุลินทรีย์โดยการที่เซลล์ถูกทำลายด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้ผลผลิตลดลง เช่น แบคทีเรีย ถูกทำลายโดย phage

ค. เชื้อที่ไม่ทำให้เกิดฟอง การเกิดฟองจะทำให้เกิดความยุ่งยากในการผลิต เสียค่าใช้จ่ายในการติดตั้งเครื่องกำจัดฟอง และสารต้านทานการเกิดฟอง

ง. เชื้อที่สามารถต้านทานสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ในการผลิตที่ใช้ คอร์น สตีพ ลิเคอร์ เป็นอาหาร เชื้อที่ใช้จะต้องต้านทานฟอสเฟตได้ดี

จ. เชื้อจะต้องมีรูปร่างเหมาะสม ในการผลิตส่วนใหญ่ใช้อาหารเหลว รูปร่างของเชื้อจะมีผลต่อกระบวนการผลิตเป็นอย่างมาก เช่น มีผลต่อการให้อากาศ การเกิดฟอง ความยากง่ายในการกรอง เป็นต้น

ฉ. เชื้อที่ใช้ออกซิเจนน้อย ถ้าเชื้อผลิตสารได้โดยใช้ออกซิเจนน้อยจะช่วยให้การผลิตเสียค่าใช้จ่ายน้อยลง

ช. เชื้อที่ไม่ผลิตสารที่ไม่ต้องการ ถ้าเชื้อผลิตเฉพาะสารที่ต้องการ จะทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตสูง นอกจากนั้นสารที่เชื้อผลิตขึ้นแล้วอาจเป็นพิษ เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้น หรือทำให้การแยกผลผลิตยุ่งยาก ซึ่งจะทำให้เสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น

สำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม คุณสมบัติที่ต้องการ เช่น ผลผลิตกรดมะนาวสูง กรดไอโซซิตริกต่ำ ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้นได้ เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงได้ ทนต่ออิออนบางชนิด มีความเสถียร เป็นต้น เนื่องจากการคัดเลือกในอาหารเหลวใช้เวลามาก และอุปกรณ์หลายชนิด ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการคัดเลือกบนอาหารวุ้นที่มีอินดิเคเตอร์อยู่ ซึ่งจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับ

งาน โดยทั่วไปการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์จะเป็นแบบสุ่ม ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

5.1 <u>การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ</u> เป็นการคัดเลือกอย่างคร่าวๆ สะดวก และรวดเร็ว ในการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อผลิตกรดมะนาว สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

5.1.1 <u>ทดสอบการเจริญบนสารบางชนิด</u> สารที่นิยมใช้ คือ โซเดียม-ซิเตรท และโซเดียมโมโนฟลูออโรอะซิเตต โดยคัดเลือกเชื้อที่ไม่เจริญบนโซเดียมซิเตรท หรือ โซเดียมโมโนฟลูออโรอะซิเตต ซึ่งเชื้อที่ได้จะมีกิจกรรมของเอนไซม์อะโคนิเตสต่ำ (Akiyama et al., 1973; Hamissa, Abou-Zeid, and Radwan, 1982; Wojtatowicz, Marchin and Erickson, 1993)

5.1.2 <u>การเติมอินดิเคเตอร์ที่ทำปฏิกิริยากับกรด</u> แล้วเกิดการเปลี่ยน-แปลงรอบๆโคโลนี สารที่นิยมใช้เป็นอินดิเคเตอร์ ได้แก่ โบรโมครีซอลกรีน(bromocresol green) ซึ่งรอบๆโคโลนีจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเขียวเป็นสีเหลือง(Foster and Davis, 1949; Lvova et al.,1980) และแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งจะเกิดบริเวณใสรอบๆ โคโลนี (Banno,Hasegawa and Iizuka,1971;Nout,1972) เป็นต้น ในการเลือก อินดิเคเตอร์ที่ใช้จะต้องไม่มีผลต่อเซลล์ หรือทำให้เกิดการสร้างสารอื่น

5.2 <u>การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ</u> เป็นการคัดเลือกที่ให้ผลแน่นอน โดยการเพาะ-เลี้ยงในอาหารและสภาวะที่ใช้ในการผลิต แล้ววิเคราะห์ปริมาณกรดในน้ำหมัก ด้วยวิธีที่จำเพาะต่อชนิดของกรดนั้นๆ การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิจะขึ้นอยู่กับอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการกำหนดสภาวะต่างๆ จึงมีความสำคัญมาก (Fantini,1975) นอกจากนั้นวิธีการวิเคราะห์จะต้องมีความจำเพาะให้ผลถูกต้องแน่นอน และสามารถทำซ้ำได้โดยง่าย

6. <u>การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์เพื่อผลิตกรดมะนาว</u>

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ในสภาพอาหารเหลว มักจะพบปัญหาการปนเปื้อนของกรดอื่นๆ โดยเฉพาะกรดไอโซซิตริก (Cartledge,1987;Mattey,1992; Milsom

and Meers,1985) จึงมีการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้สูงขึ้น ซึ่งการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี หรือทางฟิสิกส์ เป็นวิธีที่ใช้ได้ผลในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Abou-Zeid and Ashy,1984; Hamissa et al.,1982) การกลายพันธุ์มีข้อดี คือ กระทำได้ง่าย สะดวก ค่าใช้จ่ายต่ำ และใช้เวลาในการศึกษารายละเอียดต่างๆ น้อยกว่าวิธีอื่น

ในปี 1973 Akiyama และคณะ ได้รายงานวิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีสต์ *Candida lipolytica* ด้วย NTG ทำให้การผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นจาก 62.4 เป็น 116 กรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวที่มี นอร์มัล-พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน และทำให้อัตราส่วนของกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริกเพิ่มขึ้น โดยสายพันธุ์เดิมผลิตได้ 60:40 ส่วนสายพันธุ์ K-20 และ S-22 ซึ่งผลิตได้ 85:15 และ 97:3 ตามลำดับ ในปี 1982 Hamissa และคณะ ได้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีสต์ *Candida lipolytica* (Y-1095) ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และ NTG พบว่า แสงอุลตราไวโอเลต เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ดีกว่า หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มีสายพันธุ์ใหม่ 4 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นร้อยละ 75-80 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยสายพันธุ์เดิมผลิตกรดมะนาวได้ 31.38 กรัมต่อลิตร ในปี 1985 Good และคณะ ทำการกลายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomycopsis lipolytica* ด้วยสารเคมี NTG คัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่เจริญบนอาหารที่มีซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า มีสายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวสูงขึ้นจาก 109.3 เป็น 137.5 กรัมต่อลิตร และกรดไอโซซิตริกลดลงจาก 75.3 เป็น 49.2 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง 9 วัน ในอาหารที่มี canola oil และยังพบว่าแมงกานีส ช่วยให้การผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น ในขณะที่ Zn^{++} Fe^{++} ยับยั้งการผลิต ต่อมาในปี 1993 Wojtatowicz และคณะ ได้ใช้ UV,EMS และ NTG ในการกลายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* A-101 แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่เจริญบนซิเตรท ไม่เจริญบนอะซิเตรท หรือไวต่อโมโนฟลูออโรอะซิเตรท(MFA sensitive) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในนอมัล-พาราฟฟินส์ ไม่มีสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น และบางสายพันธุ์ผลิตกรดไอโซซิตริกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

7. การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก

เนื่องจากกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก เป็นสารที่พบทั้งในเซลล์พืชและสัตว์ และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในอาหารหลายชนิด จึงมีผู้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์อยู่มาก ทำให้มีวิธีการวิเคราะห์อยู่หลายวิธี ซึ่งพอจะสรุปได้ดังนี้

7.1 การวิเคราะห์โดยทำให้เกิดสีด้วยสารเคมี(chemical colorimetric) เป็นวิธีที่นิยมใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว เพราะใช้อุปกรณ์ที่หาง่ายและไม่มาก แต่ผลการวิเคราะห์จะมีข้อผิดพลาด เนื่องจากความไม่เฉพาะกับกรดมะนาว และการทำมีหลายขั้นตอน ดังนั้นการวิเคราะห์จึงขึ้นกับชนิดของสารตัวอย่าง จึงมีการปรับปรุงวิธีการต่างๆ เพื่อให้เหมาะสมกับงาน ตัวอย่างวิธีวิเคราะห์ เช่น วิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน (Stern, 1957) วิธีอะซิติก แอนไฮไดรด์-ไพริดีน (acetic anhydride-pyridine method) เป็นต้น

7.2 การใช้เอนไซม์(enzymatic method) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง จึงสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริก สำหรับกรดมะนาวอาศัยการทำงานของเอนไซม์ มาเลต ดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) และ แลกเตท ดีไฮโดรจีเนส(lactate dehydrogenase) วัดปริมาณ NADH ที่ลดลง ซึ่งจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณกรดมะนาว (Mollering,1985) ส่วนกรดไอโซซิตริก จะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ไอโซซิเตรท ดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) เมื่อมี NADP วัดปริมาณ NADPH ที่เกิดขึ้น(Beutler,1985) อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์จะต้องคำนึงถึงความเสถียรของเอนไซม์ ตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา และค่าใช้จ่ายด้วย

7.3 กาซ โครมาโตกราฟฟี (gas chromatography) สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งชนิดและปริมาณของกรดต่างๆ โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปสารประกอบที่ระเหยกลายเป็นไอได้ง่าย อาจอยู่ในรูปของ เมธิลเอสเทอร์(methyl esters) เอธิลเอสเทอร์(ethyl ester) หรือ ไตรเมธิลไซลิลเอสเทอร์(trimethylsilyl esters)(Alcock,1969) ซึ่งการเตรียมอนุพันธ์มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก การเตรียมสารละลายไดอะโซมีเธน สำหรับการ

เติมหมู่เมธิล เป็นปฏิกิริยาที่รุนแรง ต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะในการเตรียม และยังมีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง นอกจากนั้นผู้ใช้จะต้องใช้เครื่องวิเคราะห์ได้เป็นอย่างดี และการแยกสารจะต้องใช้โปรแกรมอุณหภูมิด้วย จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์งานประจำ

7.4 <u>ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี</u> (thin layer chromatography) นิยมใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของกรดในสารตัวอย่าง โดยอาศัยการแยกแบบ 2 มิติ บนแผ่นเซลลูโลส (two-dimentional cellulose thin layer chromatography) หลังจากการแยกแล้วตรวจสอบจุดสารโดยการพ่นด้วย นินไฮดริน(ninhydrin) (Myers and Huang,1969)การวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธีนี้ จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ทำให้เกิดความผิดพลาดมาก จึงไม่นิยมใช้

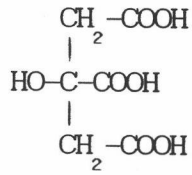
7.5 <u>ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี</u>(HPLC)เป็นวิธีที่นิยมใช้วิเคราะห์ได้ทั้งชนิดและปริมาณของกรด ให้ผลที่ถูกต้องแน่นอน สามารถประยุกต์ใช้ได้กับงานหลายประเภท การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกในน้ำหมัก มีรายงานอยู่น้อย ส่วนมากจะใช้วิธีทำให้เกิดสีด้วยสารเคมี และวิธีทางเอนไซม์ อาจเป็นเพราะว่าต้องเสียเวลาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารต่างๆ ในน้ำหมัก ซึ่งการแยกของสารในการวิเคราะห์ด้วย HPLC จะขึ้นอยู่กับชนิดของคอลัมน์ ความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ชนิด,ความเข้มข้น และความเป็นกรดด่างของสารละลายตัวพา(mobile phase) อุณหภูมิของคอลัมน์ อัตราการไหลของตัวพา จากรายงานดังแสดงในตารางที่ 1 โดยทั่วไปจะใช้คอลัมน์ reverse-phase C8 หรือ C18 สารละลายตัวพาเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างในช่วง 2.1-2.5 ส่วนเครื่องตรวจวัดจะใช้ความยาวคลื่นอุลตราไวโอเลต 200-214 นาโนเมตร (Okoshi et al.,1987;Tusseau and Benoit, 1987; Bevilacqua and Califano, 1989) ดังนั้นการปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์กรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกเพื่อให้เหมาะสมกับงานจึงจำเป็นอย่างยิ่ง

ตารางที่ 1 รายงานการวิเคราะห์กรด ในสารตัวอย่างชนิดต่างๆ

เอกสารอ้างอิง	Gertz,1990	Tusseau and Benoit,1987	Okoshi et al. ,1987	Bevilacqua and Califano,1991
ตัวอย่างที่วิเคราะห์	น้ำผลไม้	ไวน์	น้ำหมัก	ผลิตภัณฑ์อาหาร
คอลัมน์	RP18(ODS)	RP8(octyl)	Unisil 5C18	Beckman C8
ความยาวคอลัมน์	300 มม.	-	150 มม.	250 มม.
เส้นผ่าศูนย์กลาง	-	-	4.6 มม.	4.6 มม.
สารละลายตัวพา	KH_2PO_4 2% pH 2.4 ด้วย H_3PO_4	KH_2PO_4 70 g/l $(NH_4)_2SO_4$ 14 g/l pH 2.1 ด้วย H_3PO_4	Phosphate 0.2 %	$(NH_4)_2HPO_4$ 0.5% Acetonitrile 0.4% pH 2.24 ด้วย H_3PO_4
เครื่องตรวจวัด	RI	UV: 210 nm.	UV: 210 nm.	UV: 214 nm.

8. คุณสมบัติของกรดมะนาว

กรดมะนาว หรือ 2-hydroxy-1,2,3 propanetricarboxylic acid มีสูตรทางเคมีคือ $C_6H_8O_7$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 192.13 สูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 3 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 ความสามารถในการละลายสูงขึ้นกับอุณหภูมิ และย่อยสลายได้ง่าย กรดมะนาวส่วนใหญ่ผลิตในรูปของกรดมะนาวแอนไฮดรัส โมโนไฮเดรต เกลือและเอสเทอร์ของกรดมะนาว (Marison,1988)



รูปที่ 3 โครงสร้างของกรดมะนาว

9. ประโยชน์ของกรดมะนาว

จากคุณสมบัติของกรดมะนาว จึงมีการใช้กรดมะนาวเกลือและเอสเทอร์ของกรดมะนาวในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่มร้อยละ 75 เภสัชกรรมร้อยละ 10 และอุตสาหกรรมอื่นๆ ร้อยละ 15 (Bouchard and Merritt,1979; Mattey,1992)

9.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ส่วนมากใช้กรดมะนาวเป็นสารให้ความเปรี้ยว และเพิ่มรสชาติ ในการทำน้ำผลไม้ น้ำอัดลม น้ำหวาน ลูกกวาด เจลลี และแยม เป็นต้น ใช้เป็นสารป้องกันการขุ่นและตกตะกอนในเครื่องดื่มที่ทำจากผลไม้ ไวน์ นอกจากนั้นยังใช้เป็นสารป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในอาหารแช่แข็ง

9.2 อุตสาหกรรมทางเภสัชกรรม ใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมของยาบางชนิดเพื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นส่วนผสมของยาลดกรดในกระเพาะอาหารช่วยทำให้เกิดฟอง ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดมะนาวรวมตัวกับไบคาร์บอเนตและคาร์บอเนตในน้ำ ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเตรียมวิตามิน กรดมะนาวในรูปของโซเดียมซิเตรทใช้ในการเตรียมสารละลายสำหรับการป้องกันการแข็งตัวของเลือด

9.3 อุตสาหกรรมอื่นๆ ใช้กรดมะนาวที่อยู่ในรูปไตรโซเดียมซิเตรทแทนการใช้สารเตตราโปแตสเซียมไพโรฟอสเฟตในการทำผงซักฟอก ทำให้ย่อยสลายได้ง่าย ใช้ในกระบวนการกำจัดกาซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงบางชนิด ใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมในน้ำยาขัดโลหะ น้ำยาล้างสนิม เนื่องจากสามารถรวมตัวกับโลหะ

ได้ดี จึงใช้กำจัดออกไซด์ของเหล็กและทองแดงที่เกิดขึ้นในหม้อต้มไอน้ำ ท่อให้ความร้อน เตาปฏิกรณ์นิวเคลียร์ นอกจากนั้นยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำสี น้ำยาล้างรูป กระดาษอัดรูป เส้นใย กระดาษ โพลิเมอร์ เป็นต้น

10. มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

กรดมะนาวเป็นกรดอินทรีย์ที่ประโยชน์มากในทางอุตสาหกรรม ประเทศไทยจึงมีความต้องการใช้เพิ่มสูงขึ้นในแต่ละปี ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนั้นการพัฒนากระบวนการผลิตและปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดมะนาวจึงจำเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนั้นประเทศไทยยังเป็นแหล่งผลิตวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว เช่น มันสำปะหลัง และกากน้ำตาล เป็นต้น จึงน่าจะได้มีการผลิตกรดมะนาวขึ้นเพื่อบริโภคภายในประเทศ และเพื่อส่งออกแทนการส่งออกวัตถุดิบ

งานวิจัยนี้จะเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในปี พ.ศ.2535 โดย เรวดี เลิศไตรรักษ์ โดยสายพันธุ์นี้สามารถเจริญและผลิตกรดมะนาวได้จากนอร์มัล-พาราฟฟินส์ นอกจากนั้นยังสามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์ หรือน้ำตาลกลูโคส ในการปรับปรุงสายพันธุ์นี้ จะใช้วิธีทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และสารเคมี NTG แล้วจึงตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวของสายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากการกลายพันธุ์ โดยทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ ด้วยอาหารวุ้นที่มีแคลเซี่ยมคาร์บอเนตเป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นจึงนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวและไอโซซิตริก ด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน และ HPLC คัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงขึ้น นอกจากนั้นทำการปรับปรุงวิธีการคัดเลือกทั้งสองขั้นตอน สำหรับใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป

ตารางที่ 2 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวของประเทศไทยระหว่างปี 2526-2535

ปี พ.ศ.	ปริมาณ(กิโลกรัม)	มูลค่า(บาท)
2526	420,106	13,649,075
2527	751,338	23,649,075
2528	738,142	27,484,485
2529	441,486	15,038971
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(ม.ค.-ส.ค.)	1,316,993	45,423,432

ที่มา Tailand Import Monitor, Alpharesearch Co.,LTD.

11. ขั้นตอนการวิจัย

11.1 ปรับปรุงวิธีการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ และวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวกรดไอโซซิตริกด้วย HPLC

11.2 หาปริมาณ(dose)ของ NTG และแสงอุลตราไวโอเลตที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

11.3 ชักนำให้ *Candida oleophila* C-73 เกิดการกลายพันธุ์

11.4 คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น โดยผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ และทุติยภูมิ

11.5 ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำ ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต หรือสารเคมี NTG

11.6 ทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้

11.7 ทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในระดับขวดเขย่าและถังหมัก 5 ลิตร