บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

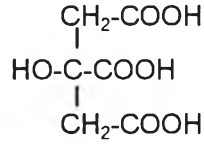
กรดมะนาว (citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ที่มีชื่อทางเคมีว่า กรด 2-ไฮดรอกซี-1,2,3-โพรเพน ไทรคาร์บอกซิลิก (2 hydroxy -1,2,3-propane tricarboxylic acid) พบทั่วไปในพืชและสัตว์ จัดเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวัฏจักรเครบส์ (Krebs' cycle) ของระบบ สิ่งมีชีวิตทั้งหลาย กรดมะนาวสกัดได้จากมะนาวเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1784 โดย Karl Wilhem Scheele (อ้างถึงใน Bouchard and Merritt,1979; Prescott and Dunn, 1983)นอกจากนี้ยังพบได้ในผลไม้อีกหลายชนิด เช่น สับปะรด ส้ม ลูกแพร ผลมะเดื่อ รวมทั้งพืชตระกูลส้ม (citrus fruit) เรียกกรดมะนาวที่สกัดได้จากธรรมชาติว่า กรดมะนาวธรรมชาติ (natural citric acid) (Miall, 1978) ประมาณปี ค.ศ. 1922 อิตาลีผลิตกรดมะนาวในรูปของเกลือแคลเซียม จากการสกัดดังกล่าว ได้ถึงร้อยละ 90 ของการผลิตกรดมะนาวทั่วโลก (อ้างถึงใน เรวดี เลิศไตรรักษ์, 2535)ความต้องการกรดชนิดนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ประกอบกับการใช้กรดมะนาวเพื่อการผลิตเครื่องดื่มมีมากขึ้น ทำให้มีผู้พยายามคิดค้นกระบวนการผลิตกรดมะนาวแบบต่างๆ ขึ้น เช่นการสังเคราะห์ทางเคมี จากการค้นพบของ Grimoux และคณะ ในปี ค.ศ. 1880 (อ้างถึงใน Bouchard and Merritt,1979; Prescott and Dunn, 1983) แต่มีความไม่เหมาะสมเนื่องจากใช้วัตถุดิบราคาแพงและเป็นอันตราย รวมทั้งในการผลิตมีหลายขั้นตอนที่ทำให้การผลิตไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน ต่อมาในปี ค.ศ. 1893 Wehmer เป็นคนแรกที่ค้นพบว่าเชื้อรา *Penicillium glucum* และ *Mucor* ที่หมักในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบสามารถผลิตกรดมะนาวได้ เรียกกรดมะนาวชนิดนี้ว่ากรดมะนาวจากการหมัก (fermentation citric acid) เขาพยายามพัฒนากระบวนการผลิตโดยใช้เชื้อที่ค้นพบเพื่อขยายเข้าสู่ระดับอุตสาหกรรม แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น และระยะเวลาที่ใช้ในการหมักยาวนานเกินไป (อ้างถึงใน Marison, 1988) ต่อมาปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้ เมื่อ Currie และคณะ(1917) พบว่าเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่หมักบนอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ สามารถผลิตกรดมะนาวได้ในปริมาณมาก เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูง *A. niger* จะผลิตกรดออกซาลิก (อ้างถึงใน Miall, 1978) ต่อมาในปี ค.ศ. 1923 Currie ร่วมกับบริษัท Chas. Pfizer & Co. Inc.

ในนิวยอร์ค ได้พัฒนาและผลิตกรดมะนาวทางการค้าเป็นครั้งแรก และมีการพัฒนาการผลิตเรื่อยมา โดยมีการพัฒนาการหมักแบบผิวหน้าอาหาร (surface fermentation) ทั้งผิวหน้าอาหารแข็งและผิวหน้าอาหารเหลว ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาล (อ้างถึงใน Miall, 1978; Prescott and Dunn, 1983) และได้มีการศึกษากระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดมะนาว (submerged culture process) โดย Amelung และ Derguin (1930) ต่อมาในปี 1948 Shu และ Johnson ได้ศึกษาและพัฒนาการผลิตแบบขยายส่วนในถังหมัก 50 แกลลอน (อ้างถึงใน Miall, 1978) การผลิตกรดมะนาวโดยจุลินทรีย์นั้นนอกจากจะสามารถผลิตโดยเชื้อราแล้ว แบคทีเรียและยีสต์หลายสกุลก็สามารถผลิตกรดมะนาวได้ (Prescott and Dunn, 1983; Grewal and Kalra, 1995) การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์เริ่มขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1932 โดย Wieland และ Sanderhoff ผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ในอาหารแอซิเทต (อ้างถึงใน Cartledge, 1987) ในปี 1976 Maldonado และคณะ ศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida lipolytica* เมื่อใช้นอร์มอลพาราฟินเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตกรดมะนาวได้ร้อยละ 60 (Maldonado; Charpenter and Glikmans, 1976) และการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้นสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายแหล่งเช่น น้ำตาล น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง กากน้ำตาล สารไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ กรดไขมัน (Ikeno *et al*, 1975;Finogenova *et al*, 1986; Wojtatowicz; Marchin and Erickson, 1993)

สำหรับแบคทีเรียนั้น ทั้งๆที่มีการศึกษาถึงความสามารถในทางชีวเคมีมาก แต่ในการผลิตกรดมะนาวแล้วยังได้รับความสนใจน้อยมาก จากรายงานการศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรียพบว่ามีน้อยมากและส่วนใหญ่เป็นสิทธิบัตร แม้การผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรียจะให้ผลผลิตต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับราและยีสต์ (Prescott and Dunn, 1983; Marison, 1988) แต่ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการผลิตกรดมะนาวโดยจุลินทรีย์ ปัจจุบันมีการผลิตกรดมะนาวจากกระบวนการหมักออกจำหน่ายประมาณ 500,000 ตันต่อปี ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* และบางส่วนผลิตโดยยีสต์ *Yerrowia lipolytica* (Anonymous, 1990 อ้างถึงใน Shah *et al*, 1993)

1.2 คุณสมบัติของกรดมะนาว

กรดมะนาว เป็นกรดอินทรีย์ ชื่อทางเคมีว่า กรด 2-ไฮดรอกซี-1,2,3-โพรเพนไทรคาร์บอกซิลิก ใน 1 โมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม และมีหมู่ฟังก์ชัน 2 ชนิด ได้แก่ หมู่คาร์บอกซิลิก 3 หมู่และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 1-1



รูปที่1-1 โครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว
ที่มา Miall, 1978

กรดมะนาวปราศจากน้ำ (anhydrous citric acid) มีลักษณะเป็นผงใสไม่มีสี มีสูตรโมเลกุลคือ $C_6H_8O_7$ น้ำหนักโมเลกุล 192.13 ตกผลึกได้จากสารละลายกรดมะนาวเข้มข้นในขณะร้อน มีจุดหลอมเหลว 153 องศาเซลเซียสและความหนาแน่นเท่ากับ 1.665 ส่วนกรดมะนาวโมโนไฮเดรต ($C_6H_8O_7.H_2O$)(citric acid monohydrate) มีน้ำหนักโมเลกุล 210.14 ตกผลึกได้ในสารละลายกรดมะนาวที่เย็น และอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพ (transition temperature) จากกรดมะนาวปราศจากน้ำเท่ากับ 36.6 $\pm$ 0.15 องศาเซลเซียส คงตัวในสภาพอากาศปกติที่มีความชื้นแต่จะสลายตัวในอากาศแห้ง กรดมะนาวโมโนไฮเดรตจะมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นเท่ากับ 1.542 ลักษณะโดยทั่วไปเป็นผลึกใสไม่มีสี มีรสเปรี้ยว มีความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายได้ง่าย และละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิสูง และละลายได้บ้างในแอลกอฮอล์ กรดมะนาวมีค่า pK ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 3 ค่า ได้แก่ pK_1 = 3.128, pK_2 = 4.761 และ pK_3 = 6.396 มีค่าคงที่การแตกตัวที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็น $K_1 = 8.2 \times 10^{-4}$, $K_2 = 1.77 \times 10^{-5}$ และ $K_3 = 3.9 \times 10^{-7}$ (Bouchard and Merritt, 1979)

1.3 มาตรฐานของกรดมะนาว

ตารางที่ 1-1 คุณลักษณะทางเคมีตามมาตรฐานของกรดมะนาว

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด	
		กรดมะนาว โมโนไฮเดรต	กรดมะนาว ปราศจากน้ำ
1.	ความบริสุทธิ์ $C_6H_8O_7$ คำนวณในสภาพแห้ง ร้อยละ	99.5-101.0	99.5-101.0
2	น้ำ ร้อยละ	7.5-8.8	ไม่เกิน 0.5
3	กากที่เหลือจากการเผา ร้อยละ ไม่เกิน	0.05	0.05
4	ออกซาเลท 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	สารละลายตัวอย่าง ต้องไม่ขุ่นกว่าสารละลายมาตรฐานสอบเทียบ	
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 : พระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (กรดมะนาว) พ.ศ. 2535

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 ประโยชน์ของกรดมะนาว

ความต้องการกรดมะนาวทั่วโลกในปัจจุบันมีมากและยังต้องการเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ประมาณร้อยละ 2-3 ต่อปี (Goldberg; Peleg and Rokem, 1991) เนื่องจากสมบัติของกรดมะนาวที่มีความเป็นพิษต่ำสามารถละลายน้ำได้ง่าย มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม ย่อยสลายได้ง่าย มีคุณสมบัติในการจับไอออนของโลหะหนักและการเป็นบัฟเฟอร์ และสามารถกำจัดได้ง่าย ดังนั้นจึงมีการใช้กรดมะนาว เกลือและเอสเทอร์ของกรดนี้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Nubel and Wantagh, 1977; Bouchard and Merritt, 1979) ประเทศที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตกรดมะนาวคือ สหรัฐอเมริกา ซึ่งมีความสามารถในการผลิตได้ประมาณปีละ 180 ล้านกิโลกรัม ร้อยละ 70 ของกรดมะนาวที่ผลิตได้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ร้อยละ 12 ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ประมาณร้อยละ 18 (Prescott and Dunn, 1983) ซึ่งประโยชน์ของกรดมะนาวในอุตสาหกรรมต่างๆ มีรายละเอียดดังนี้

1.4.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ใช้กรดมะนาวเพื่อเพิ่มรสชาติและความเปรี้ยว ในเครื่องดื่มอย่างอ่อน อย่างเช่นน้ำอัดลม และไวน์ ซึ่งมีบทบาทเพิ่มกลิ่น รส ลดความฝาด เพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ควบคุมความเป็นกรด ป้องกันการเปลี่ยนสี และป้องกันการขุ่นของไวน์ ในอาหารและลูกอม เป็นตัวเพิ่มรสชาติ ป้องกันการออกซิเดชั่น และเพิ่มสีดำให้แก่ลูกอม เนย แยม แจลลี่ เจลาตินและช่วยปรับพีเอช ป้องกันการเหม็นหืนในอาหารพวกไขมันและอาหารแช่แข็ง ป้องกันการเปลี่ยนสีของเนื้อสัตว์และหัวหอม ป้องกันการบูดเสียของเครื่องดื่ม เนยแข็งและเนยเหลว ใช้แต่งสีและเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์นม เนยและไอศครีม ป้องกันการตกผลึกของน้ำผึ้ง ซึ่งสารปรับกรดในอุตสาหกรรมอาหารมีมากมายหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่ใช้กรดมะนาว คือประมาณร้อยละ 73 รองลงมาเป็นกรดฟอสฟอริกประมาณร้อยละ 15 ส่วนที่เหลือเป็นกรดอื่นๆ เช่น กรดมาลิก กรดฟูมาริก กรดอะดิปิก กรดแลกติกและกรดทาร์ทาริก เป็นต้น (Bouchard and Merrittt, 1979; Prescott and Dunn, 1983)

1.4.2 อุตสาหกรรมทางเภสัชกรรม

ใช้เป็นส่วนผสมในยาบางชนิด เพื่อควบคุมความเป็นกรด ผสมในยาที่มีฟองฟู่เมื่อผสมน้ำดื่ม ซึ่งมักใช้ในรูปของเกลือหรือเอสเทอร์ของกรดมะนาว (อ้างถึงใน อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์, 2529) และการเตรียมยาแอสไพริน ช่วยในการละลายของยาถ่ายและยาบรรเทาอาการเจ็บปวด ใช้เป็นสารกันการตกตะกอน ใช้เป็นสารทำให้เกิดความคงตัวของกรดแอสคอบิก ใช้เป็นสารเพิ่มรสชาติของยา และเกลือแคลเซียมซิเทรตช่วยป้องกันการแข็งตัวของเลือด นอกจากนั้นยังใช้เฟร์ริกแอมโมเนียมซิเทรตช่วยในการรักษาโรคโลหิตจาง และช่วยป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเตรียมวิตามิน (Bouchard and Merritt, 1979)

1.4.3 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

ใช้เป็นส่วนผสมในครีมนวดผม น้ำยาเซท และโลชั่น ซึ่งจะควบคุมระดับพีเอชของผลิตภัณฑ์ และยังทำให้เกิดความแวววาว เพิ่มความอ่อนนุ่มให้น้ำยา และใช้เป็นสารป้องกันการหืนของเครื่องสำอาง (อ้างถึงใน Prescott and Dunn, 1983)

1.4.4 อุตสาหกรรมอื่นๆ

ใช้เป็นส่วนผสมในน้ำยาขัดโลหะ น้ำยาล้างสนิม หมึกพิมพ์ และสี และใช้เกลือไทรโซเดียมซิเทรตแทนสารเททระโพแทสเซียมไพโรฟอสเฟตเนื่องจากย่อยสลายง่ายไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของวัชพืชน้ำ และไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ ใช้เอสเทอร์ของกรดมะนาวโดยเฉพาะไทรเอทิล ไทรบิวทิล และแอซีทิลไทรบิวทิลเอสเทอร์เป็น plasticizer ที่ไม่เป็นอันตรายในการทำฟิล์มพลาสติก ใช้ไดไฮโดรเจนซิเทรตในการขจัดซัลเฟอร์ไดออกไซด์จากก๊าซเชื้อเพลิงในโรงไฟฟ้าและเตาหลอมโลหะ และใช้ป้องกันการเกิดเมือกและตะกรันในอุปกรณ์บำบัดน้ำเสียแบบออสโมซิสผันกลับ (reverse osmosis) (Bouchard and Merritt, 1979)

1.5 การผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรีย

จากการศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรียของ Tanaka และคณะ ในปี 1968 รายงานการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Arthrobacter paraffineus* ATCC 15591 ในอาหารที่มี 5% ของสารไฮโดรคาร์บอน (n-dodecane) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการหมักแบบให้อากาศ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมงสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 10 กรัมต่อลิตร (Tanaka; Kimura and Yamaguchi, 1968) ต่อมา ในปี 1973 Sardinas และคณะ ได้ศึกษาการผลิตกรดมะนาวจาก *Bacillus licheniformis* ATCC 21667 พบว่า *B. licheniformis* ATCC 21667 จะผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี cerelose 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยผลิตกรดมะนาวได้ 42 กรัมต่อลิตรในเวลา 120 ชั่วโมง (Sardinas and Conn, 1973)

Oomori และ Suzue ในปี 1973 ได้รายงานการผลิตกรดมะนาว จาก *Aerobacter* , *Pseudomonas* , *Micrococcus* และ *Bacillus* ในอาหารที่มี ไอโซซิทริก หรือไอโซซิทริกแลกโตนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ภาวะต่างๆ พบว่า *Aerobacter* IAM 1019 จะผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือ 93 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 10% ไอโซซิทริก ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4 ในเวลา 25 ชั่วโมง ส่วน *Pseudomonas dacunhae* IAM 1089 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 85.1 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 10% ไอโซซิทริก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 28 ชั่วโมง ขณะที่ *Micrococcus lysodickticus* IAM 1056 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 88.5 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในภาวะเดียวกัน สำหรับ *Bacillus subtilis* B-201-7 ATCC สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 58.6 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี

0.3% กลูโคสและ 6% ไอโซซิทริก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 39 ชั่วโมง (Oomori and Suzue, 1973)

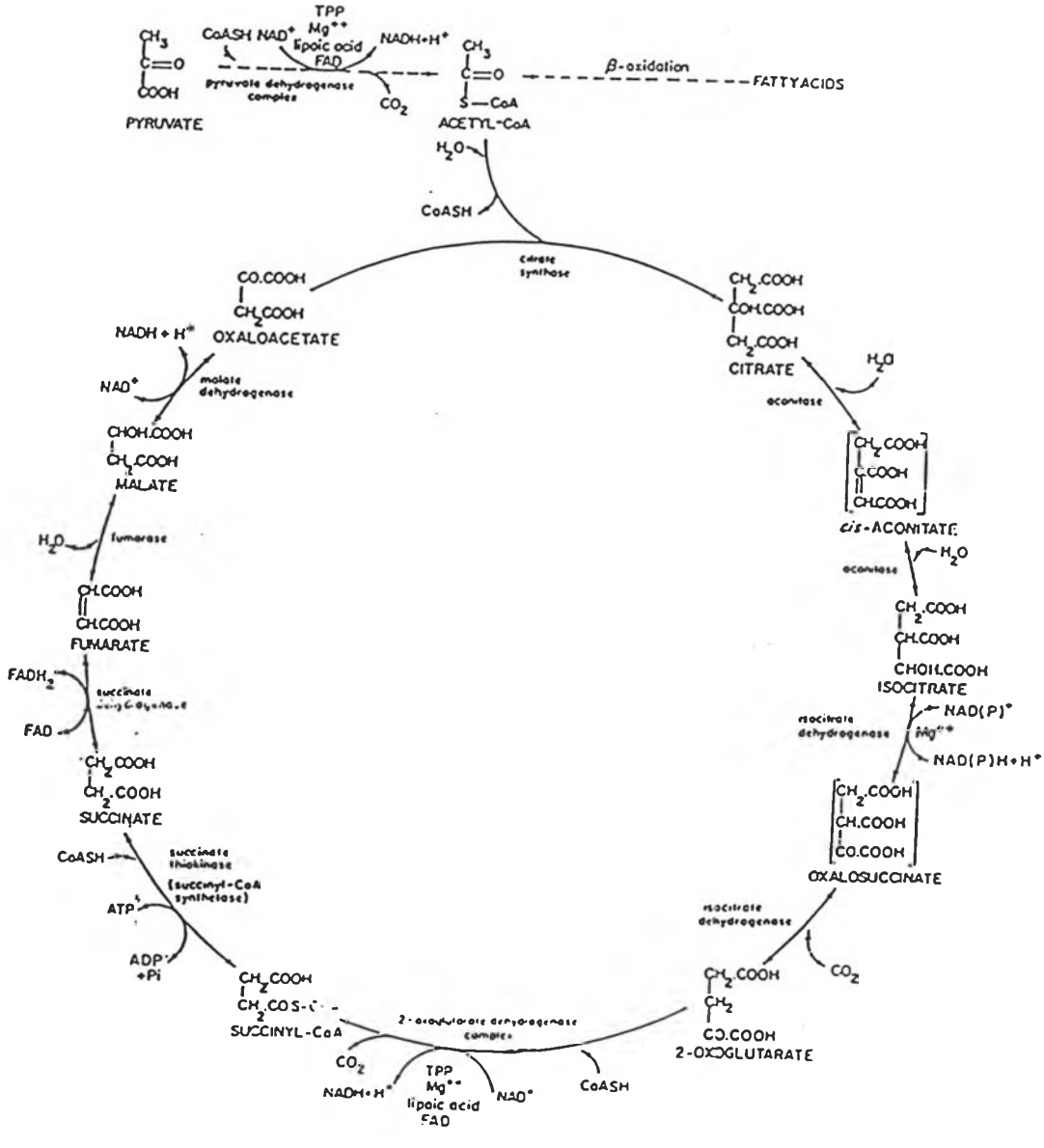
Suzuki และคณะ ในปี ค.ศ. 1974 รายงานการผลิตกรดมะนาวโดยศึกษาทั้งสายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์กลายที่ทำการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลท ว่าสามารถผลิตกรดมะนาวได้อย่างมีประสิทธิภาพและไม่เกิดกรดไอโซซิทริก พบว่า *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 45 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 10% ส่วนสายพันธุ์กลายคือ *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 73 กรัมต่อลิตร *Achromobacter nucleoacidoves* IFO 13268 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 0.6 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนอร์มอลพาราฟิน 6% สายพันธุ์กลายคือ *Achromobacter nucleoacidoves* ATCC 21683 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 72 กรัมต่อลิตร และ *Corynebacterium fascians* ATCC 21461 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิมสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 43 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนอร์มอลพาราฟิน 6% สายพันธุ์กลายคือ *Corynebacterium fascians* ATCC 21684 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 61 กรัมต่อลิตร (Suzuki *et al*, 1974)

Kimura และ Nakanishi ในปี 1975 ได้ศึกษาการผลิตกรดมะนาวจาก *Arthrobacter paraffineus* ATCC 15591 จากอาหารที่มีไฮโดรคาร์บอน(C_{12}-C_{14}) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเติมสารพวกเฟร์โรไซยาไนด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะส่งเสริมการผลิตกรดไอโซซิทริก และการเติมกรดโมโนฟลูออโรแอซีติก หรือ เกลือของมัน จะส่งเสริมการผลิตกรดมะนาว เมื่อเลี้ยง *Arthrobacter paraffineus* ATCC 15591 ในอาหารที่มีนอร์มอลพาราฟิน 5% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสด้วยเครื่องเขย่าแบบเส้นตรง พบว่าสามารถผลิตแคลเซียมซิเทรตได้ 9.3 กรัมต่อลิตร และถ้ามีการเติม 0.1% ของโซเดียมโมโนฟลูออโรแอซีติกลงไปที่ชั่วโมงที่ 6 ของการหมัก จะผลิตแคลเซียมซิเทรตได้เพิ่มขึ้นเป็น 18.2 กรัมต่อลิตร (Kimura and Nakanishi, 1975)

จะเห็นได้ว่าการศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากแบคทีเรีย มีการศึกษายังไม่กว้างขวางนัก แต่โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่ายีสต์และรา และสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้มากกว่า ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการลดต้นทุนการผลิต ในด้านการควบคุมอุณหภูมิ และเพิ่มพูนความรู้ในการผลิตกรดมะนาวในแง่ของแบคทีเรีย งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อจะทดลองผลิตกรดมะนาวโดยการหมักด้วยแบคทีเรียที่มีกลูโคสที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาการผลิตต่อไป

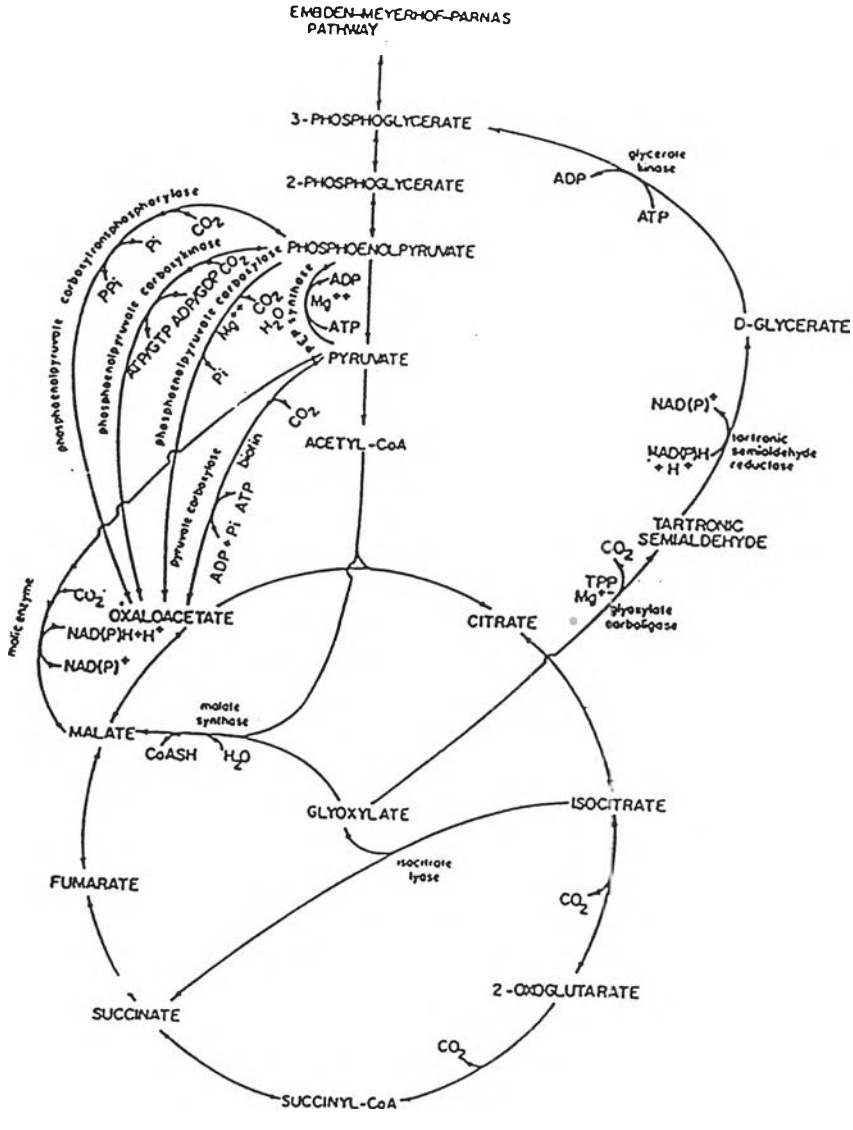
1.6 ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาว

กลไกการสังเคราะห์กรดมะนาวจากน้ำตาลกลูโคสแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน โดยขั้นแรกเป็นการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นไพรูเวท (pyruvate) และแอซีทิลโคเอนไซม์เอ(acetyl Co-A, C2)โดยกลไกไกลโคลิซีส และไพรูเวทรวมตัวกับคาร์บอนไดออกไซด์โดยเอนไซม์ไพรูเวทคาร์บอกซิเลต เป็นออกซาโลแอซิเทต(C4)โดยใช้ปฏิกิริยาการสร้างทดแทน (anaplerotic reaction) (รูปที่ 1-3) ขั้นสุดท้ายเป็นการสะสมกรดมะนาวโดยการเกิดความผิดปกติในวัฏจักรเครบส์ ซึ่งมีเอนไซม์หลักคือ อะโคนิเทส และไอโซซิเทรตดีไฮโดรจีเนส โดยกิจกรรม 2 ชนิดนี้จะอยู่ในระดับต่ำมากในระหว่างการผลิตกรดมะนาว ส่วนเอนไซม์ซิเทรตซินเทส จะมีกิจกรรมในระดับสูง (Ermakova *et al*, 1986; Shah *et al*, 1993)(รูปที่ 1-2)



<u>รูปที่ 1-2</u> วัฏจักรเครบส์หรือวัฏจักรกรดมะนาว

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



<u>รูปที่ 1-3</u> ความสัมพันธ์ของวัฏจักรเครบส์ และปฏิกิริยาการสร้างทดแทน

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

1.7 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาว

การผลิตกรดมะนาวโดยจุลินทรีย์นั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการ คือสายพันธุ์ที่ใช้ และภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ความแตกต่างกันของชนิดแบคทีเรีย และวิธีการที่ใช้จึงมีความสำคัญ ดังนั้นจะต้องมีการศึกษาปัจจัยทั้ง 2 ประการนี้ควบคู่กันไป

1.7.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย

แบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว เช่น *Bacillus, Aerobacter, Pseudomonas, Micrococcus* (Oomori and Suzue, 1973) ควรคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวสูง และมีการผลิตกรดมะนาวที่เสถียร ให้ผลการผลิตสม่ำเสมอ ซึ่งอาจทำได้โดยทำการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีความสามารถในการผลิตมากขึ้นโดยใช้รังสีที่มีพลังงานสูง เช่น อัลตราไวโอเลท รังสีแกมมา หรือใช้สารก่อการกลายพันธุ์ เช่น N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine เพื่อกระตุ้นให้เกิดพันธุ์กลายที่ให้ผลผลิตสูง นอกจากนั้นสายพันธุ์ที่ใช้ควรจะสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ให้กรดอินทรีย์ที่ไม่ต้องการในปริมาณน้อยที่สุด สายพันธุ์ที่ได้ควรทนต่อเกลือแร่ และใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น

1.7.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

1.7.2.1 สารแหล่งคาร์บอน

สารแหล่งคาร์บอน เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งในการผลิตกรดมะนาว ซึ่งต้องคำนึงถึงชนิดและปริมาณเพื่อให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว มีรายงานการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรียจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น กลูโคส (Oomori and Susue, 1973; Suzuki *et al*, 1974)นอร์มอลพาราฟิน (Suzuki *et al*, 1974) ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมกับการผลิตกรดมะนาวนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้ การเลือกสารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตควรเป็นสารที่หาได้สม่ำเสมอและราคาถูกและไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ อย่างเช่น กากน้ำตาลมีราคาถูกแต่มักมีปัญหาเกี่ยวกับปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนและสารยับยั้งการเจริญ จึงต้องมีการบำบัดสารแหล่งคาร์บอนดังกล่าวก่อนนำไปใช้เพื่อให้สามารถขยายไปสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้เป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากปริมาณน้ำตาลที่มากเกินอาจยับยั้งการเจริญและการผลิต หรือปริมาณน้ำตาลที่น้อยเกินไปอาจทำให้เกิดการสะสมกรดอินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ (Prescott and Dunn, 1983; Grewal and Kalra, 1995)

1.7.2.2 สารแหล่งไนโตรเจน

สารแหล่งไนโตรเจน มีทั้งสองรูปแบบคืออินทริย์ไนโตรเจน เช่นสารสกัดจากยีสต์ (Sardinas and Conn, 1973) น้ำแช่ข้าวโพด (Suzuki *et al*, 1974) น้ำมันถั่วเหลือง (Kimura and Nakanishi, 1975) เป็นต้น สารอนินทรีย์ไนโตรเจน มักใช้ในรูปแอมโมเนียมซัลเฟต หรือ แอมโมเนียมไนเทรต นอกจากนั้นยังใช้ โซเดียมไนเทรต โพแทสเซียม

ไนเทรต และยูเรีย มีรายงานการผลิตกรดมะนาวในราและยีสต์ว่า ปริมาณไนโตรเจนสูงจะส่งเสริมการเจริญแต่จะทำให้การผลิตกรดมะนาวช้าลง (Prescott and Dunn, 1983) และไนโตรเจนเป็นสารจำกัดการเจริญสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเริ่มมีการผลิตกรดมะนาวเมื่อไนโตรเจนถูกใช้เกือบหมด (Mckay; Maddox and Brooks, 1994)

1.7.2.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟต เป็นสารที่ใช้ในการเจริญของเซลล์ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสารชีวโมเลกุลซึ่งอยู่ภายในเซลล์ เช่นกรดนิวคลีอิก นิวคลิโอไทด์ และฟอสโฟลิปิด เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องมีการเติมฟอสเฟตในการผลิตกรดมะนาว การผลิตกรดมะนาวในราพบว่าปริมาณฟอสเฟตมากจะส่งเสริมการเจริญแต่จะให้ผลผลิตกรดต่ำ และการผลิตกรดมะนาวจะเริ่มหลังจากฟอสเฟตถูกใช้หมด (Szucs, 1944 อ้างถึงใน Prescott and Dunn, 1983) การเติมฟอสเฟตต้องเติมในปริมาณที่พอเหมาะคือที่ประมาณร้อยละ 0.1-0.2 เพราะการใช้ฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะทำให้เกิดกรดอื่นจากการเมแทบอลิซึมของน้ำตาล (Mall, 1978)

1.7.2.4 แร่ธาตุ

แร่ธาตุหลายชนิดมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว เช่น แมกนีเซียม เหล็ก และแมงกานีส เป็นต้น แมกนีเซียมเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายตัวในวัฏจักรเครบส์ เอนไซม์ที่มีแมกนีเซียมเป็นโคแฟกเตอร์ได้แก่ ไอโซซิทริกดีไฮโดรจีเนส และ 2-ออกโซกลูตาเรทดีไฮโดรจีเนสคอมเพล็กซ์ เนื่องจากผลของแร่ธาตุชนิดต่างๆ ที่มีในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดมะนาวจากแบคทีเรียไม่มีรายงาน จึงต้องอาศัยข้อมูลจากการผลิตกรดมะนาวจากราและยีสต์ และจากการผลิตกรดมะนาวโดยราและยีสต์พบว่า แมกนีเซียมเป็นสารประกอบที่มีความจำเป็นต่อการผลิตกรดมะนาว (Marison, 1988) โดยปกติซิเทรตมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสโฟฟรุกโทไคเนส (PFK) ในวิถีไกลโคลิซิส แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ Mg^{2+} หรือ NH_4^+ จะช่วยให้เอนไซม์ดังกล่าวสามารถจับเกาะกับสับสเตรตได้ดีขึ้น จึงไม่ถูกยับยั้งด้วยซิเทรต ความเข้มข้นของแมกนีเซียม ที่เหมาะสมประมาณ 0.20-0.25 กรัมต่อลิตร ส่วนเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์อะโคนิเทส ทำให้มีผลยับยั้งการสะสมกรดมะนาว จึงควรใช้ความเข้มข้นของเหล็กต่ำ ซึ่งมีปริมาณที่เหมาะสมต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม พบว่า การเติมทองแดงที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.1-500 พีพีเอ็ม มีผลยับยั้งผลของ Fe^{2+} ทำให้กรดมะนาวเพิ่มขึ้น และกรดไอโซซิทริกลดลง ส่วนสังกะสี พบว่า มีผลในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อ และมีผลยับยั้งการผลิตกรดมะนาว มีรายงานว่าปริมาณ Zn^{2+} 1-2 ไมโครโมล กระตุ้นการเจริญ แต่ที่ปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครโมล จะจำกัดการเจริญและกระตุ้นการผลิตกรด การสะสมกรดมะนาวจะเริ่มเมื่อมีปริมาณแมงกานีสต่ำมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Marison,1988)

1.7.2.5 สารเสริมอื่นๆ

ในการผลิตกรดมะนาว จะมีการเติมสารบางอย่างซึ่งจำเป็นต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว เช่น สารประกอบอินทรีย์ อย่างเช่นน้ำแช่ข้าวโพด (Oomori and Conn, 1973) และสารสกัดจากยีสต์ ซึ่ง Sikyta (1983) ศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบของสารสกัดจากยีสต์ พบว่าประกอบด้วยวิตามินชนิดต่างๆ ที่สำคัญได้แก่ ไทอะมีน ไรโบฟลาวิน กรดนิโคทินิก กรดแพนโททีนิก ไพริดอกซิน ไบโอทิน อินโนซิทอล และโคลีน ซึ่งส่งเสริมการเจริญเป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานว่าการเติมแอลกอฮอล์ที่ชนิดและปริมาณที่พอเหมาะจะส่งเสริมการเจริญและการผลิตกรดมะนาว (Kimura and Nakanishi, 1975) และจากการผลิตกรดมะนาวในยีสต์พบว่า แอลกอฮอล์มีผลในการต่อต้านสารโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสารแหล่งคาร์โบไฮเดรต หรือสารไขมันที่ช่วยเป็นสารกำจัดฟองและเพิ่มผลผลิต (Marison, 1988)

1.7.2.6 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

การหมักเพื่อการผลิตกรดมะนาวนั้น ในระหว่างการหมักต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างอย่างพอเหมาะ สำหรับรา เนื่องจากราสามารถทนต่อความเป็นกรดสูงได้ ดังนั้นจึงไม่มีการเติมสารเพื่อช่วยปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง อย่างเช่นแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปในการผลิต แต่การควบคุมระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมยังเป็นสิ่งที่จำเป็น การใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ (pH 3) จะให้ผลดีเนื่องจากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงจะชักนำให้เกิดการสะสมกรดชนิดอื่น (Shadafza *et al*, 1976 อ้างถึงใน Prescott and Dunn, 1983) การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ไม่เหมาะสมจะยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดมะนาว และยังอาจเกิดการสะสมของกรดชนิดอื่นได้ด้วย (Moresi *et al*., 1980) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมสารที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรีย จะใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ต้นเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเช่นเดียวกันกับยีสต์ (Sardinas and Conn, 1973)

1.7.2.7 อุณหภูมิและระยะเวลาในการหมัก

เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการผลิตกรดมะนาว จากรายงานการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้น พบว่าที่อุณหภูมิการผลิตสูงขึ้นการผลิตกรดมะนาวจะลดลง (Nakanishi *et al*, 1972; Furukawa *et al*, 1977) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาวแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ที่ใช้ (Sardinas and Conn, 1973; Suzuki *et al*, 1974; Kimura and Nakanishi, 1975) โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 28-37 องศาเซลเซียส

1.7.2.8 การให้อากาศและการกวน

การผลิตกรดมะนาวนั้น เป็นกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศ ดังนั้นจึงต้องให้ออกซิเจนในระหว่างการหมักมากพอ และมีระบบกวนพร้อมกับการให้อากาศ เพื่อให้มีการกระจายของออกซิเจน เนื่องจากการให้จุลินทรีย์ได้รับออกซิเจนเพียงพอจะทำให้การเจริญและการผลิตกรดมะนาวที่ดี Usami และคณะ ในปี 1960 รายงานว่าเมื่อมีการเพิ่มอัตราการให้อากาศ จะใช้เวลาในการผลิตน้อยลงและผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น (อ้างถึงใน Prescott and Dunn, 1983) สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้ยีสต์มีรายงานว่า เมื่อมีปริมาณค่าออกซิเจนละลายมากขึ้น ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวจะสูงขึ้น (Rane and Sims, 1993) ปริมาณออกซิเจนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ อุณหภูมิในการหมัก และขนาดของถังหมัก สำหรับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า ใช้วิธีการเขย่าแบบหมุนมากกว่าแบบเส้นตรง เนื่องจากการเขย่าแบบเส้นตรงจะเกิดการกระเด็นของสับสเตรตไปติดตามผนังขวดมากกว่าการเขย่าแบบหมุน (เรวดี เลิศไตรรักษ์, 2535)

1.8 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

กรดมะนาวเป็นกรดอินทรีย์ที่นำมาใช้กันมากในอุตสาหกรรม สำหรับประเทศไทยนั้นมีการนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศปริมาณมากทุกปี ดังแสดงในตารางที่ 1-2 ประเทศไทยได้เปรียบในแง่วัตถุดิบ ทั้งวัตถุดิบทางการเกษตรและวัสดุเหลือใช้ในทางเกษตรและอุตสาหกรรมมากมายที่หาได้ง่าย ราคาถูก ดังนั้นเพื่อลดปริมาณการนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศ จึงควรมีการพัฒนาปรับปรุงวิธีการผลิตทั้งด้านการควบคุมการผลิตและปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อที่จะสามารถผลิตกรดมะนาวออกมาสนองความต้องการทั้งในและนอกประเทศ ทั้งนี้อาจจะเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการขาดดุลการค้าระหว่างประเทศ

สำหรับแบคทีเรียนั้นแม้จะมีการศึกษาน้อยแต่ก็เป็นแนวทางในการผลิตกรดมะนาวอีกแนวทางหนึ่ง เนื่องจากแบคทีเรียนั้นสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้หลายชนิด และสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้มากกว่ายีสต์และรา ทั้งยังมีการเจริญเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วกว่า และสำหรับอุณหภูมินั้นเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดมะนาว เนื่องจากการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้น อุณหภูมิที่ใช้มีผลต่อการผลิตมาก เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของยีสต์จะลดลง (สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ, 2539) แต่สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรียนั้นการเลี้ยงในสภาพอาหารเหลวอยู่ในช่วง 28-37 องศาเซลเซียส และประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น การหมักในช่วงอุณหภูมิดังกล่าวจึงน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายของระบบทำความเย็นในการลดอุณหภูมิของถังหมัก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการผลิตกรดมะนาว

ของสายพันธุ์แบคทีเรีย โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว แล้วนำมาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ต่อไป

ตารางที่ 1-2 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวในประเทศไทย ระหว่างปีพ.ศ.2531-2542

ปี พ.ศ.	ปริมาณ (กิโลกรัม)	มูลค่า (บาท)
2531	777,111	26,127,593
2532	1,1460,893	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	2,222,539	72,735,321
2537	3,484,410	101,905,659
2538	5,568,146	171,830,940
2539	3,056,073	102,561,454
2540	4,535,422	150,003,744
2541	1,285,372	52,478,529
ม.ค.-ก.พ. 2542	323,554	12,307,281

ที่มา : กรมศุลกากร

1.9 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดมะนาวจากอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน และหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า

1.10 ขั้นตอนงานวิจัย

1.10.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ

1.10.2 การเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดมะนาวในอาหาร Bacillus Medium (BM) สูตรปรับปรุง

1.10.3 เปรียบเทียบสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า

1.10.4 การเจริญและการผลิตกรดมะนาวของ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนในระดับขวดเขย่า

1.10.5 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวของ *B. subtilis* ATCC 21610 ในระดับขวดเขย่าในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน

1.10.6 การผลิตกรดมะนาวของ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร