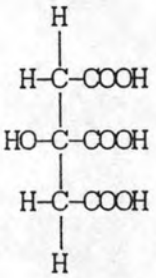
บทที่ 1

บทนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. ประวัติความเป็นมา

กรดมะนาว(citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1 มีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxy-1,2,3 propane tricarboxylic acid เป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ กรดมะนาวมีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ พบในผลไม้รสเปรี้ยว (citrus fruit) เช่น มะนาว ส้มโอ ส้มเขียวหวาน ลูกแพร์ ลูกพีช ลูกพิก (ผลไม้คล้ายมะเดื่อ) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในเนื้อเยื่อพืชและสัตว์ ซึ่งเป็นสิ่งยืนยันว่า กรดมะนาวเป็นกรดจากธรรมชาติที่ไม่เป็นอันตราย (Kubicek and Rohr, 1986) ดังนั้นในระยะแรกจึงมีการผลิตกรดมะนาวโดยการสกัดจากผลไม้รสเปรี้ยว ซึ่งมีความต้องการนำไปใช้อย่างมากทำให้ผลิตกรดมะนาวไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงมีการคิดวิธีการผลิตกรดมะนาวโดยการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งพบว่ามีขั้นตอนยุ่งยาก ไม่คุ้มกับการผลิตเป็นการค้า ต่อมาพบว่าเชื้อราโดยเฉพาะเชื้อ Aspergillus niger สามารถผลิตกรดมะนาวได้ในปริมาณสูงเพียงพอต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จึงมีการพัฒนาการผลิตกรดมะนาวโดยใช้กระบวนการหมักแบบต่างๆ (Kubicek and Rohr, 1986; Marison, 1988; Milsom and Meers, 1986; Prescott and Dunn, 1959)



รูปที่ 1 โครงสร้างของกรดมะนาว

2. จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมะนาว

จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณสูง และสามารถใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ เชื้อรา Aspergillus niger A. wenti Penicillium janthinellum P. restrictum และยีสต์ Candida lipolytica Saccharomycopsis oleophila Arthrobacter paraffineus ส่วนใหญ่นิยมใช้เชื้อรา A. niger และยีสต์ Candida lipolytica โดยต้องคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวได้สูง ผลิตกรดมะนาวอย่างสม่ำเสมอ ผลิตกรดอื่นที่ไม่ต้องการต่ำ และสามารถแยกกรดมะนาวจากสิ่งเจือปนอื่นได้ง่าย (Kubicek and Rohr, 1986; Marison, 1988; Prescott and Dunn, 1959)

3. กระบวนการหมักกรดมะนาว

กระบวนการผลิตกรดมะนาวมีวิธีการผลิตสองวิธีคือ การหมักบนผิวหน้าอาหาร (surface process) และการหมักในอาหารเหลว(submerged process) ซึ่งวิธีการแรกยังสามารถแบ่งตามลักษณะอาหารที่ใช้เป็นของแข็งและของเหลว โดยมีปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการเลือกวิธีการที่ใช้ในการผลิตคือ ต้นทุนในการผลิต เครื่องมือและอุปกรณ์ แหล่งพลังงานที่ใช้ บุคลากร ค่าแรงงาน ตลอดจนเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิตและการควบคุมการผลิต (Mattey, 1992; Schierholt, 1977)

3.1 กระบวนการหมักบนผิวหน้าอาหาร (surface process)

3.1.1 กระบวนการหมักบนผิวหน้าอาหารเหลว

กระบวนการหมักนี้เป็นวิธีการดั้งเดิมที่ใช้มานาน และยังนิยมใช้ในการผลิตกรดมะนาวจนถึงปัจจุบัน ซึ่งมีข้อดีคือ ต้นทุนการผลิตต่ำ แม้ว่าค่าแรงงานสูงกว่ากระบวนการหมักในอาหารเหลวก็ตาม (Mattey, 1992) วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักกรดมะนาวนิยมใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 5 - 7 เติมแหล่งอาหารอื่นๆที่จำเป็น ทำการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อน เทสารอาหารที่เย็นแล้วลงในถาดหรือภาชนะก้นแบนที่ทำจากวัสดุที่ทนการกัดกร่อนของกรดได้ ทำการถ่าย

สปอร์ของเชื้อรา A. niger โดยการพ่นกระจายสปอร์ลงบนผิวหน้าของอาหารเหลว (Mattey, 1992)

3.1.2 กระบวนการหมักบนผิวหน้าอาหารแข็ง (Koji process)

กระบวนการหมักนี้เป็นวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในประเทศญี่ปุ่น และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยใช้อาหารแข็งเป็นวัตถุดิบ เช่น รำข้าวและวัตถุเหลือใช้จากการเกษตรซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแป้งและเซลลูโลส นำมาม่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ประมาณ 5.5 แล้วจึงทำการเพาะเชื้อโดยการพ่นสปอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลานาน 4 - 5 วัน เชื้อราจะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลสเพื่อย่อยสลายวัตถุดิบแล้วผลิตกรดมะนาวออกมา จากนั้นจึงทำการสกัดกรดมะนาว ผลผลิตที่ได้ขึ้นอยู่กับการควบคุมปริมาณแร่ธาตุและปัจจัยต่างๆในการผลิต (Marison, 1988; Mattey, 1992)

3.2 กระบวนการหมักในอาหารเหลว (submerged process)

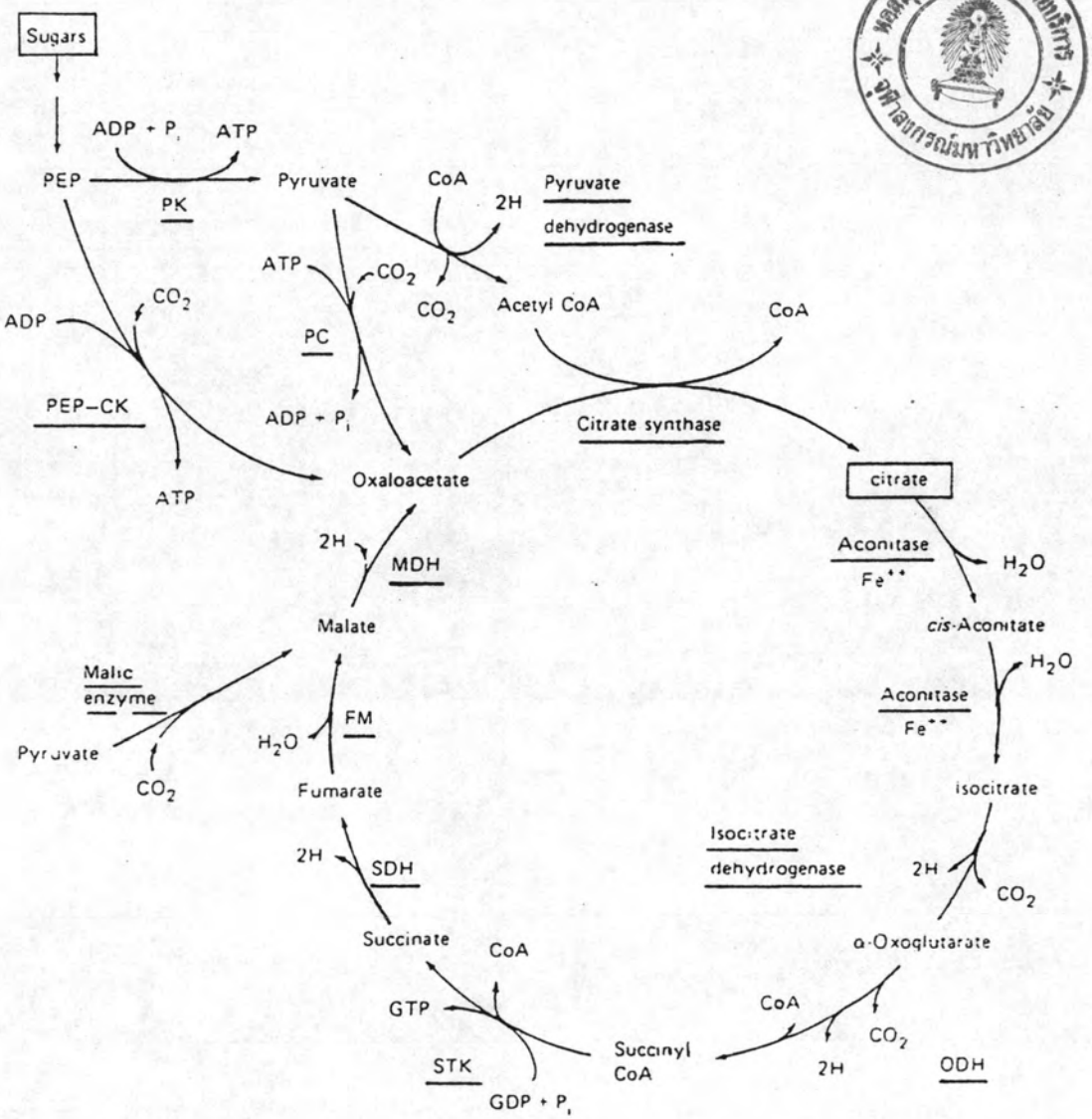
กระบวนการหมักนี้เป็นวิธีที่เลือกใช้ในประเทศอุตสาหกรรม ซึ่งต้องการบุคลากรน้อยในการปฏิบัติ แต่ให้อัตราการผลิตสูง และใช้พื้นที่น้อย มีการออกแบบเครื่องปฏิกรณ์(reactor)หลายรูปแบบเช่น เครื่องปฏิกรณ์แบบถังหมัก(tank reactor) เครื่องปฏิกรณ์แบบหอ (tower reactor) และเครื่องปฏิกรณ์แบบแอร์ลิฟท์(air-lift reactor) ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงการกวนผสม การให้อากาศ วัสดุที่ใช้ต้องทนการกัดกร่อนของกรดได้สูง (Mattey, 1992) กระบวนการหมักแบบนี้ใช้เวลาประมาณ 5- 10 วัน

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคใหม่มาประยุกต์ใช้ในการผลิตกรดมะนาว (Kubicek and Rohr, 1986) เช่น การใช้คอมพิวเตอร์ช่วยควบคุมในการหมัก (computer-aided fermentation control) โดยใช้คอมพิวเตอร์ในการควบคุมและประเมินผลของสภาวะในการหมัก การให้และการใช้อากาศ อัตราการใช้สารแหล่งคาร์บอน ผลผลิต และอัตราการผลิต วิธีนี้เหมาะสำหรับนำไปใช้ในโรงงานผลิตกรดมะนาวขนาดใหญ่ นอกจากนั้นยังใช้กระบวนการผลิตที่มีการเติมสารอาหารลงไปในระหว่างการหมัก(fed-batch submerged fermentation) ซึ่งช่วยในการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว (Dawson et.al., 1988) ส่วนวิธีการที่กำลังศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งยังไม่สามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ ได้แก่ กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง(continuous cultivation) (Kristiansen and

Sinclair, 1979; Roukas and Harvey, 1988) ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนามาจากกระบวนการหมักแบบกะ(batch submerged fermentation) (Kristiansen and Sinclair, 1978) นอกจากนั้นยังมีการนำเทคนิคการตรึงเอนไซม์มาใช้ในการผลิตกรดมะนาว โดยใช้วิธีการตรึงโคนีเดีย (Tsay and To, 1987) การตรึงกลุ่มของเส้นใย และการตรึงเซลล์ (Honecker et.al., 1989)

4. <u>ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาว (Biochemistry of citric acid production)</u>

กลไกการสังเคราะห์กรดมะนาวจากน้ำตาลกลูโคส แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยขั้นแรกเป็นการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นไพรูเวต (pyruvate) และอะซิทิลโคเอนไซม์เอ (acetyl-Co A) โดยกลไกไกลโคไลซีส (glycolysis) ต่อมาไพรูเวตรวมตัวกับคาร์บอนไดออกไซด์โดยเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลสเป็นออกซาโลอะซิเทต โดยใช้ปฏิกิริยาการสร้างทดแทน (anaplerotic reaction) ขั้นสุดท้ายเป็นการสะสมกรดมะนาว โดยการเกิดความผิดปกติในวัฏจักรเครปส์ (Kubicek and Rohr, 1986) ซึ่งมีเอนไซม์หลักคือ เอนไซม์อะโคนิเทส(aconitase) และเอนไซม์ไอโซซิเทรตดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) โดยเอนไซม์ทั้งสองจะมีแอคทิวิตีต่ำมากในระยะการผลิตกรดมะนาว ส่วนเอนไซม์ซิเทรตซินเธส (citrate synthase) จะมีแอคทิวิตีสูงขึ้น ทำให้เกิดการสะสมกรดมะนาวขึ้น (Scragg A.H.,1988)



รูปที่ 2 วิถีเมตาบอลิสมของการสังเคราะห์กรดมะนาวในเชื้อ Aspergillus niger

ที่มา : Marison, I.W., 1988.

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว

5.1 สารอาหารที่ใช้หมัก

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาวประกอบด้วยสารแหล่งคาร์บอน สารแหล่งไนโตรเจน ฟอสเฟต และอาหารเสริม ได้แก่ แร่ธาตุเสริม และสารอื่นๆที่ช่วยในการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว ในการผลิตกรดมะนาวต้องมีการจำกัดการเจริญของเชื้อราโดยการจำกัดปริมาณสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ เพื่อให้เชื้อราเกิดการสะสมกรดมะนาวและปล่อยออกมานอกเซลล์ (Marison, 1986)

5.1.1 สารแหล่งคาร์บอน

สารแหล่งคาร์บอน เป็นปัจจัยสำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งในการผลิตกรดมะนาว ซึ่งต้องคำนึงถึงชนิดและปริมาณเพื่อให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว (Hossain et.al., 1984; Xu et.al, 1989) สารแหล่งคาร์บอนที่ใช้สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อราได้แก่ น้ำตาล ซึ่งเป็นสารที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้โดยง่ายและเร็ว (Kubicek and Rohr, 1986; Rohr et.al., 1984) ส่วนใหญ่นิยมใช้น้ำตาลซูโครส กากน้ำตาลจากอ้อยและกากน้ำตาลจากหัวผักกาด นอกจากนั้นยังใช้น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลกลูโคส ซึ่งได้จากการย่อยของสารโพลีแซคคาไรด์ แป้งที่ผ่านการย่อย เป็นต้น ในกากน้ำตาลมักมีปัญหาเกี่ยวกับปริมาณโลหะหนักปนเปื้อนและสารยับยั้งการเจริญ จึงต้องมีการบำบัดสารแหล่งคาร์บอนดังกล่าวก่อนนำไปใช้ (Perlman and Sih, 1960) ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อมักใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง 14-22 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ซึ่งเชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง (Shu and Johnson, 1947, 1948a, 1948b)

5.1.2 สารแหล่งไนโตรเจน

โดยทั่วไปใช้สารแหล่งไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตหรือแอมโมเนียมไนเทรต นอกจากนั้นยังมีการใช้โซเดียมไนเทรต โพแทสเซียมไนเทรตและยูเรีย (Kubicek and Rohr, 1986; Rohr et.al., 1984) Kristiansen และ Sinclair(1978) รายงานว่า ไนโตรเจนเป็นสารจำกัดการเจริญสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อราเริ่มมีการผลิตกรดมะนาวเมื่อไนโตรเจนถูกใช้เกือบหมด ดังนั้นจึงควรมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน ส่วน Shephard (1963) รายงานว่า การเติมสารแหล่งไนโตรเจน

ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50-5000 ส่วนในล้านส่วน ในระหว่างการหมัก ทำให้อัตราการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น

5.1.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟต เป็นสารที่ใช้ในการเจริญของเซลล์เพื่อการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์และสารประกอบอื่นๆ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมฟอสเฟตในการผลิตกรดมะนาว โดยมีรายงานว่า ควรใช้ฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นต่ำที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว (Perquin, 1938) ส่วนการใช้ฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะทำให้เกิดกรดอื่นจากการเมตาบอลิสมของน้ำตาล (Martin and Steel, 1955)

5.1.4 แร่ธาตุเสริม

แร่ธาตุเสริม เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อผลผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อราต้องการแร่ธาตุสำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาว แร่ธาตุเสริมที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว ได้แก่ แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี ทองแดง และแมงกานีส (Tomlinson, et.al., 1950; 1951) โดยแมกนีเซียม เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายตัวในวิถีไกลโคไลซิส ซึ่งใช้ในการเจริญและการผลิตกรดมะนาว ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่เหมาะสมประมาณ 0.2-0.25 กรัมต่อลิตร (Marison, 1988) ส่วนเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์อะโคนิเทส ทำให้มีผลยับยั้งการสะสมกรดมะนาว จึงควรใช้ความเข้มข้นของเหล็กต่ำ ซึ่งมีปริมาณที่เหมาะสมแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม พบว่า การเติมทองแดงที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.1-500 ส่วนในล้านส่วน ช่วยลดผลการยับยั้งของเหล็กได้ ส่วนสังกะสี พบว่า มีผลในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อและมีผลยับยั้งการผลิตกรดมะนาว ส่วนแมงกานีส เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไอโซซิเทรตดีไฮโดรจีเนส ทำให้มีผลยับยั้งการสะสมกรดมะนาว (Kubicek, et.al., 1979) ซึ่งมีรายงานว่า การสะสมกรดมะนาวจะเกิดขึ้นเมื่อมีปริมาณแมงกานีสต่ำมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Clark et.al., 1966)

5.1.5 สารเสริม

เป็นสารที่มีผลในการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว สารเสริมที่นิยมใช้มีดังนี้

5.1.5.1 แอลกอฮอล์โมเลกุลต่ำ

Moyer (1953a, 1953b) รายงานว่า การเติมแอลกอฮอล์โมเลกุลต่ำ มีผลในการต่อต้านสารโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสารแหล่งคาร์โบไฮเดรต ในขณะที่ Rohr และคณะ (1984) รายงานไว้ว่า การเติมแอลกอฮอล์มีผลต่อองค์ประกอบของฟอสโฟไลปิดของเชื้อรา ทำให้เพิ่มความสามารถในการผ่านสารเข้าและออกจากเซลล์ โดยเชื้อรามีการปล่อยกรดมะนาวออกมาได้มากขึ้น (Maddox,et.al.,1986; Marison,1988) การเติมแอลกอฮอล์ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา แต่มีผลเพิ่มความทนของเชื้อราที่มีต่อไอออนของเหล็ก สังกะสี และแมงกานีส ทำให้ผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น (Marison, 1988)

5.1.5.2 สารไขมัน

สารไขมัน ส่วนใหญ่ใช้เป็นตัวกำจัดฟอง และเพิ่มผลผลิต Millis, Trumpy และ Palmer (1963) พบว่า น้ำมันธรรมชาติ โดยเฉพาะที่มีไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูงสามารถเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวได้ประมาณ 20 เปอร์เซนต์ โดยไม่มีผลต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรา Manonmani และ Sreekantiah (1987) รายงานว่า การเติมน้ำมันมะพร้าวเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ ทำให้การผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น

5.1.5.3 สารเสริมอื่นๆ

Marison (1988) และ Kubicek และ Rohr (1986) ได้สรุปการเติมสารเสริมอื่นๆที่มีผลในการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว เช่น แป้ง สารประกอบแอมโมเนียมและเอมีนออกไซด์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ สารประกอบฟลูโอไรด์ และ cyclic AMP เป็นต้น

5.2 สภาวะที่ใช้ในการหมัก

5.2.1 หัวเชื้อ

หัวเชื้อที่ใช้ในการหมักกรดมะนาว สามารถใช้ได้ทั้งในรูปสปอร์และเส้นใยของเชื้อรา ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่า เชื้อรา A. niger ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูง เมื่อเชื้อมีการเจริญในรูปเม็ดสาคู(pellets) Gomez และคณะ (1988) ทำการทดลองเปรียบเทียบการใช้สปอร์ของเชื้อ A. niger กับหัวเชื้อที่เป็นเม็ดสาคูในถังหมักขนาด 5 ลิตร

พบว่า การหมักโดยใช้หัวเชื้อเป็นเม็ดสาคู จะให้ลักษณะกลุ่มของเส้นใยเป็นเม็ดสาคูกลม ขนาดเล็ก แน่น เรียบ และมีขนาดมาตรฐานเท่ากัน ซึ่งทำให้น้ำหมักมีความหนืดต่ำ การใช้ออกซิเจนต่ำกว่าเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย ทำให้เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง และมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายสูง และเริ่มคงที่เมื่อเวลา 72 ชั่วโมงหลังจากการใส่หัวเชื้อ อย่างไรก็ตาม อายุของสปอร์เป็นปัจจัยสำคัญเช่นกัน โดยพบว่า เมื่อใช้สปอร์อายุแก่กว่า 7-8 วัน จะให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำ (Marison, 1988)

5.2.2 <u>ความเป็นกรดด่าง</u>

การรักษาค่าความเป็นกรดด่างให้ต่ำ (ประมาณ 2) เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว ทำให้เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้มากและผลิตกรดอื่นที่ไม่ต้องการได้ต่ำ (Kubicek and Rohr, 1986; Marison, 1988) ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวอยู่ในช่วง 1.7-2.0 (Rohr et.al., 1984) ถ้าความเป็นกรดด่างมีค่าสูงกว่า 2.5 เชื้อจะมีการผลิตกรดออกซาลิกและกรดกลูโคนิค และมีโอกาสปนเปื้อนสูง (Roukas and Harvey, 1988) แต่ถ้าความเป็นกรดด่างมีค่าต่ำกว่า 1.5 เชื้อจะมีอัตราการเจริญต่ำ ทำให้ผลิตกรดมะนาวได้ต่ำ (Kubicek and Rohr,1986)

5.2.3 <u>อุณหภูมิ</u>

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา อยู่ในระหว่าง 25 - 35 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป ทำให้เกิดกรดออกซาลิค แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไป อัตราการผลิตกรดมะนาวจะต่ำ (Prescott and Dunn, 1959)

5.2.4 <u>การกวนผสมและการให้อากาศ</u>

เชื้อรามีความต้องการออกซิเจนสูงและสม่ำเสมอ จึงจำเป็นต้องมีการให้อากาศและการกวนที่เหมาะสม และเพียงพอต่อความต้องการ (Dawson et.al., 1988) อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ ขนาดของถังหมักและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยส่วนใหญ่มักมีการควบคุมอัตราการให้อากาศ และมีการแปรผันอัตราการกวน ซึ่งมีผลต่อการละลายของออกซิเจนมากกว่าอัตราการให้อากาศ (Marrison, 1988)

5.2.5 การหมักแบบ fed-batch culture

กระบวนการหมักแบบ fed-batch culture เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารในระหว่างการหมัก โดยไม่มีการดึงน้ำหมักออกจากถังหมักตลอดการผลิต ทำให้ปริมาตรน้ำหมักเพิ่มขึ้น นิยมใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ กรดอะมิโน เอนไซม์ เซลล์จุลชีพ และกรดอินทรีย์ (Hong, 1986) การเติมสาร เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหมักนี้ ซึ่งมีทั้งการเติมแบบต่อเนื่องและการเติมแบบเป็นครั้งคราว โดยมีปัญหาที่สำคัญคือ การหาอัตราการเติมสารที่เหมาะสมต่อการหมัก ซึ่งมีการศึกษาเกี่ยวกับรูปแบบของอัตราการเติมที่เหมาะสมต่อการหมัก (Modak, Lim and Tayeb, 1986)

Dawson และคณะ (1988) ทำการผลิตกรดมะนาวโดยกระบวนการหมักแบบ fed-batch culture ซึ่งมีการเติมสารแหล่งไนโตรเจนในอัตรา 0.23-0.69 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยเติมก่อนไนโตรเจนถูกใช้หมด พบว่า เชื้อรา สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 91 กรัมต่อลิตร สูงกว่าการหมักแบบ batch culture 15 เปอร์เซนต์ และมีรายงานว่า ในระหว่างการหมักกรดมะนาว ควรมีการเติมสารแหล่งไนโตรเจน โดยการควบคุมให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมไอออนภายในเซลล์อยู่ในระหว่าง 2 – 3 มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์ หรือมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทในน้ำหมักประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะทำให้เชื้อรามีอัตราการผลิตกรดมะนาวสูงสุด สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าการหมักแบบไม่มีการเติมสารแหล่งไนโตรเจนถึงสองเท่า (Choe and Yoo, 1991) ต่อมา Dawson, Maddox และ Brooks (1989) ศึกษาการเติมสารฟอสเฟตควบคู่กับการเติมสารไนโตรเจน พบว่า ควรมีการจำกัดปริมาณสารฟอสเฟตในสภาวะเริ่มต้น และมีการเติมในระหว่างการหมัก เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาว

6. สมบัติและประโยชน์ของกรดมะนาว

กรดมะนาวมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_8O_7$ โดยมีอุณหภูมิการเปลี่ยนรูปที่ 36.6 องศาเซลเซียส ค่าคงที่ของการแตกตัวที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็น $K_1 = 8.2 \times 10^{-4}$ $K_2 = 1.77 \times 10^{-5}$ $K_3 = 10^{-7}$ (Grayson and Eckroth, 1979)

สมบัติของกรดมะนาว (Milsom and Meers, 1986)

1. เป็นกรด มีรสเปรี้ยว เป็นสารเพิ่มรสชาติ
2. สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะ เช่น เหล็ก ทองแดง
3. เป็นสารทำให้เกิดความคงตัว (stabillizer)
4. เป็นสารทำให้เกิดอิมัลชั่นและการเป็นฟอง

รูปผลิตภัณฑ์ที่มีขายตามท้องตลาด (Milsom and Meers, 1986)

1. ผลึกแอนไฮดรัส ได้จากการตกผลึกสารละลายกรดมะนาวที่ร้อน
2. ผลึกโมโนไฮเดรต ได้จากการตกผลึกสารละลายกรดมะนาวที่ต่ำกว่า 36.6 องศาเซลเซียส
3. เกลือของกรดมะนาว เช่น โซเดียมซิเทรต

ประโยชน์ของกรดมะนาว (Milsom and Meers, 1986)

กรดมะนาวใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท แบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. ทางอาหารและเครื่องดื่ม ส่วนมากใช้กรดมะนาวเป็นสารทำให้เกิดกรดและเพิ่มรสชาติ โดยใช้ในเครื่องดื่มอย่างอ่อน น้ำอัดลม น้ำหวาน น้ำผลไม้ ไวน์ เยลลี แยม ลูกอม ลูกกวาด เนย อาหารกระป๋อง และอาหารแช่แข็ง ใช้เป็นสารป้องกันการขุ่นและการตกตะกอนในเครื่องดื่มที่ทำจากผลไม้ ไวน์ นอกจากนั้นยังใช้โมโนสเตอริลซิเทรตเป็นสารป้องกันการออกซิเดชันและการเหม็นหืนของไขมันและน้ำมัน

2. ทางด้านเภสัชกรรม ใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมในการทำยาบางชนิด โดยใช้เป็นสารปรับค่าความเป็นกรดด่าง ช่วยทำให้เกิดฟองเมื่อรวมกับคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนตในยาลดกรดในกระเพาะอาหาร และการเตรียมยาแอสไพริน ช่วยในการละลายของยาถ่ายและยาบรรเทาความเจ็บปวด ใช้เป็นสารกันการตกตะกอน ใช้เป็นสารทำให้เกิดความคงตัว

ของกรดแอสคอบิค ใช้เป็นสารเพิ่มรสชาติของยา นอกจากนั้นยังใช้เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเทรตช่วยในการรักษาโรคโลหิตจาง

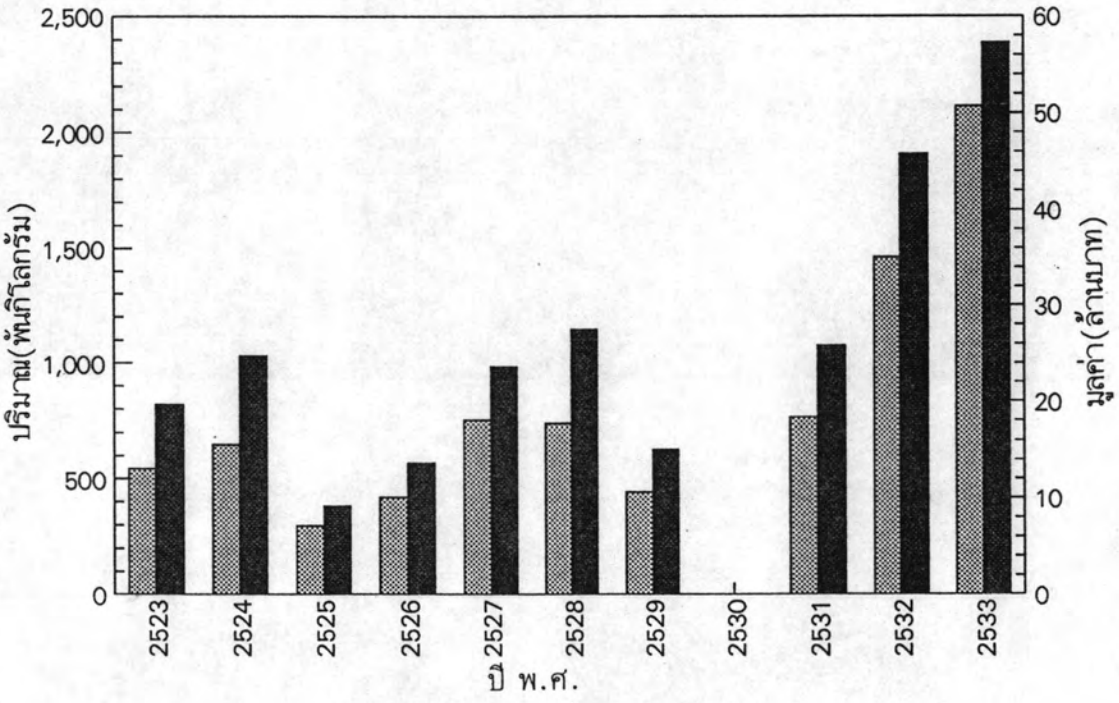
3. <u>ทางด้านเครื่องสำอาง</u> ใช้เป็นส่วนผสมของครีมนวดผม น้ำยาเซทผม โลชั่นทาผิว โดยใช้กรดมะนาวเป็นสารปรับความเป็นกรดด่าง ทำให้เกิดความแวววาว และความอ่อนนุ่มของผลิตภัณฑ์

4. <u>ทางด้านอุตสาหกรรมอื่นๆ</u> ใช้กรดมะนาวในรูปไตรโซเดียมซิเทรตแทนสารฟอสเฟตในการทำผงซักฟอก ใช้เอสเทอร์ของกรดมะนาว โดยเฉพาะไตรเอทิล ไตรบิวทิล และอะซิทิลไตรบิวทิลเอสเทอร์ใช้เป็น plasticizer ที่ไม่เป็นอันตรายในการทำฟิล์มพลาสติก ใช้ไดไฮโดรเจนซิเทรต(H_2Cit^-) ในการขจัดซัลเฟอร์ไดออกไซด์จากก๊าซเชื้อเพลิง ในโรงไฟฟ้าและเตาหลอมโลหะ นอกจากนั้น ยังใช้กรดมะนาวผสมในการทำความสะอาด boiler โลหะ และล้างสนิม เนื่องจากสามารถรวมตัวกับโลหะหนักได้ดี

7. มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

กรดมะนาว เป็นกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้กันมากที่สุดชนิดหนึ่ง ซึ่งมีการผลิตกรดมะนาวประมาณ 400,000 ตันต่อปี (Mattey, 1992) โดยส่วนใหญ่ผลิตจากเชื้อรา A. niger กรดมะนาวสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ยา เครื่องสำอาง และอื่นๆ เนื่องจากสมบัติที่ดีคือ กลิ่นรส ความเป็นกรด ซึ่งไม่เป็นอันตราย สำหรับประเทศไทยก็มีการใช้กรดมะนาวอย่างกว้างขวาง ถึงแม้ว่าจะมีโรงงานผลิตกรดมะนาวขึ้นเองภายในประเทศ แต่กำลังการผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการซึ่งมีอยู่สูง จึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศเป็นมูลค่าหลายล้านบาทต่อปี (รูปที่ 3) นอกจากนั้น แป้งมันสำปะหลัง ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดมะนาวในงานวิจัยนี้ เป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีปริมาณมากภายในประเทศ จึงควรมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นกรดมะนาว

งานวิจัยนี้ เป็นการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกแล้ว (ศยามล นองบุญนาก, 2534) โดยใช้กระบวนการหมักในอาหารเหลว ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นสารแหล่งคาร์บอน โดยเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบ batch culture และแบบ fed-batch culture เพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมต่อไป



รูปที่ 3 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวของประเทศไทยระหว่างปี 2524-2533

โดยที่

▨ ปริมาณ

■ มูลค่า

ที่มา : Thailand Import Monitor, 1991-1992.

Alpha Research Co., Ltd.

ISSN 0858-1703, p. II-336.

8. ขั้นตอนการดำเนินงาน

8.1 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า ด้วยเชื้อ A. niger A185 ศึกษาปัจจัยต่อไปนี้

8.1.1 สมบัติและปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอน

8.1.2 ชนิดและปริมาณแร่ธาตุเสริมที่สำคัญ

8.1.3 อายุของหัวเชื้อ

8.1.4 การเติมสารไขมัน

8.1.5 การเติมสารแอลกอฮอล์โมเลกุลต่ำ

โดยควบคุมสภาวะการเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที

8.2 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเชื้อ A. niger A185 โดยใช้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 9.1 ควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ศึกษาปัจจัยต่อไปนี้

8.2.1 การหมักแบบ batch culture ศึกษาปัจจัยต่อไปนี้

8.2.1.1 ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย โดยการผันแปรอัตราการกวนในช่วง 300-600 รอบต่อนาที และควบคุมอัตราการให้อากาศเป็น 1.0 v.v.m.

8.2.2 การหมักแบบ fed-batch culture ศึกษาปัจจัยต่อไปนี้

8.2.2.1 อัตราการเติมแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย

8.2.2.2 การจำกัดปริมาณสารฟอสเฟตเริ่มต้น

8.2.2.3 การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย

8.3 วิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลเชิงจลนศาสตร์ ระหว่างกระบวนการหมักในระดับขวดเขย่ากับในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งใช้กระบวนการหมักแบบ batch culture และ fed-batch culture

018933