

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การผลิตกรดมะนาวจากแป้งโดย Protease-negative mutant strain ของเชื้อรา

Aspergillus niger

(Citric acid production from starch by Protease-negative
mutant strains of *Aspergillus niger*)

โดย ผศ.ดร.ยุวดี วัฒนโกศาสิน

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2543

Abstract

Selection of protease-negative mutant strains of *Aspergillus niger* Yang no.2 in semi-solid culture was carried out in order to enhance citric acid production from agricultural crop. The protease-negative mutant strains were obtained by UV-irradiation of the parental strain Yang no.2. Using the halo-selection medium, a number of mutants with decreased extracellular protease activity were selected. Citric acid productivity by the selected mutant strains was tested on a modified starch-methyl red agar plate. The best mutant strain SWU-52 was obtained and produced 66.3, 111.0, 371.6 and 487.2 g/l of citric acid, whereas the parental strain Yang no.2 produced 36.8, 25.5, 288.1 and 333.9 g/l, from potato starch, flint corn, sorghum and yam bean, respectively in semi-solid culture. Moreover, during the whole period of cultivation with soluble starch, the extracellular glucoamylase activity of SWU-52 was higher than that of the parental strain Yang no.2. In addition, when 17 g/plate of rod-shaped yam bean was used instead of soluble starch, the protease-negative mutant strain SWU-52 produced 487.2 g/l of citric acid, which is approximately 1.5 times as much citric acid as Yang no.2 produced and showed enhanced extracellular glucoamylase production.

บทคัดย่อ

ผลการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส รวมทั้งเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส ของ *Aspergillus niger* Yang no.2 โดยใช้แหล่งต้นตอของคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น Soluble starch แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด ข้าวฟ่าง และ มันแกว เป็นต้น พบว่า *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) นั้น แหล่งต้นตอของคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ใช้สามารถเจริญได้ดี โดยให้ผลผลิตของกรดมะนาว และปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่แตกต่างกันไปตามชนิดของแหล่งต้นตอที่ใช้ โดยไม่สามารถวัดปริมาณของแอลฟาอะไมเลสได้เนื่องจากมีปริมาณที่ต่ำมาก นอกจากนั้นจากผลการศึกษาหาระดับปริมาณของกรดมะนาว และเอนไซม์ Protease ในช่วงเวลาต่างๆ ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) เมื่อใช้ Soluble starch ปริมาณ 140 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน พบว่า เมื่อเจริญ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในอาหารสูตร SS เป็นเวลานาน 5 วัน จะให้กรดมะนาวสูงสุด เท่ากับ 59.2 กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาวัดปริมาณของเอนไซม์ Acid protease ตลอดระยะเวลา 6 วันของการเจริญ พบว่า *Aspergillus niger* Yang no.2 สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ Acid protease ได้สูงสุดถึง 3.88 U/ml เมื่อเวลาผ่านไป 5 วันของการเจริญ

ผลจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Protease ต่ำ นั้น พบว่า เชื้อรา *Aspergillus niger* SWU-52 เป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดเมื่อใช้ Soluble starch เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน (112.3 กรัมต่อลิตร) และยังสามารถแสดงถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงถึง 27.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) และเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus niger* SWU-52 ไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวจากวัสดุทางการเกษตรคือ แป้งมันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และมันแกว เปรียบเทียบกับเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 พบว่า SWU-52 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่า Yang no.2 ถึงประมาณ 1.5 เท่า และยังสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้เพิ่มมากยิ่งขึ้นหลังจากการเจริญผ่านไปหนึ่งวันโดยสามารถสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดถึงประมาณ 59.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้เวลาในการเจริญ 3 วัน ในขณะที่ Yang no.2 ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้เพียง 21.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาที่ดำเนินการวิจัย

กรดมะนาว (Citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมการผลิต เครื่องสำอาง เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากกรดมะนาวมีความสามารถในการละลายสูง ความเป็นพิษต่ำ และให้รสเปรี้ยวที่ยอมรับได้ จากการศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยรา พบว่า เชื้อรา *Aspergillus niger* เป็นราที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม เพราะจะทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูง และเนื่องจากความต้องการกรดมะนาวเพื่อป้อนเข้าสู่โรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ มีมาก ดังนั้น กระบวนการผลิตกรดมะนาวโดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกเช่น วัสดุที่มีแบ่งเป็นองค์ประกอบ จึงถูกพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็ว อีกทั้งศักยภาพในการหมัก เพื่อผลิตกรดมะนาวในปัจจุบันนี้ ได้ทำให้ผลผลิตของกรดมะนาวสูงกว่า 350,000 ตันต่อปี จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ตัวแปรที่มีความสำคัญในการผลิตกรดมะนาวให้มีราคาถูกคือ ขั้นตอนและกระบวนการผลิต สายพันธุ์ของรา และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีการผลิตวัตถุดิบทางการเกษตรป้อนเข้าสู่ตลาดโลกอย่างมากมาย หนึ่งในวัตถุดิบดังกล่าวคือ แป้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแป้งมันสำปะหลัง และจากการศึกษาพบว่าในการย่อยแป้งมันสำปะหลังนั้น เอนไซม์ที่มีบทบาทอย่างยิ่งก็คือ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิด และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้ในระดับหนึ่ง ดังนั้นหากนำเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยเฉพาะเชื้อราสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตทั้งเอนไซม์ชนิดที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้ง (Amylase) และเอนไซม์ที่ ย่อยสลายเส้นใยเซลลูโลสได้ (Cellulase) ในสายพันธุ์เดียวกัน และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการต้านต่อ น้ำตาลที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับกลูโคส (Glucose analogue) อาทิเช่น 2-Deoxy-D-Glucose (DG) หรือ 2-Deoxy-2-fluoro-D-glucose (DFG) มีความสามารถในการผลิตทั้งเอนไซม์ Glucoamylase และ β -Glucosidase จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้ในการผลิตกรดมะนาวจากวัสดุการเกษตรจำพวกแป้งที่มีอยู่มากในประเทศไทย ซึ่งก็อาจจะนำไปสู่การพัฒนากระบวนการผลิตกรดมะนาวที่ใช้แหล่งต้นตอของพลังงานที่มีราคาถูก

และมีอยู่มากมายภายในประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย กล่าวคืออาจจะนำไปสู่การพัฒนาคุณภาพชีวิตของประชากรในภูมิภาคได้ ต่อไป

ด้วยเหตุที่วัตถุดิบทางการเกษตรเซลลูโลสและแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก หนึ่งในวัตถุดิบดังกล่าวคือ แป้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแป้งมันสำปะหลัง และจากการศึกษาพบว่าในการย่อยแป้งมันสำปะหลังนั้น เอนไซม์ที่มีบทบาทอย่างยิ่งก็คือ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิด และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้ในระดับหนึ่ง ดังนั้นหากนำเชื้อรา *Aspergillus niger* มาใช้ในการผลิตกรดมะนาวจากวัสดุการเกษตรจำพวกแป้งที่มีอยู่มากในประเทศไทยก็อาจจะนำไปสู่การพัฒนากระบวนการผลิตกรดมะนาวที่ใช้แหล่งต้นตอของพลังงานที่มีราคาถูก และมีอยู่มากมายภายในประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Aspergillus niger* ให้มีประสิทธิภาพและความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้ดี เพื่อนำไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมต่อไป และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เมื่อมีการยับยั้งปริมาณของเอนไซม์ Protease ในระหว่างการผลิตกรดมะนาวด้วยแป้งแล้วจะมีผลทำให้มีปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้มีการผลิตกรดมะนาวมากยิ่งขึ้น ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ Protease (Protease-negative) ซึ่งจะทำให้มีผลต่อระดับปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและอาจจะมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวเมื่อใช้แหล่งต้นตอของพลังงานเป็นวัสดุทางการเกษตรจำพวกแป้งได้ ซึ่งมีกลูโคสเป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงพยายามศึกษาถึงกระบวนการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อใช้ในการผลิตกรดมะนาว ศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากวัตถุดิบที่ได้ รวมทั้งรูปแบบการสร้างสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อใช้ในการผลิตกรดมะนาว และเนื่องจากสารต้นตอในการผลิตกรดมะนาวที่คาดว่าจะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดมะนาวอยู่ในสภาวะที่เป็นของแข็ง จึงต้องใช้เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2 เพราะเป็นสายพันธุ์ที่เคยมีรายงานว่ามีความสามารถผลิตกรดมะนาวในสภาวะแบบ Semi-solid culture จึงมีความจำเป็นที่จะต้องสร้างสายพันธุ์ของเชื้อราที่ให้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ทั้งนี้เพื่อที่จะพัฒนาหรือเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวโดยใช้แหล่งวัตถุดิบที่มีราคาถูกจำพวกแป้ง (Starchy materials)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- ก. ศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากทางการเกษตรจำพวกแป้งโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบ Semi-solid culture
- ข. จากข้อ ก. ศึกษาระดับของเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเช่น เอนไซม์ Glucoamylase α -amylase และ Protease

- ค. ปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 โดยวิธีการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตของกรดมะนาวให้สูงขึ้น โดยการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีปริมาณของ เอนไซม์ Protease ต่ำ
- ง. หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวจากสายพันธุ์กลายที่ได้จากข้อ ค. โดยใช้วัสดุจำพวกแป้งเป็นแหล่งต้นตอของพลังงาน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 จะเป็นสายพันธุ์ของราที่คาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวจากวัตถุดิบราคาถูกเช่น วัสดุจำพวกแป้ง เนื่องจากสายพันธุ์ดังกล่าวนี้ เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ดี เอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุจำพวกแป้ง (Starchy materials) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะเป็น กลูโคส จากนั้นกลูโคสที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวต่อไป ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตกรดมะนาวในประเทศไทยนั้น นิยมใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิตและกระบวนการที่ใช้เป็นแบบ Solid culture ซึ่งกระบวนการผลิตโดยวิธีดังกล่าวนี้จำเป็นจะต้องใช้พื้นที่ในการผลิตค่อนข้างมาก และมีโอกาสในการเกิดการปนเปื้อน (Contamination) ของจุลินทรีย์อื่นได้ ซึ่งจะมีผลอย่างมากต่อการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น วัสดุจำพวกแป้งซึ่งเป็นวัสดุทางการเกษตรที่มีมากและราคาถูก ดังนั้น จึงเป็นอีกหนทางหนึ่งที่สามารถจะลดต้นทุนในการผลิตกรดมะนาวเพื่อที่จะแข่งขันกับตลาดต่างประเทศได้ ผู้วิจัยจึงพยายามที่จะใช้สายพันธุ์ของราที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวด้วยวัสดุดังกล่าวมาใช้ให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งเพื่อเพิ่มคุณค่าของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้ให้สูงขึ้นซึ่งอาจนำไปสู่การยกระดับฐานะทางเศรษฐกิจ และความเป็นอยู่ของเกษตรกรให้ดียิ่งขึ้น อีกทั้งยังเป็นการนำไปสู่การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกรดมะนาวในประเทศไทย และอาจเป็นการสร้างความร่วมมือระหว่างภาคธุรกิจเอกชนและหน่วยงานของรัฐต่อไป

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณสมบัติและประโยชน์ของกรดมะนาว

กรดมะนาวหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กรดซิตริก ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล 3 หมู่ (Tricarboxylic acid) มีชื่อทางเคมีว่า 2-ไฮดรอกซี-1, 2, 3-โพรเพนไตรคาร์บอกซิลิกแอซิด (2-Hydroxy-1, 2, 3 propanetricarboxylic acid) หรือ เบต้า-ไฮดรอกซีไตรคาร์เบลลิลิกแอซิด (β -Hydroxytricarballic acid) และมีสูตรทางเคมีเป็น $C_6H_8O_7$

กรดมะนาวมีน้ำหนักโมเลกุล 192.12 และประกอบด้วย คาร์บอน 37.51% ไฮโดรเจน 4.20% และออกซิเจน 58.29% (Windholz *et al* , 1976) กรดมะนาวที่อยู่ในรูปแอนไฮเดรต (Anhydrate) จะมีจุดเดือดที่ 153 องศาเซลเซียส ในรูปผลึกที่เป็นโมโนคลินิกไฮโลอีดรา (Monoclinic holohedra) จะมีค่าความหนาแน่น (d) 1.665 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่า pK1 เท่ากับ 3.128 ค่า pK2 เท่ากับ 4.767 และ pK3 เท่ากับ 6.396 กรดมะนาวจะละลายในน้ำได้ดีขึ้น หากอุณหภูมิของน้ำสูงขึ้น Bates และ Pinching (อ้างถึงใน Winholz และคณะ, 1976) รายงานว่าค่าการละลายในน้ำของกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จะมีค่า 54.0% (w/w) ที่ 20 องศาเซลเซียส มีค่า 59.2% ที่ 30 องศาเซลเซียส มีค่า 73.5% ที่ 70 องศาเซลเซียส มีค่า 76.2 % ที่ 80 องศาเซลเซียส มีค่า 78.8% ที่ 90 องศาเซลเซียส มีค่า 81.4% ที่ 100 องศาเซลเซียส มีค่า 84.0% กรดมะนาวอยู่ในรูปโมโนไฮเดรต (Monohydrate) หรือออโธโรมบิกคริสตัล (Orthorombic crystal) เมื่ออยู่ในอุณหภูมิปกติสารละลายกรดมะนาวมีความหนาแน่น 1.542 และสูญเสียน้ำในสภาวะแห้ง หรือมีอุณหภูมิที่ 40-50 องศาเซลเซียส แต่หากอยู่ในสภาวะอากาศชื้นจะละลายที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส จุดเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส pH 2.2 สารละลายกรดมะนาว 10% จะมีความหนาแน่น 1.0392 ที่ 30% จะมีความหนาแน่น 1.2244 ที่ 40% จะมีความหนาแน่น 1.1709 ที่ 50% จะมีความหนาแน่น 1.2204 ที่ 60% จะมีความหนาแน่น 1.2738 (Halbeisen, 1948 อ้างถึงใน Windholz *et al*, 1976)

ปัจจุบันการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมอาศัยการหมักด้วยเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ ถึงแม้ว่าวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อผลิตกรดมะนาวมีแนวโน้มเป็นไปได้ก็ตาม แต่ให้ผลไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตที่ได้รับจากการหมัก กรดมะนาวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากทั้งในด้านอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม การเภสัชกรรม และใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ โดยกรดมะนาวที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มนั้นได้แก่ เครื่องดื่มที่ทำจากน้ำผลไม้ทั้งชนิดเข้มข้นและ

เจือจาง ในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนมได้แก่ เนยแข็ง นมข้น ชนิดระเหยนำออก นอกจากวัตถุประสงค์เพื่อปรับสภาพกรด (Acidulant) เนื่องจากกรดมะนาวมีความสามารถในการละลายสูง ความเป็นพิษต่ำ และให้รสเปรี้ยวที่ยอมรับได้ ทั้งยังป้องกันการเสียในอาหารหรือประเภทน้ำเชื่อมเข้มข้น (Syrup) ป้องกันการขึ้นเนื่องจากตะกอนในโวน์ ป้องกันการตกผลึกในน้ำผึ้ง ป้องกันการเปลี่ยนสี กลิ่น รสในเนื้อมูก หู พืชผัก ผลไม้บรรจุกระป๋อง เนื่องจากกรดมะนาวไปทำลายเอนไซม์จากธรรมชาติ และยังช่วยรักษากรดแอสคอร์บิกที่มีโดยธรรมชาติของพืชผักอีกด้วย กรดมะนาวใช้เติมในผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช ไขมันและน้ำมันจากสัตว์ ช็อกโกแลต โกโก้ เพื่อเพิ่มฤทธิ์สารกันหืน (Antioxidants) และในปัจจุบันกรดมะนาวย่อยสลายได้ง่ายจึงนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอกแทนฟอสเฟตและใช้กำจัดซิลิเฟออร์

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้ผลิตกรดมะนาวได้ เช่น เชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรีย ในปี 1917 Currie ผลิตกรดมะนาวได้เป็นครั้งแรกโดยใช้ *Aspergillus niger* และปัจจุบันยังคงใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดมะนาว

ข้อดีของการใช้ *A. niger* ในการผลิตกรดมะนาว

- ก. การปฏิบัติงานในขบวนการผลิตสามารถทำได้ง่าย
- ข. วัตถุดิบที่เชื้อราสามารถใช้เพื่อผลิตกรดมะนาวมีราคาถูก
- ค. ผลผลิตที่ได้มีความคงตัวและมีปริมาณสูง

ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวจะแปรเปลี่ยนตามสายพันธุ์ของเชื้อราและวิธีการที่ใช้นั้นคือ สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้ดีในสภาวะที่เรียกว่า Semi-solid culture แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้ในการผลิตกรดมะนาวด้วยวิธี Shaking culture ก็อาจจะให้ผลผลิตของกรดมะนาวได้ไม่ดี (Sarangbin S., et al, 1994) ส่วนสายพันธุ์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดหนึ่งได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นก็อาจทำให้การผลิตกรดมะนาวได้ไม่ดี จึงทำให้มีการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดและมีเชื้อราราคาถูก สำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว

Filamentous Fungi	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>A. carborarius</i>
	<i>A. glaucus</i>
	<i>A. niger</i>
	<i>A. oryzae</i>
	<i>A. phoenici</i>
	<i>A. saitoi</i>
	<i>A. usarii</i>
	<i>A. wentii</i>
	<i>Penicillium janthianellum</i>
	<i>P. restrictum</i>
	<i>Trichoderma viride</i>
Yeast	<i>Candida lipolytica</i>
	<i>C. tropicalis</i>
	<i>Debaryomyces hansenii</i>
	<i>Hansenula anomala</i>
	<i>Pichia farinosa</i>
	<i>Saccharomyces lipolytica</i>
	<i>Torulopsis farinosa</i>
Bacteria	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	<i>Arthrobacter paraffineus</i>
	<i>Brevibacterium ketoglutamicum</i>
	<i>Corynebacterium fascians</i>

2.3 ลักษณะโดยทั่วไปของ *Aspergillus niger*

A. niger เป็นเชื้อราที่นิยมใช้ในการผลิตกรดมะนาวด้วยกรรมวิธีการหมัก เชื้อรานี้จัดเป็นเชื้อราชั้นสูงอยู่ใน Sub-division Eumycotina, Class Ascomycetes, Subclass Euascomycetidae โดยทั่วไปเชื้อราตัวนี้มีสีดำ แต่เมื่อเชื้อรานี้ถูกกลายพันธุ์ก็อาจเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเขียวออกเหลือง หรือขาวก็ได้ ลักษณะของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ก็คือ เส้นใยของเชื้อรามีผนังกันเป็นห้องๆ ก้านชูอับสปอร์ (Conidiophore หรือ Stalk) ตั้งอยู่บนเซลล์ชนิดพิเศษเรียกว่า "Foot cell" เซลล์นี้มีขนาดใหญ่และผนังหนา ปลายสุดของก้านชูอับสปอร์จะมีหนึ่งอับสปอร์ (Vesicle) อับสปอร์นี้มีรูปร่างต่างๆ กัน เช่น กลม รี และอื่นๆ บนอับสปอร์จะมีหนาม (Sterigma) อยู่โดยรอบหรือเพียงบางส่วน ในบางครั้งจะสร้างหนามสองชั้น หนามชั้นแรกสุด (Primary sterigma) จะอยู่ติดกับอับสปอร์ ส่วนหนามชุดที่สอง (Secondary sterigma) จะอยู่ถัดจากหนามชั้นแรกออกมา ถัดจากชั้นหนามจะเป็นที่ตั้งของสปอร์ (Conidia) สปอร์นี้อาจเกิดจากการยืดยาวของหนามแล้วสร้างผนังกัน บางครั้งสปอร์จะต่อกันเป็นสาย โดยสปอร์ที่อยู่ปลายนอกสุดของสายจะเป็นสปอร์ที่แก่ที่สุด

2.4 การคัดเลือกพันธุ์ (Strain selection)

A. niger ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักในปัจจุบันเป็นเชื้อราที่ถูกทำให้กลายพันธุ์โดยใช้กรรมวิธีและสารเคมีต่างๆ เพื่อให้สามารถสร้างกรดมะนาวออกมาได้มากขึ้น (Das, 1972; Chaudhary และคณะ, 1974; Banik และคณะ, 1975; Hanan และคณะ, 1976) แต่ในการรักษาประสิทธิภาพในการผลิตกรดของเชื้อให้คงที่ตลอดไปนั้นเป็นเรื่องลำบาก มักพบเสมอว่า เชื้อราที่เพาะจากสปอร์ที่เก็บไว้นานเกินไปนั้นจะผลิตกรดมะนาวออกมาได้น้อย ซึ่งเหตุผลของเรื่องนี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัด วิธีแก้อย่างหนึ่งก็คือทำการถ่ายเชื้ออย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ Rohr และคณะ (1976) ได้เสนอแนะวิธีคัดเลือกพันธุ์ *A. niger* ที่ให้ผลผลิตสูงโดยทำการเพาะสปอร์เดี่ยวๆ ของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 115 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจหาปริมาณกรดมะนาวที่เกิดขึ้นโดยพ่นด้วยสารละลายของ *p*-Dimethyl-aminobenzaldehyde ที่มีความเข้มข้น 4% ซึ่งละลายอยู่ใน Acetic acid anhydride ให้ความร้อนที่ 140 องศาเซลเซียส 1 นาที ถ้ามีกรดมะนาวอยู่จะเกิดวงสีม่วงขึ้น (เพียง 1 ไมโครกรัมของกรดมะนาวก็สามารถตรวจพบได้) และปฏิกิริยานี้จำเพาะต่อกรดมะนาวเท่านั้น โดยกรดแผลหรือกรดอินทรีย์อื่นๆ ที่ผลิตได้จากเชื้อราจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารตรวจสอบแต่ประการใด ประสิทธิภาพในการสร้างกรดของโคโลนีมีหน่วยวัดเรียกว่า แอซิดยูนิเตจ (Acidunitage) (AU-value) ซึ่งมีค่าเท่ากับอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของวงแหวนสีม่วงต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ถ้าโคโลนีสร้างกรดออกมามากค่า AU-value ก็จะถูกสูงตามไปด้วย

2.5 การผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลว (Citric acid production in shake culture)

การผลิตกรดมะนาวโดยการหมักนอกจากจะใช้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงแล้ว ยังต้องควบคุมองค์ประกอบของอาหาร อุณหภูมิในระหว่างการหมัก การให้อากาศ ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการหมักจะต้องไม่เร็วหรือช้าเกินไป ในระหว่างที่มีการหมักเอกรดมะนาวนั้นอาจแบ่งออกเป็น 2 ระยะ (Hockenhull, 1960) คือ

- 2.5.1 ช่วงแรกของการหมักเชื้อราจะมีอัตราการเจริญสูงสุด น้ำตาลส่วนหนึ่งจะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญและสร้างเซลล์ ระยะแรกนี้เชื้อราจะให้กรดออกมาน้อย
- 2.5.2 ระยะถัดมาอัตราการเจริญของเชื้อราจะลดลง แต่เชื้อราจะเริ่มสร้างกรด ในระยะนี้ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสิ่งสำคัญมาก ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรด-ด่างเป็น 7 เชื้อราจะสร้างกรดกลูโคนิก (Gluconic acid) แต่ถ้าความเป็นกรดอยู่ในช่วง 3-6 เชื้อราจะสร้างกรดออกซาลิก (Oxalic acid) เป็นส่วนใหญ่

2.6 แหล่งคาร์บอน (Carbon sources)

ในทางทฤษฎีแล้วน้ำตาลที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2-7 และชนิด 12 คาร์บอน สามารถเปลี่ยนเป็นกรดมะนาวได้ (Prescott และ Dunn, 1959) แต่น้ำตาลที่ดีที่สุดในการผลิตกรดมะนาวโดย *A. niger* ก็คือซูโครส ถัดไปคือ กลูโคสและฟรักโตส ตามลำดับ (Hossain และคณะ, 1984) ส่วนน้ำตาลนมถูกเปลี่ยนเป็นกรดมะนาวได้น้อย (Hossain และคณะ, 1983) ในขณะที่กาแลคโตสไม่ใหกรดมะนาวออกมาเลย แต่เชื้อเจริญได้ดีพอๆ กับเลี้ยงในซูโครส (Hossain และคณะ, 1984) ส่วน Miall (1978) ประสบผลสำเร็จจากการใช้กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้ง นอกจากนี้ยังอาจใช้น้ำตาลจากอ้อยหรือหัวผักกาดหวานก็ได้ โดยปริมาณของน้ำตาลที่ใช้ทั่วไปจะอยู่ในช่วง 140-200 กรัมต่อลิตร (Prescott และ Dunn, 1959) ส่วน Currie (1917) ใช้ซูโครสที่มีความเข้มข้น 125-150 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรดมะนาว ทางด้าน Doelger กับ Prescott (1934) พบว่าเมื่อใช้ซูโครสเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อดำเนินการหมักไปได้ 9-12 วัน และยังพบอีกว่าถ้าใช้น้ำตาลเกิน 150 กรัมต่อลิตร จะเหลือน้ำตาลภายหลังการหมักสูงกว่าปกติ (ต่ำกว่า 30 กรัมต่อลิตร) เมื่อทดแทนซูโครสด้วยฟรักโตสหรือกลูโคส 10-50 กรัมต่อลิตร (จากจำนวนทั้งหมด 140 กรัมต่อลิตร) ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จะลดลงเมื่อเทียบกับการหมักที่ใช้ซูโครสเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ซูโครสที่ถูกย่อยไปบางส่วนในระหว่างการนึ่งมาเชื้อจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลิตลดลงได้

2.7 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sources)

A. niger สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของเกลือต่างๆ ได้ Porgers (1932) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โซเดียมไนเตรต 0.4 เปอร์เซ็นต์ จะให้ผลที่ดีกว่าใช้เกลือแอมโมเนียมไนเตรต หรือแอมโมเนียมซัลเฟต กรณีที่ใช้เกลือแอมโมเนียมไนเตรต เกินกว่า 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณมวลของเชื้อจะสูง (Prescott และ Dunn, 1959) ส่วน Snell กับ Schweiger (1949) พบว่า แอมโมเนียม คาร์บอเนตเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ดีที่สุดเพราะ

- ก. การสร้างกรดออกซาลิกจนวิเคราะห์ไม่พบในน้ำหมัก
- ข. ไม่มีการสร้างสารสี
- ค. ไม่เกิดเมือกเมื่อเพิ่มการให้อากาศ และแยกเอาเชื้อออกจากน้ำหมักได้ง่ายเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก
- ง. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวต่อน้ำหมักมวลของเชื้อ

นอกจากนี้ Shepard (1963) ยังกล่าวว่าสามารถเพิ่มผลผลิตของกรดมะนาวได้เมื่อเติมเกลือไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากที่เชื้อราหยุดสร้างเซลล์ โดยจะเติมหลังจากที่การหมักดำเนินไปได้ 1/3 ของเวลาทั้งหมด ถ้าหากทำได้เช่นนี้ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลจะสูงขึ้น และได้กรดมะนาวเพิ่มขึ้นด้วย แต่ถ้าเติมไนโตรเจนก่อนเวลาสมควรผลผลิตก็จะลดลง

2.8 อิทธิพลของเกลืออนินทรีย์ (Effect of inorganic salt)

นอกเหนือไปจากน้ำตาลและเกลือแอมโมเนียมไนเตรตแล้ว *A. niger* ยังต้องการธาตุอาหารอื่นๆ เช่น โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส กำมะถัน และแมกนีเซียม ในการเจริญอีกด้วย จากรายงานของ Currie (1917) และ Doelger กับ Prescott (1934) พบว่าการผลิตกรดมะนาวให้ได้ผลดีนั้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตอยู่ 0.75-1.00 กรัมต่อลิตร และดีเกลืออยู่ 0.20-0.25 กรัมต่อลิตร ในระยะเริ่มต้นของการหมักขณะยังมีเกลือฟอสเฟตในอาหาร เชื้อราจะอยู่ในช่วงการเจริญ โดยที่เกลือฟอสเฟตจะชะลอการสร้างกรดไว้ก่อน เมื่อเกลือฟอสเฟตหมดไปเชื้อจึงเริ่มการสังเคราะห์กรดขึ้น (Szucs, 1944) ส่วน Steel และคณะ (1955) เติมเกลือฟอสเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากกากน้ำตาลของหัวผักกาดหวาน ในปริมาณ 0.01-0.50 กรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีการสร้างกรดออกซาลิก แต่เมื่อดีเชื้อจะมีขนาดใหญ่ผิดปกติทำให้มีความหนืดเพิ่มขึ้น ในที่สุดจะขัดขวางการทำงานของเครื่องให้อากาศ นอกจากนี้ Martin กับ Steel (1955) พบว่าถ้าเติมเกลือฟอสเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากกากน้ำตาลหัวผักกาดหวานมากเกินไป นอกจากจะได้กรดมะนาวออกมาน้อยแล้ว เชื้อรายังสร้างกรดกลูโคนิก กรดมาลิกเพิ่มขึ้นอีกด้วย

นอกเหนือจากเกลือฟอสเฟตแล้ว แมกนีเซียมและสังกะสี ยังมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวอีกด้วย Sue กับ Johnson (1947) พบว่าถ้าเติมแมกนีเซียมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 9.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อราสร้างสปอร์มากมายภายใน 48 ชั่วโมง แทนที่จะเป็น 68 ชั่วโมงอย่างทั่วไป แต่แมกนีเซียมที่เติมลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อของชั้นเตรียมเชื้อนี้ จะถูกถ่ายต่อไปจนถึงขั้นการหมักและพบว่าแมกนีเซียมนี้เองจะไปลดปริมาณของกรดมะนาวที่ผลิตได้ ไม่ว่าจะใช้แมกนีเซียมเพียงตัวเดียวหรือจะใช้ร่วมกับสังกะสี ทองแดง และ/หรือเหล็กก็ตาม แต่ถ้าเลี้ยงเชื้อแบบผิวหน้า (Surface culture) แมกนีเซียมจะไม่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวแต่อย่างใด

2.9 ปัจจัยเกี่ยวกับความเป็นกรด-ด่าง (pH Factor)

ความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักนับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่จะทำให้การหมักบรรลุผลสำเร็จ เมื่อใช้ความเป็นกรด-ด่างต่ำๆ นอกจากจะได้กรดมะนาวออกมามาก ยังช่วยลดการเกิดกรดออกซาลิกและลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นได้อีกด้วย โดยไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อในอาหารเหลวที่ อุณหภูมิ และเป็นเวลานาน จากการทดลองของ Cumie (1917) โดยปรับความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 3.4-3.5 ด้วยกรดเกลือและความคุมพวกเกลืออนินทรีย์ จะได้กรดมะนาวออกมามากในขณะที่มีการสร้างกรดออกซาลิกน้อย กรดที่ใช้นั้นพบว่ากรดเกลือให้ประสิทธิภาพสูงกว่ากรดกำมะถัน กรดดินประสิว และกรดน้ำส้ม เมื่อพิจารณาถึงผลิตผลของกรดมะนาวที่ได้ออกมาหลังจากปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดต่างๆ ดังที่กล่าวมา สำหรับกรดมด (formic acid) ต้องใช้ในปริมาณมากกว่าจึงจะปรับกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหลือ 3.0 เพื่อป้องกันการรอกของสปอร์ (Prescott กับ Dunn, 1959)

2.10 ปัจจัยเกี่ยวกับอุณหภูมิ (Temperature factor)

ถึงแม้ *A. niger* จะเป็นเชื้อราในเขตโซนร้อน (Mehrotra, 1976) แต่อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวจากเชื้อราตัวนี้ก็แตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อและสภาวะการหมัก ปกติอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักจะอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส (Prescott กับ Dunn, 1959) ส่วน Doelger และ Prescott (1934) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อรานิดนี้อยู่ระหว่าง 26-28 องศาเซลเซียส เขาพบว่าปริมาณการผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่ออุณหภูมิของการหมักเพิ่มขึ้นจาก 8-28 องศาเซลเซียส แต่ที่ 30 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่านี้การผลิตกรดมะนาวจะลดลงและกรดออกซาลิกจะถูกสร้างมากขึ้น

2.11 เกี่ยวกับการให้อากาศ (Aeration factor)

เชื่อกันว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ จึงจำเป็นอย่างยิ่งในการให้อากาศแก่เชื้อรา ในขณะที่ทำการหมักเอกรวมมะนาว Kubicek กับคณะ (1980) ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักต่อการผลิตกรดมะนาว เขาพบว่าในช่วงการเจริญคงที่ของเชื้อรา จะมีการผลิตกรดมะนาวออกมามาก และจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนมากกว่าในช่วงที่เชื้อรามีอัตราการเจริญสูง ซึ่งในระยะนั้นเชื้อราจะสร้างกรดออกมาน้อย ค่าวิกฤตการละลายได้ของออกซิเจนจะเป็น 18-21 มิลลิบาร์ (mbar) เมื่อเชื้อราอยู่ในระยะอัตราการเจริญสูง แต่ค่านี้จะเพิ่มเป็น 23-26 มิลลิบาร์ เมื่อเชื้อราอยู่ในระยะการเจริญคงที่ และมีการสะสมกรดมะนาวมาก ในระยะการเจริญคงที่ดังกล่าวนี้ ถ้าค่าวิกฤตการละลายได้ของออกซิเจนต่ำกว่าที่กำหนดแม้แต่เพียง 20 นาที ก็จะทำให้การผลิตกรดยุติลงได้โดยสิ้นเชิง แต่จะไม่มีผลต่อการรูดของเชื้อ ในขณะที่ทำการหมักเชื้อราย่อมป่ล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาด้วย ก๊าซนี้มีผลโดยตรงต่อการผลิตกรดมะนาว จากการทดลองของ Foster และคณะ (1941) พบว่าเมื่อเติมคาร์บอนไดออกไซด์ลงไป 5-15 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่หมัก นอกจากจะไดกรดออกมาน้อยแล้วยังทำให้การใช้น้ำตาลและการสร้างเส้นใยของเชื้อราลดลงด้วย

2.12 เรื่องฟองและการควบคุม (Foaming problem and control)

ในขณะที่หมักเอกรวมมะนาวนั้นนอกจากจะมีการให้อากาศและการคนแล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อยังมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่สูง ตลอดจนเชื้อปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาอีกด้วย จึงทำให้มีฟองเกิดขึ้นในขณะที่หมัก ฟองที่เกิดขึ้นอาจควบคุมได้โดยการเติมสารพวกไขมันหรือน้ำมันลงไป ในน้ำหมัก น้ำมันที่เติมลงไปนอกจากจะลดปัญหาเรื่องฟองแล้ว ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักอีกด้วย น้ำมันที่ใช้เติมอาจเป็นเนย น้ำมันหมู น้ำมันมะกอก น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์มอื่นๆ Gold กับ Kiber (1968) แนะนำในช่วงแรกของการหมักควรปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.0 เมื่อหมักไประยะหนึ่งแล้ว มันจะลดลงเหลือ 2.0-2.5 ถ้าความเป็นกรด-ด่างลดลงเหลือ 3.0 จะเริ่มมีปัญหาเรื่องฟอง จึงควรเติมสารกันฟองจำพวกไขมัน หรือน้ำมันลงไป 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ปริมาณที่ใช้ขนาดนี้สามารถป้องกันฟองได้ตลอดช่วงของการหมัก

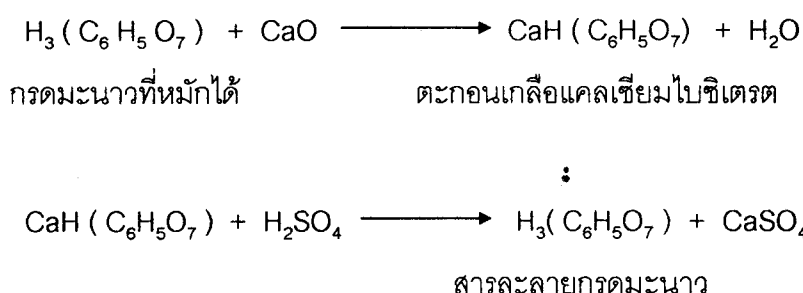
2.13 ระยะเวลาในการหมัก และผลผลิต (Fermentation time and yield)

ระยะเวลาการหมักเอกรวมมะนาวอยู่ในช่วง 7-10 วัน (Prescott กับ Dunn, 1959) ส่วนประสิทธิภาพสูงสุดในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดคือ 90.7 เปอร์เซ็นต์ (Wells กับคณะ, 1934) แต่โดยทั่วไปการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมจะทำการแยกเอกรูดออกเสียก่อนที่จะสิ้นสุดการหมัก ดังนั้นประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดจะเหลือประมาณ 60% เท่านั้น (Prescott กับ Dunn, 1959)

ถ้าปล่อยให้การหมักดำเนินไปจนสิ้นสุดถึงแม้ประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดจะสูงแต่ไม่คุ้มทุน

2.14 การเก็บเกี่ยวผลผลิต (Product recovery)

เมื่อหมักกรดมะนาวได้ที่แล้ว จะกรองแยกของเหลวออกจากเชื้อซึ่งจะมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ ส่วนของเหลวที่แยกได้นำไปต้มให้ร้อน ทำการคนตลอดเวลาแล้วเติมปูนขาว (Lime) ลงไปเพื่อตกตะกอนกรดมะนาวออกมาในรูปเกลือแคลเซียม ล้างตะกอนเกลือแคลเซียมไซเตรตในสารละลายกรดกำมะถัน ที่มีค่าสมมูลย์เท่ากับกับเกลือไซเตรต จากนั้นกรองแยกเอาสารละลายกรดมะนาวออกจากตะกอนเกลือแคลเซียมซัลเฟต ดังสมการในรูปที่ 1



รูปที่ 2.1 สมการการแยกเอากรดมะนาวออกจากน้ำหมักโดยสังเขป

สารละลายกรดมะนาวที่กรองได้ นำไปฟอกสีด้วยผงถ่าน กรองได้สารละลายใสไม่มีสีของกรดมะนาว นำระเหยในหม้อสุญญากาศจนเข้มข้น แล้วอาจขายไปในรูปของสารละลายกรดมะนาวเข้มข้น หรืออาจตกผลึกออกมาในรูปของแข็งสีขาวก็ได้

2.15 สารกระตุ้น (Stimulants)

สารกระตุ้นที่ใช้เพื่อปรับปรุงผลผลิตของกรดมะนาวที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อรา *A. niger* มีหลายชนิด เช่น เมธานอล เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ Naphthoquinone และ Methylene blue เป็นต้น ในบรรดาสารกระตุ้นดังกล่าว เมธานอลจัดเป็นสารกระตุ้นที่ทำให้ผลผลิตของกรดมะนาวจากเชื้อ *A. niger* สูงขึ้นมากกว่าสารกระตุ้นชนิดอื่นๆ จากการศึกษาของ Chaudhary และคณะ (1978) พบว่าเมธานอลเข้มข้น 3-4% จะช่วยทำให้การเจริญและการเกิดสปอร์ (Sporulation) และในขณะเดียวกันจะส่งผลทำให้สร้างกรดมะนาวได้มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเมธานอลไม่ได้ทำให้เมแทบอลิซึม

ของเชื้อราเสียหาย แต่กลับส่งผลดีต่อคุณสมบัติทางการซึมผ่านของสารเข้า-ออก เมมเบรนของเชื้อรา จึงทำให้การปลดปล่อยกรดมะนาวออกมาจากเส้นใยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น

2.16 หลักทั่วไปในการเก็บรักษาและเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

2.16.1 การคัดพันธุ์

เชื้อที่ใช้ในการหมักอาหารนั้นต้องผ่านการคัดพันธุ์มาแล้ว โดยเชื้อที่คัดไว้จะต้องไม่กลายพันธุ์ง่าย และมีความสามารถในการให้ผลผลิตที่ต้องการ เชื้อเหล่านี้อาจได้มาจากการปรับปรุงพันธุ์ในห้องปฏิบัติการที่ใดที่หนึ่ง หรืออาจได้มาจากการทดสอบสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อแล้วคัดเลือกพันธุ์ที่ดีเอาไว้ ความคงที่ของเชื้อเป็นลักษณะที่มีความสำคัญมากอันหนึ่ง เพราะอัตราการทำงานและผลผลิตที่ได้ไม่ควรมีการเปลี่ยนแปลง

2.16.2 การรักษากิจกรรมของเชื้อ

เชื้อที่เก็บรักษาไว้จะต้องเป็นเชื้อบริสุทธิ์และต้องอยู่ในสภาพที่ว่องไวอยู่เสมอ จุดประสงค์นี้สามารถบรรลุได้โดยให้ทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารที่เหมาะสมเป็นระยะๆ ไปและจะต้องบ่มเชื้อจนเชื้อเจริญถึงระยะ Maximal stationary phase แล้วจึงนำไปเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิที่ต่ำพอที่จะป้องกันการเจริญของเชื้อได้ การถ่ายเชื้อไม่สม่ำเสมอ และบ่อยเกินไปอาจทำให้ลักษณะบางอย่างของเชื้อเปลี่ยนแปลงไปได้

2.16.3 เชื้อที่ต้องการเก็บไว้เป็นสต็อก (Stock cultures)

ควรจะเตรียมให้อยู่ในรูปที่เก็บรักษาเชื้อไว้ได้นานๆ โดยไม่ต้องทำการถ่ายเชื้อเพื่อที่เชื้อจะได้ไม่กลายพันธุ์และจะได้ใช้เป็นแหล่งของเชื้อต่อไปได้ ถ้าเกิดการสูญหายหรือการตายของเชื้อที่นำไปใช้ในขบวนการ ปัจจุบันเรามักจะเก็บสต็อกเชื้อไว้โดยวิธีการไลโอฟิลไลซ์ (Lyophilization) และการเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แม้ว่าในบางแห่งยังคงใช้พาราฟินเหลวเทปิดทับเชื้อที่เลี้ยงไว้ในอาหารวุ้นธรรมดา เราอาจเก็บเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิห้องไว้ได้หลายเดือนเมื่อเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรีน-เดียมคลอไรด์ประกอบอยู่ร้อยละ 1 ดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วอาจใช้เป็นที่ยกสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่แห้งได้นานพอสมควร

2.16.4 การรักษาสภาพความบริสุทธิ์ของเชื้อ

เพื่อให้เกิดความแน่ใจในความบริสุทธิ์ของเชื้อจึงควรจะนำเชื้อมาจากห้องปฏิบัติการที่มีการถ่ายเชื้ออย่างสม่ำเสมอ หรือทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้ออยู่เสมอ การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทำได้หลายวิธี แล้วแต่นชนิดของเชื้อที่ต้องการทดสอบ การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์นั้น จะตรวจได้ต่อเมื่อสิ่งปนเปื้อนนั้นแตกต่างจากเชื้อที่เรามีอยู่ และต้องมีจำนวนมากพอ อีกวิธีหนึ่งก็คือ

การเพาะเชื้อในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเหมาะสมต่อการเจริญของสิ่งปนเปื้อน แต่ไม่เหมาะสมกับเชื้อของเรา อีกวิธีหนึ่งคือการตรวจหาสารบางชนิดที่เชื้อของเราไม่สามารถผลิตได้ เช่น การตรวจหาเอนไซม์ คีตาเลส ในกรณีที่เชื้อของเราเป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียชนิดไม่สร้างคีตาเลส แต่เชื้อที่ปนเปื้อนมาเป็นเชื้อที่สร้างขึ้นได้ เป็นต้น

2.16.5 การเตรียมเชื้อ

เราควรเตรียมแม่เชื้อ (Mother culture) ขึ้นใหม่เสมอจากแม่เชื้อเดิมหรือสต็อกเชื้อเดิมนำแม่เชื้อเหล่านี้ไปใส่ในอาหาร เลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณมาก เพื่อให้เชื้อเจริญเพิ่มจำนวนให้มากพอที่จะนำไปใช้ในขบวนการหมักได้ การเพิ่มจำนวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เชื่อนั้น (1) ประกอบด้วยเชื้อที่ต้องการเท่านั้น (2) มีจำนวนสัดส่วน (ถ้าเป็นเชื้อผสม) และการทำงานเท่ากันตลอด (3) มีความว่องไวในการให้ผลผลิตที่ต้องการ และ (4) สามารถต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้พอสมควรในกรณีที่จำเป็น เช่น ทนความร้อนได้ถ้าจะต้องได้รับความร้อนในขณะตกตะกอนเนยเหลว การเตรียมเชื้อแต่ละครั้งนั้น จะต้องพยายามให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกันหมดไม่ว่าจะในด้านการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การเพาะเชื้อ การบ่มเชื้อ เป็นต้น การที่จะเก็บเชื้อในระยะใดของการเจริญนั้นขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ที่ต้องการ เช่น ถ้าต้องการให้เชื้อเจริญทันทีและรวดเร็วก็เก็บเกี่ยวเชื้อที่อยู่ในระยะที่เรียกว่า Logarithmic phase of growth แต่ถ้าต้องการให้เชื้อสามารถทนทานต่อความร้อนหรือสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้มากขึ้น ก็ควรเก็บเกี่ยวเชื้อที่อยู่ในระยะต้นของ Maximal stationary phase คุณภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ มักจะใช้คุณภูมิที่ใกล้เคียงกับคุณภูมิเหมาะสมของเชื้อ เมื่อเชื้ออยู่ในระยะที่ต้องการแล้วจะต้องลดอุณหภูมิลงเพื่อมิให้มีการเจริญต่อไปอีก

2.16.6 การทำงานของเชื้อจุลินทรีย์

เราสามารถวัดการเจริญของเชื้อได้โดยการใช้ระยะเวลาบ่มเชื้อดี คุณภูมิเหมาะสมก็ควรจะได้ผลงานที่ดี การทำงานของเชื้อ อัตราการเจริญของเชื้อกับปริมาณของผลผลิต ถ้าเป็นเชื้อพันธุ์ดี อาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสมอาจจะทำให้เกิดการณ์ต่างๆ เลวลงได้ถ้าการเก็บรักษาและการเพาะเชื้อไม่เหมาะสม มีการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เหมาะสมบ่อยๆ เป็นเวลานานๆ มีการกลายพันธุ์หรือมีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส

2.16.7 เชื้อผสม (Mixed culture)

เชื้อผสมชนิดที่ได้มีการจัดจำแนกไว้แล้ว อาจได้มาจากการนำเชื้อบริสุทธิ์หลายๆ ชนิดมาเพาะเลี้ยงรวมกันให้มีการเจริญไปพร้อมๆ กัน หรืออาจเพาะเลี้ยงแยกกันแล้วนำมาผสมกันก่อนนำไปใช้ในขบวนการก็ได้ เช่น เชื้อแลคติก (Lactic culture) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมนม เป็นเชื้อผสมที่ได้จาก

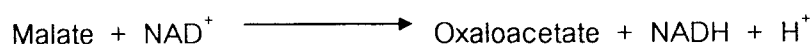
การนำแบคทีเรียหลายๆ ชนิดมาเพาะเลี้ยงรวมกันซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะต้องสามารถเข้ากันได้เจริญได้ดีไปพร้อมๆ กัน โดยไม่มีการขัดขวางการทำงานหรือการเจริญของกันและกัน การที่จะเก็บรักษาเชื้อผสมให้มีสัดส่วนของเชื้อแต่ละชนิดเท่าเดิมตลอดทำได้ยาก เชื้อผสมที่ยังไม่ได้มีการจัดจำแนกอาจใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดได้ เช่น เชื้อผสมระหว่างยีสต์กับแบคทีเรียที่ย้ายมาจากผิวของเนยแข็งลิเมเบอร์เกอร์ก้อนหนึ่งมาใส่อีกก้อนหนึ่ง เป็นต้น

2.17 ชีวเคมีการหมักกรดมะนาว

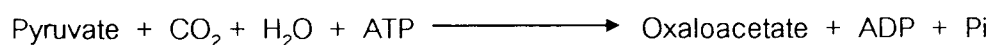
Citric acid cycle (Tricarboxylic acid cycle : TCA cycle) เป็นแนวทางในการผลิตกรดมะนาวโดยอาศัยการหมักด้วยเชื้อรา โดยเฉพาะในกลุ่ม *A. niger* ทั้งนี้กรดมะนาวที่ได้จะเกิดการสะสมในปริมาณสูง เนื่องจากความผิดพลาดในการทำงานใน TCA cycle เป็นสำคัญ สำหรับเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดมะนาว ได้แก่ Aconitase, Isocitrate dehydrogenase และ Citric synthase โดยในช่วงของการสะสมกรดมะนาว เอนไซม์สองชนิดแรกจะมีกิจกรรมในระดับต่ำ ในขณะที่เอนไซม์ Citric synthase มีกิจกรรมในระดับสูง จึงทำให้เกิดการรวมตัวของ Acetyl CoA กับ Oxaloacetate เกิดเป็นกรดมะนาวขึ้น

สาร Oxaloacetate ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดมะนาว ถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยแนวทางในการสร้างหลายรูปแบบดังนี้

ก. อาศัยปฏิกิริยา Dehydrogenation ของ Malate โดยอาศัยเอนไซม์ Malate dehydrogenase ดังสมการ

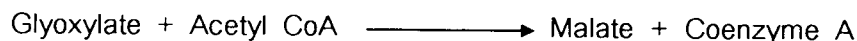


ข. อาศัยปฏิกิริยา Carboxylation ของ Pyruvate โดยอาศัยการรวมตัวของ Pyruvate กับคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งถูกเร่งด้วยเอนไซม์ Pyruvate carboxylase ดังสมการ



ค. อาศัยปฏิกิริยา Carboxylation ของ Phosphoenolpyruvate โดยอาศัย Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase system (พบในยีสต์) ทั้งนี้จะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวของ Phosphoenolpyruvate กับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยไม่ต้องอาศัยพลังงานหรือ ATP

ง. อาศัย Glyoxylate cycle โดยที่เกิดการรวมตัวของ Glyoxylate กับ Acetyl CoA ซึ่งถูกเร่งด้วยเอนไซม์ Malate synthetase ดังสมการ ทั้งนี้ Malate ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนต่อไปเป็น Oxaloacetate อีกทอดหนึ่ง



สำหรับ Glyoxylate ที่ใช้นี้สามารถสังเคราะห์ได้โดยอาศัยเอนไซม์ Isocitritase ดังนี้



2.18 สันฐานวิทยาของเชื้อรา

เชื้อรามีทั้งชนิดที่เป็นเซลล์เดี่ยว เช่น ยีสต์ และที่เป็นหลายเซลล์เรียงเป็นเส้นใย (Hypha) กลุ่มของเส้นใยเรียกไมซีเลียม (Mycelium) เส้นใยทั่วไปมีความกว้าง 5-10 ไมโครเมตร และมีความยาวมาก เส้นใยประกอบด้วยผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และช่องว่างภายในที่บรรจุโปรโทพลาสซึม เยื่อหุ้มเป็นเยื่อ 2 ชั้นล้อมรอบโปรโทพลาสซึม ส่วนผนังเซลล์ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) หรือไคทิน ในเชื้อราชั้นต่ำ ผนังเซลล์ประกอบด้วยเซลลูโลส การเจริญของเส้นใยเกิดทางด้านใกล้ปลาย โดยมีการยืดตัวบริเวณนั้น เส้นใยจะมีการแบ่งตัวเว้าเข้ามาในเซลล์ (Centripetal invagination) และเกิดผนังกันโดยเยื่อหุ้มเซลล์คอดเข้ามาเกิดเป็นผนังที่ไม่สมบูรณ์ เพราะมีรูตรงกลางผนังเพื่อให้โปรโทพลาสซึมไหลเวียนถึงกันได้แม้แต่นิวเคลียสก็เคลื่อนที่จากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์ได้

เส้นใยแบ่งเป็น 3 แบบ คือ

1. เส้นใยไม่มีผนังกัน (Nonseptate หรือ coenocytic) เส้นใยจะเป็นท่อทะลุถึงกัน มีไซโทพลาสซึมและนิวเคลียสต่อเนื่องกัน
2. เส้นใยที่มีผนังกัน และมีนิวเคลียสอันเดียวในแต่ละเซลล์
3. เส้นใยที่มีผนังกัน และมีนิวเคลียสหลายอันในแต่ละเซลล์

เชื้อรานอกจากจะมีรูปร่างเป็นเส้นใยและเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แล้ว บางชนิดยังมีรูปร่าง 2 แบบ (Dimorphism) คือ ถ้าเจริญในดินหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง จะมีรูปร่างเป็นเส้นใย แต่ถ้าเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือในร่างกายโฮสต์ เช่น คน จะมีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยวแบบยีสต์ เช่น *Histoplasma capsulatum* ได้แก่ เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่นกลาก เกื้อื้อ และที่ทำให้เกิดโรคกับสัตว์เลี้ยงเป็นต้น

2.18.1 การเจริญของเชื้อรา

เชื้อราเป็นเส้นใยจะมีการเจริญออกไปได้สองทิศทางคือ ทางขวางจะเจริญไปเต็มที่แล้วจึงหยุด ส่วนการเจริญทางด้านยาวนั้น เส้นใยของเชื้อราจะงอกยาวออกไปและแตกแขนงอย่างไม่จำกัด ตรงที่สภาพแวดล้อมยังเหมาะสม สายใยเหล่านี้เรียกว่า Mycelium ทำให้เชื้อรามีขนาดใหญ่จนมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า Mycelium มีสองชนิดคือ Vegetative mycelium เป็นส่วนที่ยึดเกาะกับอาหาร เพื่อทำหน้าที่นำอาหารไปสู่ส่วนต่างๆของทลัสอีกชนิดหนึ่ง ได้แก่ Aerial mycelium เป็นส่วนที่ยื่นไปในอากาศ ทำหน้าที่สร้างสปอร์ จึงเรียกไมซีเลียมแบบนี้ว่า Reproductive mycelium ในบางระยะของการเจริญอาจพบ Mycelium มาเรียงอัดตัวประสานกันเป็นลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อ มีสองชนิดคือ

1. Prosenchyma ประกอบด้วย Mycelium อัดตัวกันอย่างหลวมๆ และขนานกันตามความยาว
2. Pseudoparenchyma ประกอบด้วย Mycelium เรียงอัดตัวกันอย่างหนาแน่น มีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อ Parenchyma ในพืชชั้นสูง

2.18.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา

การเติบโตของเชื้อราจะเติบโตบริเวณปลายไฮฟา (Hypha tip) และมักมีการแตกแขนงอันแรก ทำให้เกิดแขนงอันที่ สอง และ สาม ต่อไป แขนงเหล่านี้เติบโตไปด้านหน้าทางขอบของโคโลนี และแยกห่างจากอันอื่นๆ การเจริญเติบโตจะหยุดลงเมื่อไมซีเลียมใช้อาหารรอบๆ บริเวณนั้นหมดไป และแตกแขนงไปอย่างรวดเร็วในอาหารที่ยังไม่ได้ใช้ การเติบโตลักษณะนี้ทำให้โคโลนีมีลักษณะเป็นวงกลมในอาหารแข็งเส้นใยของเชื้อรา บนอาหารแข็งบางส่วนยังลึกลงไปในอาหารเพื่อดูดอาหารส่งไปให้ส่วนที่ไม่ได้สัมผัสกับอาหาร โคโลนีของราแตกต่างกัน บางชนิดเส้นใยจะอัดกันแน่น บางชนิดเส้นใยจะอยู่กันอย่างหลวมๆ มีลักษณะฟู ผิวหน้าโคโลนีบางชนิดแห้ง บางชนิดเปียก หรือเหนียว สีเส้นใยอาจมีสีดำ เทา น้ำตาล แดง เหลือง ส่วนสปอร์ที่เห็นอาจมีสีเขียว น้ำตาลแกมเขียว ส้ม ชมพู น้ำตาล ดำ เทา เป็นต้น ส่วนการเจริญเติบโตของราบนอาหารเหลวมักเติบโตเป็นแผ่นอยู่บนผิวหน้าอาหาร แต่ถ้าให้อากาศโดยการเขย่า เส้นใยจะรวมตัวกันเป็นกระจุก ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ เรียกว่า Pellet ซึ่งเป็นรูปแบบการเจริญที่มีผลต่อการเจริญและการเกิดผลิตภัณฑ์ภายใน Pellet เนื่องจากภายใน Pellet จะได้รับสารอาหารน้อยมากโดยเฉพาะบริเวณตรงกลางของ Pellet จนกระทั่งอาจจะไม่ได้รับ

สารอาหารเลย นอกจากนั้นแล้วผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นก็ไม่สามารถนำออกจาก Pellet ได้ ซึ่งบางครั้งจะทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์ได้ (Product inhibition)

2.19 วัตถุดิบ (Raw material)

ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในขบวนการหมัก ต้องพิจารณาถึงประโยชน์และราคาที่คุ้มกับการลงทุน ตลอดจนวิธีการเตรียมให้ได้มาซึ่งคาร์โบไฮเดรต การประหยัดในแง่ของอุตสาหกรรมจะจำกัดแหล่งคาร์โบไฮเดรต ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดมะนาวส่วนใหญ่ได้แก่ กากน้ำตาลจากอ้อย กากน้ำตาลจากหัวบีท เมล็ดธัญพืช และแห้ง ทั้งนี้เพราะถ้าการปรับแต่งมากขึ้นตอนเท่าไรก็ยิ่งจะเพิ่มต้นทุนการผลิต

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง ประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เท่ากับ 6:10:5 และมีสูตรโมเลกุลคือ $(C_6H_{12}O_5)_n$ จะประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิดคือ อะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพคติน (Amylopectin) พอลิเมอร์ทั้งสองชนิดนี้เป็นโฮโมพอลิเมอร์ คือมีกลูโคสเป็นโมโนเมอร์เหมือนกัน และอัตราส่วนของ อะไมโลสและอะไมโลเพคตินจะมีค่าคงที่ในแป้งแต่ละชนิด

อะไมโลส (Amylose) เป็นพอลิเมอร์สายตรงโดยโมโนเมอร์คือกลูโคสจะเรียงต่อกันเป็นเส้นตรงด้วยพันธะ α -(1, 4) ปริมาณ อะไมโลส ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง โดยแป้งข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าวฟ่าง จะมีปริมาณอะไมโลส (ประมาณ 28%) สูงกว่าแป้งที่ได้จากพืชหัว (มันฝรั่ง มันสำปะหลัง สาคุ) ซึ่งมีประมาณ 20% ในขณะที่ Waxy starch จะไม่มีอะไมโลสเลย และ Amylomaize starch จะมีอะไมโลสสูงถึง 80% นอกจากนี้ ดีกรีของโพลิเมอไรเซชัน (Degree of polymerization, DP) ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง สำหรับแป้งมันสำปะหลังจำนวนโมโนเมอร์ของกลูโคสในอะไมโลสนั้นจะมีจำนวนประมาณ 200-2,000 หน่วย (ตารางที่ 2) อะไมโลสสามารถทำปฏิกิริยากับไอโอดีนและสารประกอบอินทรีย์หลายชนิด ได้แก่บิวทานอล กรดไขมัน ฟีนอล สารลดแรงตึงผิวหลายชนิด และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ โดยอะไมโลสจะอยู่ในรูป Helix coil สารประกอบเชิงซ้อนของอะไมโลสและไอโอดีนจะให้สีน้ำเงินซึ่งสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณแป้งได้ แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากวิธีการหาอะไมโลสด้วยไอโอดีนมีข้อจำกัด ดังนั้นปัจจุบันจึงได้มีการนำเครื่อง DSC และ HPSEC มาใช้ในการหาปริมาณอะไมโลสด้วย

อะไมโลเพคติน (Amylopectin) เป็นพอลิเมอร์ที่มีกิ่งก้านและแขนง ประกอบด้วยกลูโคสต่อกันเป็นโซ่แขนงที่ทุกๆ 20-30 หน่วย ของพันธะ α -(1, 4) ด้วยพันธะ α -(1, 6) อะไมโลเพคตินเป็นหนึ่งในพอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดที่พบในธรรมชาติ จะมี DP เฉลี่ยมากกว่า 1 ล้าน น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของอะไมโลเพคตินจะไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้งเลย และมีค่ามากกว่าประมาณ 1,000 เท่า เมื่อเทียบกับอะไมโลส

ตารางที่ 2.2 ปริมาณอะไมโลส อะไมโลเพคติน และดีกรีของโพลีเมอร์โซ่ของแป้งแต่ละชนิด

Starch	Amylose %(w/w)	Amylopectin %(w/w)	Average DP, amylose	Average DP, amylopectin
Corn	28	72	800	2,000,000
Potato	21	79	3,000	2,000,000
Wheat	28	72	800	2,000,000
Tapioca	17	83	-	2,000,000
Waxy maize	0	100	-	2,000,000
Sorghum	28	72	-	-
Rice	17	83	-	-
Sago	27	73	-	-
Arrowroot	20	80	-	-
Amylomaize	50-80	20-50	-	-

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อแป้ง ไกลโคเจน (Glycogen) และพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharide) โดยจะไฮโดรไลซ์ (Hydrolyze) พันธะ α -(1, 4) และ α -(1, 6) Glycosidic อะไมเลสอาจจะแบ่งออกได้เป็นชนิดต่างๆ ขึ้นกับ (ก) ไฮโดรไลซ์ด้านนอกหรือด้านใน (ข) รักษาหรือเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (ค) ไฮโดรไลซ์ พันธะ α -(1, 4) และ α -(1, 6) Glycosidic และ (ง) ชนิดของปฏิกิริยาเป็นการไฮโดรไลซ์หรือเคลื่อนย้ายตำแหน่ง

เอนไซม์อะไมเลสมีหลายชนิด เช่น

α -Amylase (1, 4- α -D-Glucan Glucanohydrolase. EC 3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่ตัดหน่วยของกลูโคสจากด้านใน (Endo-splitting enzyme) ซึ่งจะไฮโดรไลซ์พันธะ α -(1, 4) Glycosidic ของสับสเตรทที่เป็นแป้งแบบสุ่ม (Random)

β -Amylase (1, 4- α -D-Glucan Maltahydrolase. EC 3.2.1.2) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์แป้งจากด้านนอก (Exo-splitting enzyme) และมีการย้ายหน่วยของมอลโตส (Maltose) อย่างต่อเนื่องจากด้านปลายนอนลดิวซิง (Non-reducing end) ของสายพอลิแซคคาไรด์ จนกระทั่งเมื่อเอนไซม์

เคลื่อนมาจนถึงพันธะ α -(1, 6) Glycosidic ซึ่งเป็นพันธะที่พบในอะไมโลเพคติน และไกลโคเจน ปฏิกริยาจะหยุดทันที

Glucamylase (1, 4- α -D-Glucan Glucanohydrolase. EC 3.2.1.3) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดไลซ์แบ่งจากด้านนอก (Exo-splitting enzyme) และมีการย้ายหน่วยของกลูโคส (Glucose) อย่างต่อเนื่องจากด้านปลายนอนรีดิวซิง (Non-reducing end) ของสายพอลิแซ็กคาไรด์ ปฏิกริยาจะลดลงเมื่อเอนไซม์เคลื่อนมาจนถึงพันธะ α -(1, 6) Glycosidic ซึ่งเป็นพันธะที่พบในอะไมโลเพคติน และไกลโคเจน แต่อย่างไรก็ตามพันธะ α -(1, 6) Glycosidic ก็ยังมีการไฮโดไลซ์อย่างต่อเนื่อง ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ กลูโคส

Pollunase (α -Dextrin 6-Glucanohydrolase. EC 3.2.1.41) เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการทำให้เกิด Debranching โดยเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดไลซ์พันธะ α -(1, 6) Glycosidic ของ Pollulan (เป็นพอลิเมอร์สายตรงของ Maltotriosyl unit ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1, 6) Glycosidic) และ Dextrins ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของ α -Amylase และ β -Amylase ในการย่อยสลายอะไมโลเพคติน และไกลโคเจน

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บรักษาเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2 ถูกใช้เป็นสายพันธุ์หลักในการผลิตกรดมะนาวในสภาวะเลี้ยงแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) ซึ่งจะเก็บ *A. niger* Yang no.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเอียงสูตรสมบูรณ์ในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มีฝาปิด (Potato Dextrose Agar slant) โดยเชื้อที่เก็บไว้ในหลอดนี้สามารถนำมาใช้เป็นหัวเชื้อได้เลย

การเตรียมเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ นั้น จะต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ (Biohazard clean air) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราตัวอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ ทำได้โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) ที่ผ่านการลนไฟและทิ้งให้เย็นสักครู่ เชื้อสปอร์ของเชื้อราลงบนอาหารเอียงสูตรสมบูรณ์ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 30°C จนกระทั่งเชื้อราเจริญ สามารถใช้สปอร์ในการทดลองต่อไปได้

3.2 การกลายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2 ให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ Protease ต่ำ

นำสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* Yang no.2 มาฉายด้วยรังสี Ultraviolet (UV) (Sarangbin et. al., 1993) หลังจากนั้น นำสปอร์ที่ผ่านการฉายด้วยรังสี Ultraviolet (10 ml.) ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's ที่มี Casein (30 g/l) เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน ใน 500-ml Sakaguchi flask แล้วบ่มด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองผ่าน Glass filter ที่มีขนาดของ Pore size เท่ากับ 20-30 μm เพื่อแยกเอาสปอร์ที่มีการเจริญออกไป โดยอุปมานว่า สปอร์ที่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี Casein เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน จะไม่สามารถผลิตเอนไซม์ Protease หรืออาจจะผลิตได้แต่น้อย จากนั้น นำสปอร์ที่ผ่านการกรองมากระจายในน้ำกลั่นที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปเจริญบนอาหารแข็งของสูตรอาหาร SS medium ที่มี 140 g/l ของ กลูโคส เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เชื้อเอาโคโลนีเดี่ยว (Single colony) มาเจริญบนอาหาร PDA agar

การคัดแยกเบื้องต้นสำหรับ Protease-negative mutant strains จะทำโดยการนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งของสูตรอาหาร Casein medium จากนั้นเปรียบเทียบ

ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Protease โดยสังเกต Clear zone ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับ Clear zone ที่เกิดจากการย่อยสลาย Casein ของ *A. niger* Yang no.2 ซึ่งจะเลือกสายพันธุ์ของสายพันธุ์กลายที่มี Clear zone เล็กกว่า Clear zone ของ *A. niger* Yang no.2

3.3 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด

การคัดเลือกนั้นจะทำตามวิธีการที่ได้มีการรายงานโดย Rugsaseel et al (1993) และมีการแปรเปลี่ยนบางประการโดยมีหลักการในการคัดเลือก 2 ประการ คือ การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่แสดงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Amylolytic รวมทั้งมีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้สูง โดยการเจริญบนอาหารสูตรแข็งของ Starch-methyl red agar plate

3.4 การหาความชื้น

นำตัวอย่างที่เตรียมได้มาประมาณ 5 กรัม (เทคนิค 4 ตำแหน่ง) ใส่ลงใน Petri dish ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน กระจายตัวอย่างให้ทั่ว อบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 4 ชั่วโมง นำมาทิ้งไว้ให้เย็นในโถเก็บความชื้น (Desicator) บันทึกน้ำหนักแล้วนำไปอบต่ออีกประมาณ 1 ชั่วโมง นำมาทิ้งไว้ให้เย็นในโถเก็บความชื้นอีกครั้งหนึ่ง บันทึกน้ำหนักที่ได้หากน้ำหนักต่างจากการบันทึกครั้งแรกไม่เกิน 30 มิลลิกรัม นำไปวิเคราะห์คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่อไป

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกันกับการเตรียมกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก) ปิเปตตัวอย่างมา 0.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมกรดอะเซติกเข้มข้น 2 N จำนวน 1.2 มิลลิลิตร โปตัสเซียมไอโอไดด์เข้มข้น 10% จำนวน 0.25 มิลลิลิตร และโปตัสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 1/600 M จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Mixer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรอย่างรวดเร็ว โดยเทียบกับสารละลาย Blank ซึ่งเตรียมโดยใช้น้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายตัวอย่าง ทำการทดลองอย่างน้อย 4 ซ้ำ คำนวณความเข้มข้นของแป้ง โดยเทียบกับสมการกราฟมาตรฐาน

3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณสารเยื่อใยทั้งหมด (Total fiber) และเถ้า (Ash)

การวิเคราะห์นี้จะใช้เครื่องมือ Fibre Tecator ในการหาปริมาณสารเยื่อใยทั้งหมด (Total fiber) และเถ้า (Ash)

3.7 การผลิตกรดมะนาวด้วยสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) เมื่อใช้วัสดุการเกษตร เป็นแหล่งพลังงาน

3.7.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำวัสดุการเกษตร (ข้าวฟ่าง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มันแกว และมันสำปะหลัง) มาล้าง (ปอกเปลือก) อบให้แห้ง บดให้เป็นผง ร่อนผ่านตะแกรงที่มีช่อง (Aperture) ขนาด 500 Mesh เก็บรักษาด้วยโถดูดความชื้น (Desicator)

3.7.2 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อให้มีการผลิตกรดมะนาว

ซึ่งวัสดุการเกษตร (ข้าวฟ่าง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มันแกว และมันสำปะหลัง) ให้ได้น้ำหนัก 15 20 และ 25 กรัม ลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรควบคุม (Synthetic medium, SS) ปรับ pH ให้ได้ 4.25 จำนวน 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้สารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อซึมเข้าไปในเนื้อวัสดุการเกษตรเหล่านั้น มาเชื่อมด้วยเครื่องนึ่งภายใต้ความดัน (Autoclave)

ขั้นตอนนี้ทำในตู้ปลอดเชื้อโดยใช้ห่อถ่วงเชื้อเยีสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* Yang no.2 รวมทั้งเชื้อราสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *A. niger* Yang no.2 ที่มีความสามารถในการต้านต่อ 2-Deoxy-2-fluoro-D-glucose (DFG) ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vertex mixer หลังจากนั้นใช้ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) ขนาด 1 มล. ดูดสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มล. ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5-7 วัน โดยทำการวัดปริมาณกรดมะนาว เอนไซม์ Glucoamylase β -Glucosidase และ CMCase รวมทั้งน้ำตาลรีดิวซิง (Reducing sugar) ทุกวัน

3.8 การเตรียม Culture filtrate สำหรับการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture)

นำจานเลี้ยงเชื้อหลังการบ่มมาทำการสกัดกรดมะนาวโดยเขี่ยลงในปิเกตอร์ ขนาด 500 มล. ทำให้แตกหักเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย เติมน้ำกลั่นอุณหภูมิ 60°C ปริมาตร 200 มล. ทำการปั่นอย่างแรงด้วยเครื่อง Magnetic stirrer เป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.4 ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศจะได้ Culture filtrate ที่สามารถนำไปหาปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลรีดิวซิงได้

3.9 การวัดปริมาณกรดมะนาวใน Culture filtrate

นำ Culture filtrate ที่ได้จาก ข้อ 3.7 ปริมาตร 5 มล. เติมนีโอลล์ฟทาไลน์ลงไปประมาณ 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ นำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (0.1 N) จนกระทั่งถึงจุดยุติ (Culture filtrate เปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนๆ) ทำการบันทึกปริมาตรสารละลาย NaOH ที่ใช้ นำมาคำนวณหาปริมาณกรดมะนาวได้จากสูตร

$$\% \text{ yield} = \frac{F \times (V-B) \times 21.6 \times 210 \times 100}{(16 \times 15 \times \% \text{C-source})}$$

$$\text{Citric acid (g/l)} = \text{g/l (C-source)} \times \% \text{ yield} / 100$$

F = ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH

V = ปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท

%C-source = ปริมาณของแหล่งต้นตอของคาร์บอนที่ใช้ หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

B = Blank มีค่าเท่ากับ 0.2

g/l (C-source) = ปริมาณของแหล่งต้นตอของคาร์บอนที่ใช้ หน่วยเป็นกรัม/ลิตร

3.10 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์

3.10.1 Glucoamylase

แอกติวิตีของเอนไซม์ Glucoamylase วัดโดยดัดแปลงวิธีการจาก Abe *et. al.* (1988) โดยในสารละลาย Reaction mixture (1 มิลลิลิตร) ประกอบด้วย 0.8 มิลลิลิตร ของ 2% (w/v) Soluble starch ในสารละลาย 50 mM Acetate buffer (pH 5.5) และ 0.2 มิลลิลิตร ของ Culture filtrate ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปฏิกิริยาจะทำให้ถูกยุติโดยการนำไปจุ่มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที วัดปริมาณกลูโคสด้วย Glucose C-test kit (Wako Pure Chemicals) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส 1 Unit ของ Glucoamylase มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ 1 μmole ของ กลูโคส ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

3.10.2 Protease

แอกติวิตีของเอนไซม์ Acid protease วัดโดยดัดแปลงวิธีการจาก Lovrien *et al.* (1985) โดยในสารละลาย Reaction mixture (4 มิลลิลิตร) ประกอบด้วย 3 มิลลิลิตร ของ 1% (w/v) Azocasein (sigma, USA) ในสารละลาย 20 mM Citrate-phosphate buffer (pH 5.5) และ 1 มิลลิลิตร ของ Culture filtrate ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ยุติปฏิกิริยาโดยการเติม 12% (w/v) Trichloroacetic acid และกรองเอาตะกอนที่เกิดขึ้นออกด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร โดยให้นิยามของค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ Acid protease ดังนี้ หนึ่ง หน่วย (ยูนิต) ของเอนไซม์เท่ากับการเพิ่มขึ้นของ A_{366}/min ภายใต้สภาวะการทดลอง

3.10.3 α -Amylase

แอกติวิตีของเอนไซม์ α -Amylase วัดโดยชุดสำเร็จรูป Mono-test [a] α -Amylase

(Boehringer Mannheim)

3.11 การวัดน้ำตาลรีดิวซิง

น้ำตาลรีดิวซิงทั้งหมดใน Culture filtrate วัดปริมาณโดย Colorimetric method นั่นคือ นำ Culture filtrate ปริมาตร 1 มล. ทำปฏิกิริยากับกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก รีเอเจนท์ ปริมาตร 1 มล. เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็งทันทีแล้วเติมน้ำกลั่นที่เย็นปริมาตร 10 มล. ลงไป เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณค่าน้ำตาลรีดิวซิง จากกราฟมาตรฐานของกลูโคส

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2

จากการทดสอบการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในอาหารสูตรสมบูรณ์ (Potato dextrose agar, PDA) เป็นเวลา 18 วัน พบว่า *Aspergillus niger* Yang no.2 สามารถเจริญและผลิตสปอร์ได้เป็นจำนวนมาก

4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาว

ผลการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส รวมทั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ของ *Aspergillus niger* Yang no.2 โดยใช้แหล่งต้นตอของคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น Soluble starch แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด ข้าวฟ่าง และ มันแกว เป็นต้น พบว่า *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) นั้น แหล่งต้นตอของคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ใช้สามารถเจริญได้ดี โดยให้ผลผลิตของกรดมะนาว และปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่แตกต่างกันไปตามชนิดของแหล่งต้นตอที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 - ตารางที่ 4.5 นอกจากนั้นยังพบอีกว่า *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) นั้น แหล่งต้นตอของคาร์บอนชนิดต่างๆ ไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส หรือถ้าจะสังเคราะห์ได้ก็จะอยู่ในปริมาณที่ต่ำมาก

ตารางที่ 4.1 การผลิตกรดมะนาวจาก Soluble starch ด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง

น้ำหนัก Soluble starch ที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาวสูงสุด ¹ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสสูงสุด ¹ (U/ml)
120	54.7 (2.1)	10.22 (1.1)
140	59.2 (1.8)	12.41 (1.1)
160	59.1 (2.1)	11.35 (1.2)

¹Mean and standard deviations (n=3, in parentheses) are given.

ตารางที่ 4.2 การผลิตกรดมะนาวจาก แป้งมันสำปะหลัง ด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง

น้ำหนัก แป้งมันสำปะหลัง ที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาวสูงสุด ¹ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสสูงสุด ¹ (U/ml)
120	28.3 (1.5)	7.81 (1.1)
140	36.4 (1.1)	9.55 (1.2)
160	36.8 (1.8)	9.35 (1.0)

¹Mean and standard deviations (n=3, in parentheses) are given.

ตารางที่ 4.3 การผลิตกรดมะนาวจาก แป้งข้าวโพด ด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง

น้ำหนัก แป้งข้าวโพด ที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดมะนาวสูงสุด ¹ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสสูงสุด ¹ (U/ml)
120	21.4 (2.4)	6.82 (1.1)
140	25.2 (1.9)	7.99 (1.1)
160	25.5 (1.8)	7.58 (1.1)

¹Mean and standard deviations (n=3, in parentheses) are given.

ตารางที่ 4.4 การผลิตกรดมะนาวจาก ข้าวฟ่าง ด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง

น้ำหนัก ข้าวฟ่าง ที่ใช้ (กรัมต่อเพลท)	ปริมาณกรดมะนาวสูงสุด ¹ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสสูงสุด ¹ (U/ml)
15	269.0 (4.8)	12.27 (1.9)
20	284.2 (4.5)	18.82 (1.5)
25	288.1 (5.0)	19.54 (1.7)

¹Mean and standard deviations (n=3, in parentheses) are given.

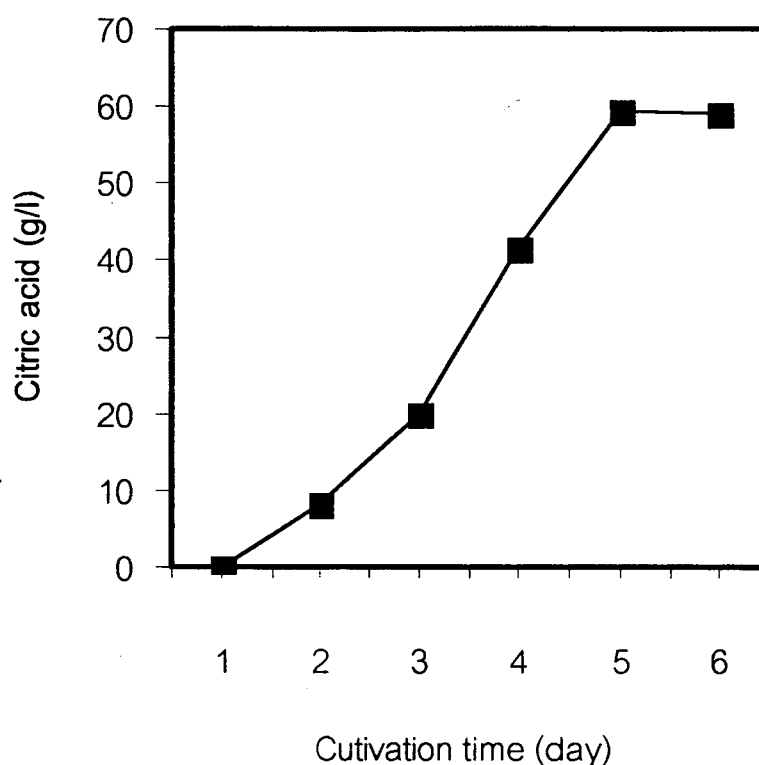
ตารางที่ 4.5 การผลิตกรดมะนาวจาก มันแกว ด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง

น้ำหนัก มันแกว ที่ใช้ (กรัมต่อเพลท)	ปริมาณกรดมะนาวสูงสุด ¹ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสสูงสุด ¹ (U/ml)
15	266.6 (5.2)	19.45 (2.3)
20	333.9 (8.8)	36.11 (5.3)
25	330.4 (7.5)	35.29 (5.7)

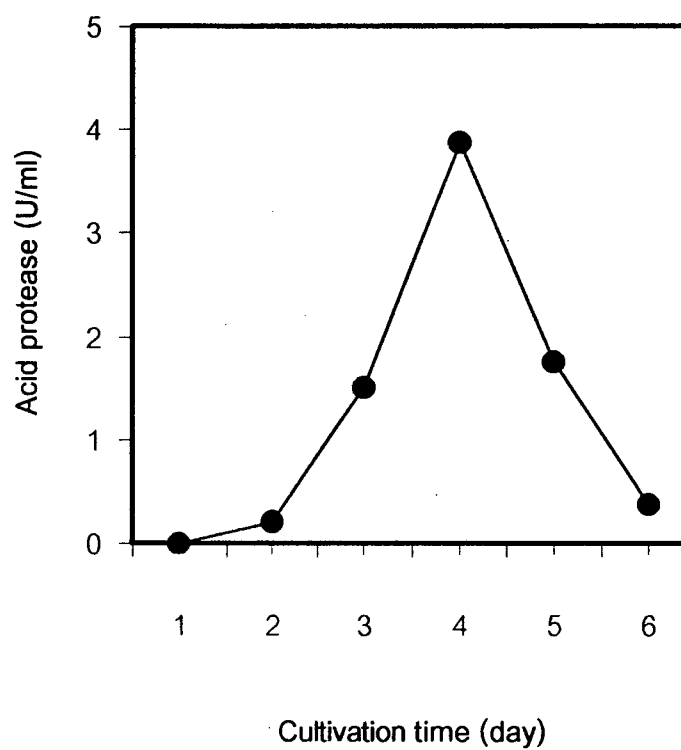
¹Mean and standard deviations (n=3, in parentheses) are given.

4.3 การผลิตเอนไซม์ Acid protease ของ *Aspergillus niger* Yang no.2

ผลการศึกษาระดับปริมาณของกรดมะนาว และเอนไซม์ Protease ในช่วงเวลาต่างๆ ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) เมื่อใช้ Soluble starch ปริมาณ 140 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน พบว่า เมื่อเจริญ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในอาหารสูตร SS เป็นเวลานาน 5 วัน จะให้กรดมะนาวสูงสุด เท่ากับ 59.2 กรัมต่อลิตร (ดังแสดงในรูปที่ 4.1) นอกจากนั้น จากการศึกษาวัดปริมาณของเอนไซม์ Acid protease ตลอดระยะเวลา 6 วันของการเจริญ พบว่า *Aspergillus niger* Yang no.2 สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ Acid protease ได้สูงสุดถึง 3.88 U/ml เมื่อเวลาผ่านไป 5 วันของการเจริญ (ดังแสดงในรูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.1 แสดงการผลิตกรดมะนาวของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 เมื่อใช้ 140 กรัมต่อลิตร ของ Soluble starch เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนที่ระยะเวลาของการเจริญทั้งสิ้น 6 วัน



รูปที่ 4.2 แสดงการสังเคราะห์เอนไซม์ Acid protease ของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 เมื่อใช้ 140 กรัมต่อลิตร ของ Soluble starch เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนที่ระยะเวลาของการเจริญทั้งสิ้น 6 วัน

4.4 การกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *Aspergillus niger* Yang no.2 ที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ Protease

จากการกลายพันธุ์ของ *Aspergillus niger* Yang no.2 ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลตพบว่า สามารถคัดแยกสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Protease ได้ต่ำ โดยสังเกตจากขนาดของบริเวณ Clear zone บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งของ Casein medium ที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ *Aspergillus niger* Yang no.2 ซึ่งสามารถคัดแยกสายพันธุ์กลายได้ถึง 412 สายพันธุ์ และเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส และความเป็นกรดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งของ Starch-methyl red ทั้งนี้อยู่บนพื้นฐานของการที่ *Aspergillus niger* Yang no.2 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ α -Amylase ได้น้อยมาก จากการศึกษพบว่า มีเพียง 57 สายพันธุ์กลายเท่านั้นที่มีความสามารถในการผลิตทั้งเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส และความเป็นกรดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งของ Starch-methyl red

ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส และกรดมะนาวในการเจริญแบบ Semi-solid culture ของสายพันธุ์กลายที่ได้เมื่อใช้ Soluble starch เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน พบว่า สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Protease ได้ต่ำนั้น สายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดคือ SWU-52 โดยสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงถึง 112.3 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *Aspergillus niger* Yang no.2 ผลิตกรดมะนาวได้เพียง 59.2 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ 140 กรัมต่อลิตรของ Soluble starch เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนโดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 5 วัน นอกจากนั้น ยังพบว่าสายพันธุ์กลายนั้นไม่มีการผลิตกรดอินทรีย์ชนิดอื่น (ตารางที่ 4.6)

4.5 การผลิตกรดมะนาวของสายพันธุ์กลาย

ผลจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Protease ต่ำ นั้น พบว่า เชื้อรา *Aspergillus niger* SWU-52 เป็นสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดเมื่อใช้ Soluble starch เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน (112.3 กรัมต่อลิตร) และยังสามารถแสดงถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงถึง 27.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) ดังนั้น จึงนำเชื้อรา *Aspergillus niger* SWU-52 ไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวจากวัสดุทางการเกษตรคือ แป้งมันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และมันแกว เปรียบเทียบกับเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และจากรูปที่ 4.3 จะแสดงความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของ

Aspergillus niger SWU-52 เมื่อใช้มันแกวเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนเมื่อเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับ เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2

ตารางที่ 4.6 อะไมเลสและความสามารถในการผลิตกรดของสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งของ Starch-methyl red และในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture)¹

Strains	On the plate ²		In semi-solid culture ³	
	Zone ratio of amylase	Zone ration of acid	Glucosylase (U/ml)	Citric acid (g/l)
Parent				
Yang no.2	1.4 (0.4)	3.1 (0.5)	11.5 (1.0)	59.2 (3.8)
Mutant				
SWU-9	2.2 (0.3)	4.2 (0.4)	21.2 (2.1)	99.1 (5.7)
SWU-17	2.0 (0.4)	3.9 (0.5)	20.9 (1.5)	105.0 (8.1)
SWU-45	2.1 (0.4)	4.1 (0.5)	26.2 (2.8)	91.8 (2.8)
SWU-52	2.3 (0.3)	4.5 (0.4)	27.1 (1.1)	112.3 (4.8)
SWU-55	2.1 (0.3)	4.3 (0.5)	22.5 (3.1)	110.9 (3.3)

¹Mean and standard deviations (n=3, in parentheses) are given.

²On the modified starch-methyl red agar plates, the diameters (ϕ) in mm were measured for zones of amylase and acid. Zone diameter ratio of amylase is shown as the value of (ϕ amylase zone)/(ϕ colony) and that of acid as the value of (ϕ acid zone)/(ϕ colony). All measurements were done on the peak day of each zone ratio during 3-5 days.

³Cultivation was performed for 5 days in semi-solid culture.

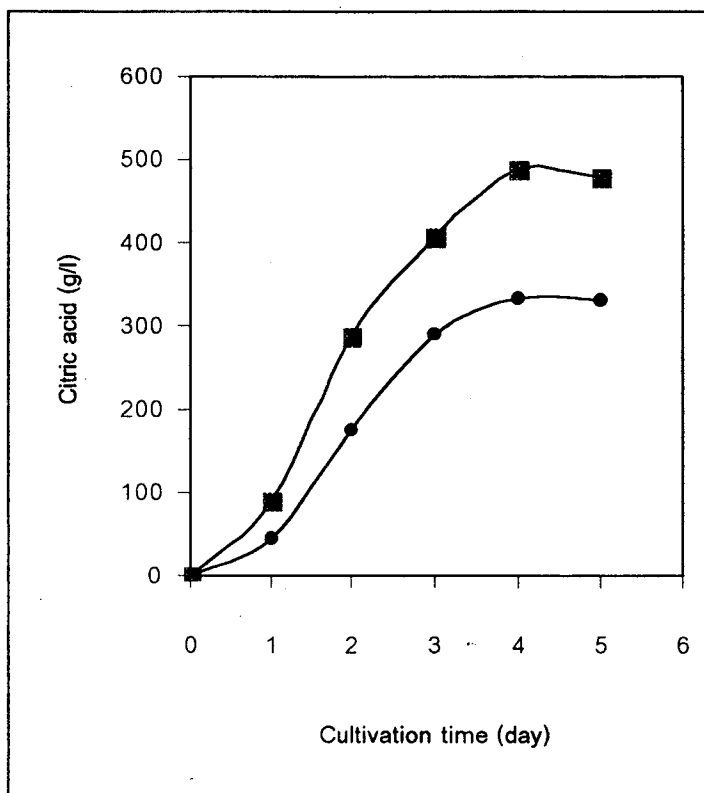
ตารางที่ 4.7 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดมะนาวจากวัสดุทางการเกษตรของเชื้อรา *Aspergillus niger* SWU-52 กับเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง¹

วัสดุทางการเกษตร ²	Citric acid (g/l) ³	
	SWU-52	Yang no.2
แป้งมันสำปะหลัง	66.3 (5.8)	36.8 (1.8)
ข้าวโพด	111.0 (8.1)	25.5 (1.8)
ข้าวฟ่าง	371.6 (9.1)	288.1 (5.0)
มันแกว	487.2 (7.6)	333.9 (8.8)

¹Means and standard deviations (n=3, in parentheses) are given.

²The optimal concentration of agricultural crop was used to produce high yield of citric acid production.

³The maximum citric acid production was detected in semi-solid culture after 5 days of cultivation. Amount of citric acid is shown as the values per milliliter of the medium supplied.



รูปที่ 4.3 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อรา *Aspergillus niger* SWU-52 กับเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 เมื่อใช้ 17 กรัมต่อเพลท ของมันแกวเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน โดยการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 จะเป็นสายพันธุ์ของราที่คาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวจากวัตถุดิบราคาถูกเช่น วัสดุจำพวกแป้ง เนื่องจากสายพันธุ์ดังกล่าวนี้ เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ดี (Sarangbin et. al., 1994) เอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุจำพวกแป้ง (Starchy materials) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะเป็น กลูโคส จากนั้นกลูโคสที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวต่อไป และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้ในระดับหนึ่ง ดังนั้นหากนำเชื้อรา *Aspergillus niger* มาใช้ในการผลิตกรดมะนาวจากวัสดุการเกษตรจำพวกแป้งที่มีอยู่มากในประเทศไทยก็น่าจะนำไปสู่การพัฒนากระบวนการผลิตกรดมะนาวที่ใช้แหล่งต้นตอของพลังงานที่มีราคาถูก และมีอยู่มากมายภายในประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Aspergillus niger* ให้มีประสิทธิภาพและความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้ดี เพื่อนำไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมต่อไป และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เมื่อมีการยับยั้งปริมาณของเอนไซม์ Protease ในระหว่างการผลิตกรดมะนาวด้วยแป้งแล้วจะมีผลทำให้มีปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้มีการผลิตกรดมะนาวมากยิ่งขึ้น (Rugsaseel et. al., 1993) ผลการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส รวมทั้งเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส ของ *Aspergillus niger* Yang no.2 โดยใช้แหล่งต้นตอของคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น Soluble starch แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด ข้าวฟ่าง และ มันแกว เป็นต้น พบว่า *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) นั้น แหล่งต้นตอของคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ใช้สามารถเจริญได้ดี โดยให้ผลผลิตของกรดมะนาว และปริมาณของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่แตกต่างกันไปตามชนิดของแหล่งต้นตอที่ใช้ โดยไม่สามารถวัดปริมาณของแอลฟาอะไมเลสได้เนื่องจากมีปริมาณที่ต่ำมาก นอกจากนั้นจากผลการศึกษาหาระดับปริมาณของกรดมะนาว และเอนไซม์ Protease ในช่วงเวลาต่างๆ ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) เมื่อใช้ Soluble starch ปริมาณ 140 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน พบว่า เมื่อเจริญ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในอาหารสูตร SS เป็นเวลานาน 5 วัน จะให้กรดมะนาวสูงสุด เท่ากับ 59.2 กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาวัดปริมาณของเอนไซม์ Acid protease ตลอดระยะเวลา 6 วันของการเจริญ พบว่า

Aspergillus niger Yang no.2 สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ Acid protease ได้สูงสุดถึง 3.88 U/ml เมื่อเวลาผ่านไป 5 วันของการเจริญ

ผลจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Protease ต่ำ นั้น พบว่า เชื้อรา *Aspergillus niger* SWU-52 เป็นสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดเมื่อใช้ Soluble starch เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน (112.3 กรัมต่อลิตร) และยังสามารถแสดงถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงถึง 27.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) และเมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus niger* SWU-52 ไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวจากวัสดุทางการเกษตรคือ แป้งมันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และมันแกว เปรียบเทียบกับเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 พบว่า SWU-52 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่า Yang no.2 ถึงประมาณ 1.5 เท่า และยังสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้เพิ่มมากยิ่งขึ้นหลังจากการเจริญผ่านไปหนึ่งวันโดยสามารถสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงสุดถึงประมาณ 59.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้เวลาในการเจริญ 3 วัน ในขณะที่ Yang no.2 ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้เพียง 21.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร

บทที่ 6

เอกสารอ้างอิง

1. กรดซิตริก สารใช้ปรับสภาพความเป็นกรดในอาหาร 2529 วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ ฉบับ 118 (ก.ย. 31) :86.
2. คมศร ลมไธสง 2539. "การผลิตรกตมะนาวจากแป้งโดย *Aspergillus niger* WU-2223L" ขอนแก่น : รายงานโครงการวิจัยปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3. จูติมา เกศกนกวงศ์ 2539 "การผลิตรกตมะนาวโดยราพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2" ขอนแก่น : รายงานโครงการวิจัยปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
4. สุขใจ โสมะจูติ 2529 "อุตสาหกรรมกรดซิตริกกับแนวโน้มการผลิตในประเทศไทย" วารสารเกษตร พระจอมเกล้า 4(3) : 14-77
5. อารณ วังวิจารย์ 2529 "กรดซิตริก" วารสารคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและ วิทยาศาสตร์ 3 (5) : 405-422.
6. อารณ วังวิจารย์ 2529 "การคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อหมักกรดซิตริกจากน้ำทิ้ง สับปะรดเข้มข้น วารสารคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์ 2(5) : 115-129
7. Ajibad, A. et al. 1980 Enzyme Microb. Technol. 2, 61.
8. Chaudhary, K. K., Lakshminarayana, S., Ethiraj and Tauro, P. 1978 "Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Indian cane molasse by solid state fermentation J. Ferment. Technol. Jpn. 56 : 554.
9. Dekker, R. F. H. and Lindner, W. A. 1979 S. Afr. J. Sci. 75 : 65.
10. Gupta, J. K., Heding, L.G. and Jangensen, O. B. 1976 "Effect of sugar, pH and Ammonium Nitrate on Formation of Citric Acid by *Aspergillus niger*" Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung. 23 : 63.
11. Hannan, M. A., Rabbi, F., Rahman, A. T. M. F. and N-Chandhury 1973 J. Ferment. Technol. 51 : 606.
12. Kapoor, K. K., Chaudhary K. and Tauro, P.,1982 "Citric Acid in Prescott and Dunn's Industrial Microbiology" 4th ed. edited by G.Reed. AVI Publishing Com., Inc. Westport, Connecticut.

13. Kirk, O. 1964. Encyclopedia of Chemical, Citric Acid 2nd ed., John Wiley and Sons, New York : pp.524.
14. Koullas et al. 1993 "Effect of Alkali Delignification on Wheat Straw Saccharification by *Fusarium oxysporum* Cellulases" Biomass and Bioenergy, 4(1) : 9.
15. Kubicek, C. P. and Rohr M., 1986 Citric Acid Fermentation, CRC Crit. Rev. Biotechnol., 3 : 331.
16. Lutzen, N. W. Nielsen, M. H., Oxenboel, K. M., Schulein, M. and Stentebjerg- Olesen, B., 1983 Philos. Trans, R. Soc. London Ser., B 300 : 283.
17. Manonmani, H. K. and Sreekantiah, K. R., 1987 "Study on the Conversion of Cellulose Hydrolysate into Citric Acid by *A. niger*", Process. Biochem., 19 : 92.
18. Mollering, H. and Gruber, W., 1966 Anal. Biochem., 17 : 369.
19. Prescott, S. C. and Dunn, C. G., 1949 "The Citric Acid Fermentation" Industrial Microbiology, Mc-Graw Hill Book Company, Inc. New York.
20. Puri, V. P. and Pearce, G. R., 1986 "Alkali-Explosion Pretreatment of Straw and Bagasse for Enzymatic Hydrolysis", Biotech. Bioeng. XXVIII, 480.
21. Purnendu Ghosh and Ajay Singh in "Advances in Applied Microbiology" vol.39. pp. 295, Academic Press, U.S.A (1993)
22. Rugsaseel, S., Kirimura, K. and Usami, S., 1993 "Citric acid production from soluble starch in shaking culture by the selected mutants of *Aspergillus niger*", Bull. Sci. and Eng. Res. Lab., Waseda Univ., 142: 39.
23. Ryu, D. D. Y. and Mandels, M., 1980 Enzyme Microb. Technol., 2 : 91.
24. Somsak Sarangbin, 1994 "Breeding of Filamentous Fungi for Citric Acid Production from Cellulosic and Starchy Materials", A Thesis presented to Department of Applied Chemistry, School of Science and Engineering, Waseda University.
25. Sarangbin, S., Kirimura, K. and Usami S., 1993 "Citric Acid Production from Cellobiose by 2-Deoxyglucose-Resistant Mutant Strains of *Aspergillus niger* in Semi-Solid Culture", Appl. Microbiol. Biotechnol., 40 : 206.

26. Sarangbin, S., Morikawa, S., Kirimura, K. and Usami S., 1994 "Formation of autodiploid strains in *Aspergillus niger* and their application to citric acid production from starch", J. Ferment. Bioeng., 77 : 474.
27. Chang, L. T. and Terry, C. A., 1973 "Intergenic complementation of glucoylase and citric acid production in two species of *Aspergillus niger*", Appl. Microbiol., 25 : 890.
28. Gokhale, D. V. , Patil, S. G. and Bastawde, K. B., 1991 "Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207", Appl. Biochem. Biotech., 30 : 99.
29. Kirimura, K. , Sarangbin, S. , Rugsaseel, S. and Usami, S., 1992 "Citric acid production by 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Aspergillus niger*", Appl. Microbiol. Biotechnol., 36 : 573.
30. Lovrien, R. E., Gusek, T. and Hart, B., 1985 "Cellulase and protease specific activities of commercially available cellulase preparations", J. Appl. Biochem., 7 : 258.
31. Reczey, K., Laszlo, E. and Hollo, J., 1986 "Comparison of enzymic saccharification of starch and cellulose from technological and economic aspects", Starch/Starke, 38 : 306.
32. Sinitsyn, A. P., Gusakov, A. V. and Yu Vlasenko, E., 1991 "Effect of structural and physio-chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis", Appl. Biochem. Biotech., 30 : 43.
33. Szezodrak, J., 1989 "The use of cellulase from a β -glucosidase-hyperproducing mutant of *Trichoderma reesei* in simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw", Biotech. Bioeng., 33 : 1112.

ภาคผนวก

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีเตรียมสารละลาย

อุปกรณ์ และสารเคมี

ก. อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาดต่างๆ
2. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาดต่างๆ
3. กระบอกตวง (Cylinder) ขนาดต่างๆ
4. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
5. ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) พร้อมทิป (Tips) ขนาดต่างๆ
6. ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
7. หลอดทดลองฝาเกลียว และแบบไม่มีฝา
8. พาราฟิล์ม และอะลูมิเนียมฟอยด์
9. ตะแกรงวางหลอด (Tes-tube rack)
10. หลอดหยด (Pasteur pipette) พร้อมลูกยาง
11. ขวดปริมาตร (Schot bottle) ขนาดต่างๆ
12. กระดาษกรอง Whatman No. 1 และ No. 4
13. บิวเรต (Buret) พร้อมขาตั้ง
14. กรวยกรอง (Buchner funnel)
15. Suction flask
16. Magnetic bar
17. Magnetic stirrer
18. Vertex mixer
19. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
20. เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum pump) บริษัท ABM, Germany
21. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท Beckman Instrument, Inc., U.S.A.

22. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) Model KT-30LD บริษัท LAP CO., Ltd., Japan
23. ตู้ปลอดเชื้อ (Biohazard clean air) รุ่น CAVREV6, Natherland
24. ตู้บ่มปรับอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Conthem Scientific Ltd., Newzealand
25. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Shimadzu UV-1201 บริษัท Shimadzu, Japan
26. เครื่องเซนตริฟิวจ์
27. ชุดอิเล็กโตโฟรีซิส (Mini Gel, Tokyo, Japan)
28. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR, Thermal cycle) (MJ, USA)
29. กล้องถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม
30. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
31. อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็นในห้องปฏิบัติการ

ข. สารเคมี

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. กรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก
(3,5-dinitrosalicylic acid) | Fluka A.G., Switzerland |
| 2. โซเดียมไฮดรอกไซด์
(Sodium hydroxide) | E.Merck A.G., Germany |
| 3. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต
(Potassium sodium tartrate) | Famitalia carlo eaba A.G. |
| 4. ฟีนอล์ฟทาลีน
(Phenophthalein) | |
| 5. กลูโคส (Glucose) | Famitalia carlo eaba A.G. |
| 6. เอทิลแอลกอฮอล์
(Absolute ethyl alcohol) | Famitalia carlo eaba A.G. |
| 7. แอมโมเนียมไนเตรต
(Ammonium nitrate) | Fluka A.G., Switzerland |
| 8. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
(Potassium dihydrogen phosphate) | E. Merck A.G., Germany |

- | | |
|--|----------------------------|
| 9. แมกนีเซียมซัลเฟตเซปตะไฮเดรต
(Magnesium sulfate heptahydrate) | E. Merck A.G., Germany |
| 10. แมงกานีสซัลเฟต
(Manganese sulfate) | E. Merck A.G., Germany |
| 11. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต
(Ferric chloride hexahydrate) | Fluka A.G., Switzerland |
| 12. อะซีโตน (Acetone) | Fluka A.G., Switzerland |
| 13. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟทาเลต
(Potassium hydrogen phthalate) | Fluka A.G., Switzerland |
| 14. โพเทโท เดกซ์โทรส อาการ์
(Potato dextrose agar) | Difco laboratories, U.S.A. |
| 15. กรดซิตริก (Citric acid) | Fluka A.G., Switzerland |
| 16. ไตรโซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต
(tri- Sodium citrate Dihydrate) | Fluka A.G., Switzerland |
| 17. อะกาโรส | Difco laboratories, U.S.A. |
| 18. เอนไซม์ตัดจำเพาะ อาทิเช่น <i>EcoR</i> I, <i>Hind</i> III เป็นต้น | |
| 19. PCR reaction kits | Perkin Elmer, U.S.A. |

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2,

ที่มา : Department of Applied Chemistry, School of Science and Engineering, Waseda University

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารชนิดแข็งสูตรสมบูรณ์ (Complete agar medium)

เติม Potato dextrose agar (PDA) จำนวน 3.9 กรัม ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. ต้มให้เดือดพร้อมกวนจนอาหารละลายหมด จากนั้นเทใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละประมาณ 5 มล. ปิดฝาไม้ ต้องแน่นแล้วหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15

นาที่ ทิ้งไว้พออุ่นๆ แล้วปิดฝาให้แน่น วางหลอดเอียงลงให้อาหารห่างจากปากหลอดประมาณ 1-1 1/2 นิ้ว ทิ้งไว้ให้เย็น อาหารเลี้ยงสูตรสมบูรณ์นี้ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อ (Strain maintenance)

2. อาหารสังเคราะห์สูตรสำหรับการผลิตกรดมะนาว (Synthetic medium)

สูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว จะเป็นอาหารสูตรควบคุม กล่าวคือ มีแร่ธาตุบางชนิดในปริมาณจำกัด เพื่อทำให้เกิดการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด โดยสูตรอาหารสำหรับการหมักแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) ประกอบด้วย

องค์ประกอบ	จำนวน (กรัม/ลิตร)
NH_4NO_3	2
KH_2PO_4	10
MgSO_4	0.25
MnSO_4	0.014
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.02

ในการเตรียมจะเติมแหล่งต้นตอของคาร์บอน ในขั้นตอนสุดท้ายแล้วปรับ pH 4.25 ก่อนนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอน ด้วยการไตเตรดกับสารละลาย KHP (Potassium hydrogen phthalate)

2. สารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก รีเอเจนท์

ประกอบด้วยสารเคมี ดังต่อไปนี้

ก. กรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid)	10	กรัม
ข. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	16	กรัม
ค. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรท (Potassium sodium tartate)	300	กรัม
ง. น้ำกลั่น (Distilled water)	1000	กรัม

เทส่วนผสมต่างๆ ลงในขวดต้มกลั่น (Refluxion flask) จากนั้นทำการต้มกลั่น (Reflux) ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

3. สารละลาย 70 % เอทิลแอลกอฮอล์

ตวงเอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 70 มล. แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ชั่งกลูโคส 20 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 20 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคสอยู่ในช่วง 100-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

วิธีสร้างกราฟมาตรฐานของกลูโคสทำได้โดยใช้สารละลายกลูโคสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรด 3,5 - Dinitrosalicylic acid reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยเครื่อง Vertex จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำลงแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่นที่เย็นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส