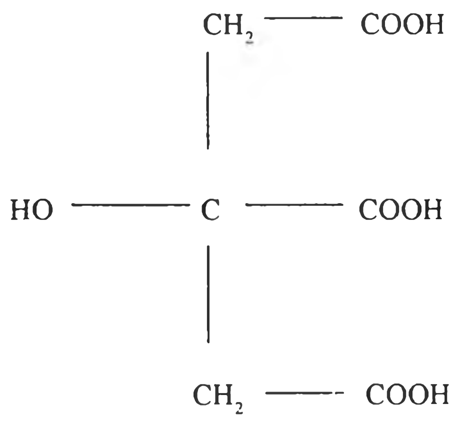
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1 คุณสมบัติของกรดมะนาว

กรดมะนาวเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง พบในธรรมชาติและในสิ่งมีชีวิต ชื่อทางเคมีของกรดมะนาวมี 2 ชื่อคือ กรด 2 ไฮดรอกซี-1,2,3-โพรเพนไตรคาร์บอกซิลิก (2-hydroxy-1,2,3-propane tricarboxylic acid) หรือ กรดบีตาไฮดรอกซีไตรคาร์บอกซีลิก (β-hydroxy tricarboxylic acid) กรดมะนาวเป็นสารตัวกลาง (key intermediate) ที่สำคัญในวัฏจักรเครป (Kreb's cycle หรือ tricarboxylic acid cycle) ของระบบสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย โครงสร้างของกรดมะนาว แสดงดังในรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว (Casida, 1964)

การผลิตกรดมะนาวในเชิงพาณิชย์มี 2 รูปแบบคือ ในรูปที่ปราศจากน้ำ (anhydrous, $C_6H_8O_7$) ซึ่งจะมีจุดหลอมเหลวที่ 153 องศาเซลเซียส และในรูปที่มีน้ำอยู่ 1 โมเลกุล (monohydrate, $C_6H_8O_7.H_2O$) ซึ่งมีจุดหลอมเหลวที่ 100 องศาเซลเซียส (ควงพร, 2537) กรดมะนาวสามารถละลายได้ดีในน้ำและอัลกอฮอล์แต่ละลายได้ไม่ดีในอีเธอร์ (Douglas, 1974) ความสามารถในการละลายน้ำของกรดมะนาวจะแปรผันโดยตรงกับอุณหภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความสามารถในการละลายน้ำของกรดมะนาว (Kirk, 1964)

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณร้อยละของกรดมะนาว	รูปของกรดมะนาว
10	54.0	$C_6H_8O_7.\ H_2O$
20	59.2	$C_6H_8O_7.\ H_2O$
30	64.3	$C_6H_8O_7.\ H_2O$
40	68.6	$C_6H_8O_7$
50	70.9	$C_6H_8O_7$
60	73.5	$C_6H_8O_7$
70	76.2	$C_6H_8O_7$
80	78.8	$C_6H_8O_7$
90	81.4	$C_6H_8O_7$
100	84.0	$C_6H_8O_7$

2 ประโยชน์ของกรดมะนาว

องค์การอนามัยโลกและองค์การอาหารและยา ให้การยอมรับว่ากรดมะนาวเป็นสารที่สามารถใช้เติมลงในอาหารได้โดยไม่เป็นอันตราย เพราะเป็นกรดที่มีรสชาติดี ย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ และสามารถละลายน้ำได้ดี (Kubicek และ Rohr, 1984; Rohr และคณะ, 1983) มีการนำกรดมะนาวไปใช้ในอุตสาหกรรมชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (food and beverage industries) ซึ่งพบว่ามีการนำกรดมะนาวไปใช้สูงถึงร้อยละ 70 นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยาประมาณร้อยละ 12 และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมชนิดอื่นๆอีกประมาณร้อยละ 18 (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

รายละเอียดของการนำกรดมะนาวไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมีดังต่อไปนี้

2.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

มีการนำกรดมะนาวไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มสูงมาก เพราะกรดมะนาวมีความสามารถในการละลายน้ำสูง ความเป็นพิษต่ำ และเป็นกรดที่มีรสชาติดี นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ (Kubicek และ Rohr, 1984) โดยจะใช้กรดมะนาวเป็นตัวปรับกรด (acidulant) ในอาหารกระป๋องหรือน้ำอัดลม (Menlo, 1981) เป็นตัวช่วยเพิ่มกลิ่นรส ลดความฝาด ควบคุมความเป็นกรดและป้องกันการขุ่นของเครื่องดื่มที่ทำจากน้ำผลไม้ (Rohr และ Kubicek, 1980) และยังใช้เป็นตัวปรับให้มีรสชาติดีโดยการผสมในซอสปรุงรส ไซรับ ลูกอม ลูกกวาด และมีคุณสมบัติในการช่วยเก็บรักษาอาหาร ใช้เป็นสารกันบูดและช่วยยืดอายุผลิตภัณฑ์พวกเนยแข็งและเนยเหลว นอกจากนี้ยังพบว่ากรดมะนาวยังช่วยในการป้องกันการเปลี่ยนสีของเนื้อสัตว์จำพวกปลาและกุ้งที่มีไขมัน โดยการนำไปจุ่มลงในสารละลายผสมระหว่างกรดมะนาวกับกรดแอสคอบิก ใช้เป็นสารป้องกันการเหม็นหืนในอาหารที่มีไขมัน ตัวอย่างของอาหารและเครื่องดื่มที่ใช้กรดมะนาว ได้แก่ น้ำอัดลม เยลลี่ แยม น้ำเชื่อม ไอศกรีม ไวน์ชนิดต่างๆ อาหารแช่แข็ง ผลิตภัณฑ์นม และน้ำตาลอินเวอร์ต เป็นต้น

2.2 อุตสาหกรรมทางเภสัชกรรม

ในการผลิตยาบางชนิดจะใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมเพื่อควบคุมความเป็นกรด หรือเพื่อใช้เป็นตัวทำละลาย ช่วยให้ยามีการแตกตัวได้ดีขึ้น นอกจากนี้ ยังใช้ผสมในยาเพื่อให้เกิดฟองฟู่ในน้ำดื่มโดยใช้ร่วมกับคาร์บอเนตและใช้ป้องกันการจับตัวเป็นก้อนของยา โดยใช้เป็นส่วนผสมในรูปของเกลือหรือเอสเทอร์ของกรดมะนาว

2.3 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง กรดมะนาวจะถูกใช้เพื่อป้องกันการออกซิไดซ์ ปรับความเป็นกรดด่าง เป็นบัฟเฟอร์ (buffer) ในเครื่องสำอาง เช่น ใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาเซทผม ครีมนวดผม และโลชั่นทาผิว โดยกรดมะนาวจะทำให้เกิดความแวววาว และทำให้ผลิตภัณฑ์มีความอ่อนนุ่มมากยิ่งขึ้น

2.4 อุตสาหกรรมอื่นๆ

นอกจากอุตสาหกรรมสำคัญทั้งหมดที่กล่าวมาแล้วข้างต้น กรดมะนาวยังถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆอีก เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอกจะใช้โซเดียมซิเตรทแทนการใช้ฟอสเฟต (Menlo, 1981) ใช้กรดมะนาวเป็นบัฟเฟอร์ในอุตสาหกรรมการถ่ายภาพ ใช้ผสมทำความสะอาดหม้อต้มน้ำ (boiler) ทำความสะอาดโลหะ ล้างสนิม หมึกพิมพ์ น้ำหมึก สี และพบว่ามีการนำกรดมะนาวไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียด้วย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาว

กรดมะนาวจัดเป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิของเมตาบอลิสม (primary metabolic product) ซึ่งในภาวะปกติจุลินทรีย์จะผลิตกรดชนิดนี้ออกมานอกเซลล์ในปริมาณต่ำ กรดมะนาวเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในวัฏจักรเครป ในรา *Aspergillus niger* การสังเคราะห์กรดมะนาว เริ่มต้นจากการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสในวิถีไกลโคไลซีส (glycolytic pathway, EMP) และในวิถีเพ็นโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway, PPP) โดยพบว่าน้ำตาลกลูโคสประมาณร้อยละ 80 จะถูกสลายโดยผ่านวิถี EMP ส่วนน้ำตาลกลูโคสที่เหลือประมาณร้อยละ 20 จะถูกสลายโดยผ่านวิถี PPP เพื่อให้ได้เป็นไพลูเวต (pyruvate) ดังแสดงในรูปที่ 2 ไพลูเวต จะเกิดดีคาร์บอกซิเลชั่น (decarboxylation) ได้เป็นอะซิติล โค เอ (acetyl-Co A) แล้วเข้าสู่วัฏจักรเครป โดย อะซิติล โค เอ จะรวมกับออกซาโลอะซิเตท (oxaloacetate)ได้เป็นกรดมะนาว ดังแสดงในรูปที่ 3

D- glucose

$\downarrow$

D-glucose 6-phosphate

$\downarrow$

D-fructose 6-phosphate

$\downarrow$

D-fructose 1,6-diphosphate

$\swarrow \qquad \searrow$

$CHO.CHOH.CH_2OPO_3^{2-} \rightleftharpoons CH_2OH.CO.CH_2OPO_3^{2-}$

D-glyceraldehyde 3-phosphote — dihydroxyacetone phosphate

$\downarrow$

$COO^{-}\text{-}CHOH\text{-}CH_2OP_3^{2-}$

3-phospho-D-glycerate

$\downarrow$

$COO^{-}\text{-}CHOP_3^{2-}\text{-}CH_2OH$

2-phospho-D-glycerate

$\downarrow$

$COO^{-}\text{-}COPO_3^{2-}{=}CH_2 \rightarrow COO^{-}CO\text{-}CH_2COO^{-}$

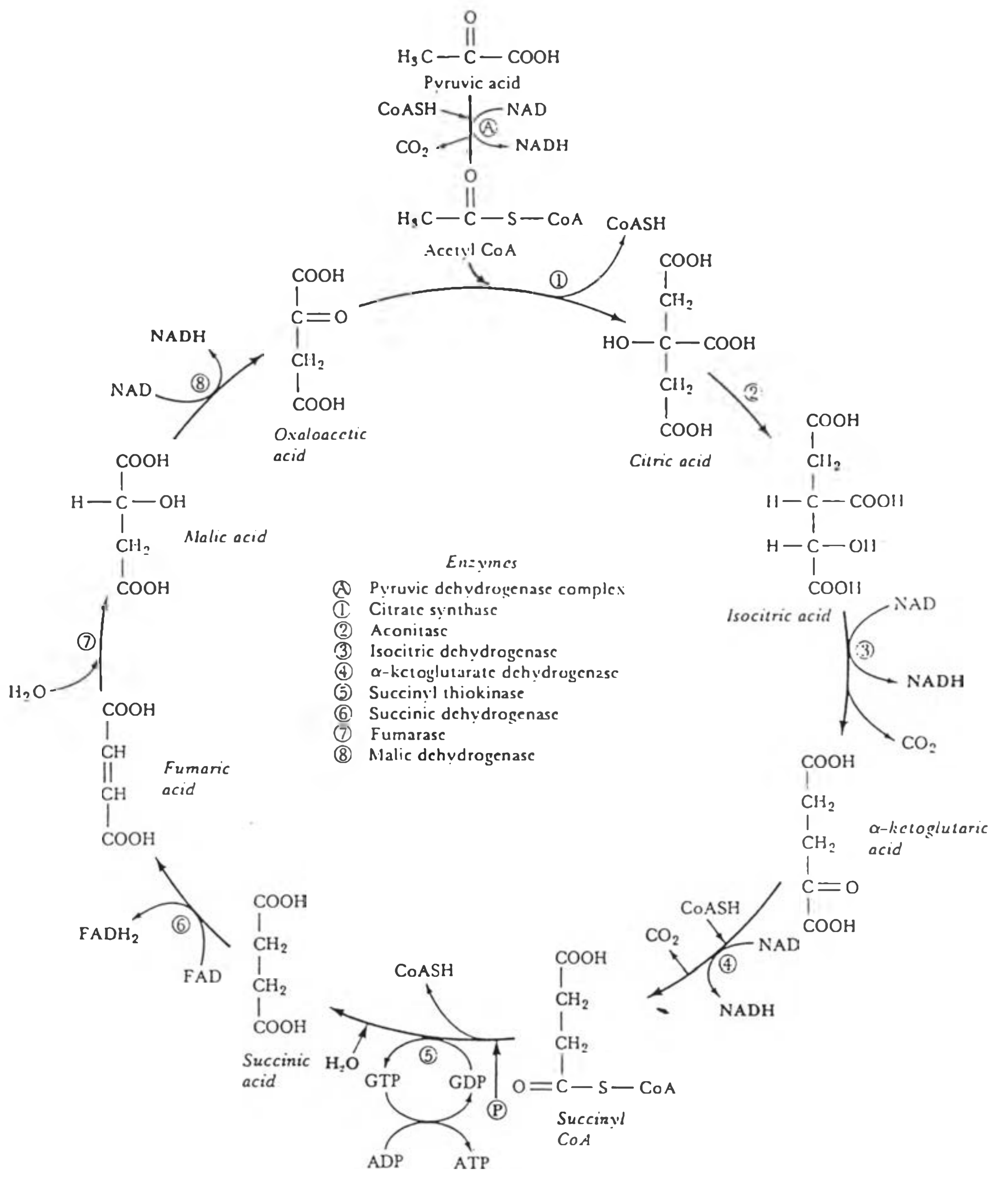
phosphoenolpyruvate — oxaloacetate

$\downarrow$

$COO^{-}\text{-}CO\text{-}CH_3 \rightarrow CH_3CO.S\text{-}CoA$

pyruvate — acetyl-CoA

รูปที่ 2 แสดงวิธีไกลโคไลซีส (Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway) (Michael และคณะ, 1993)



รูปที่ 3 วัฏจักรเครป (Michael และคณะ, 1993)

4 กระบวนการผลิตกรดมะนาว

การผลิตกรดมะนาวในปัจจุบันนิยมผลิตโดยใช้วิธีการหมักซึ่งพบว่าร้อยละ 99 ของกรดมะนาว ผลิตมาจากการหมักด้วยจุลินทรีย์ (Crueger และ Crueger, 1982) ได้แก่รา ยีสต์และแบคทีเรีย แต่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมนิยมผลิตกรดมะนาวด้วยการหมักโดยใช้รา *Aspergillus niger* (Bigelis และ Arora, 1992) ทั้งนี้เพราะ *A. niger* เป็นสายพันธุ์ที่ให้กรดมะนาวมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์แล้วก็จะช่วยให้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวมากยิ่งขึ้นอีก (Shu และ Johnson, 1948; Crueger และ Crueger, 1982; Rohr และคณะ, 1983) นอกจากนี้ การใช้ราในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาว ยังมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นอีกหลายประการ ได้แก่ รามีความคงตัวสูง เพาะเลี้ยงง่ายและยังสามารถใช้วัตถุดิบตั้งต้นที่มีราคาถูกได้หลายชนิด

กระบวนการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมโดยวิธีการหมักมี 3 แบบ (Sodeck และคณะ, 1981) ได้แก่

4.1 กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation)

เป็นกระบวนการที่อาศัยการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็ง วัตถุดิบที่ใช้ส่วนมากเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น กากมันสำปะหลัง กากมันเทศ เศษข้าวโพด รำข้าวสาลี ชานอ้อย เป็นต้น ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็งจะใช้รา *A. niger* ที่ไม่ไว(insensitive) ต่อธาตุอาหารรอง (trace element) บรรจุวัตถุดิบในถาด โดยให้มีความหนาประมาณ 3-5 เซนติเมตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างของวัตถุดิบเริ่มต้นเป็น 4-5 ก่อนการฆ่าเชื้อ หลังจากฆ่าเชื้อแล้วถ่ายสปอร์แขวนลอยของเชื้อราลงไปในวัตถุดิบ บ่มโดยควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6-7 วัน จึงทำการเก็บเกี่ยวกรดมะนาวโดยการสกัดด้วยน้ำร้อน (Crueger และ Crueger, 1982) ในกระบวนการหมักกรดมะนาวบนอาหารแข็งที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นพบว่า ถ้ามีการเติมเอนไซม์อัลฟาอะมิเลส (α-amylase) ลงไปตอนเริ่มต้นกระบวนการหมัก จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวได้ (Kubicek และ Rohr, 1984) อย่างไรก็ตามการหมัก เพื่อผลิตกรดมะนาว โดยกระบวนการแบบนี้จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆที่สำคัญ ได้แก่

ความชื้นเริ่มต้น โดยความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตจะมีค่าประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ การถ่ายเทออกซิเจน ซึ่งต้องอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างขนาดวัตถุดิบ ความชื้นที่มีอยู่ในวัตถุดิบ ช่องว่างระหว่างวัตถุดิบและการส่งถ่ายมวล นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงการถ่ายเทความร้อน และความชื้นสัมพัทธ์ เพื่อให้การหมักมีประสิทธิภาพสูงสุด

4.2 กระบวนการหมักบนผิวหน้าอาหารเหลว (Surface culture)

กระบวนการผลิตกรดมะนาวแบบนี้ เป็นกระบวนการผลิตที่เก่าแก่ที่สุด โดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ ให้เจริญบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลว ดังนั้นจึงต้องให้มีพื้นที่ผิวมากเพื่อให้เซลล์สัมผัสกับอากาศได้มาก จึงนิยมหมักในถาดทรงเตี้ย (shallow pan process) การหมักด้วยวิธีนี้มักใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ ปกตินิยมใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลประมาณ 150 กรัมต่อลิตร (Crueger และ Crueger, 1982) จากนั้นนำไปผ่านการฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็นก่อนที่จะถ่ายอาหารลงในถาดอลูมิเนียมที่เรียงเป็นชั้นๆภายในห้องที่มีการระบายอากาศ โดยให้มีความสูงของกากน้ำตาลประมาณ 50-200 เซนติเมตร จุลินทรีย์ที่ใช้ส่วนมากเป็น *A. niger* สายพันธุ์ที่ทนต่อโลหะได้เป็นพิเศษ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเหล็ก หลังจากใส่สปอร์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 2.5×10^7 สปอร์ต่อตารางเมตร บนผิวหน้าของอาหารแล้ว ราจะเจริญบนผิวหน้าของอาหาร ในขณะที่ทำการหมักต้องผ่านอากาศที่ฆ่าเชื้อแล้วเข้าไปในห้อง เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจน และเพื่อเป็นการระบายความร้อนที่เกิดจากการหมักออกไป โดยต้องควบคุมอัตราเร็วของอากาศให้เหมาะสมเพื่อควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 30 องศาเซลเซียส การหมักด้วยวิธีนี้จะใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 8-14 วัน แล้วจึงทำการแยกกรดมะนาวออกจากอาหารด้วยวิธีการตกตะกอน การผลิตกรดมะนาวด้วยวิธีนี้ จะให้ผลผลิตประมาณ 80-85 กรัมของกรดมะนาวต่อ 100 กรัมของน้ำตาลเริ่มต้น (ดวงพร, 2537)

4.3 กระบวนการหมักในอาหารเหลว (Submerged culture)

ในปัจจุบันมากกว่าร้อยละ 80 ของปริมาณการผลิตกรดมะนาว ในระดับอุตสาหกรรมทั่วโลกใช้วิธีการหมักในอาหารเหลว (Crueger และ Crueger, 1982) วิธีนี้เป็นการหมักให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญ ในอาหารที่มีลักษณะเป็นของเหลว โดยจุลินทรีย์จะถูกผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับอาหารเลี้ยงเชื้อ วัตถุดิบที่ใช้ส่วนมากเป็นน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของ

กลูโคสสูง น้ำอ้อย ธัญพืชพวกข้าวโพด ข้าวฟ่าง แป้งมันเทศ แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ หรือ กากน้ำตาล เป็นต้น หลังจากที่ผ่านการฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะถ่ายกล้าเชื้อ (inoculum culture) ลงไปเพื่อให้เชื้อเจริญในสภาพที่มีการกวนและการให้อากาศที่เหมาะสม วิธีการนี้ใช้ระยะเวลาในการหมักประมาณ 5-14 วัน

การผลิตกรดมะนาวด้วยกระบวนการหมักในอาหารเหลว มีข้อได้เปรียบกว่าการหมักด้วยกระบวนการอื่นๆหลายประการ เช่น อัตราการผลิตกรดมะนาวด้วยกระบวนการนี้จะสูงกว่าการผลิตด้วยกระบวนการอื่นๆ ทั้งนี้เพราะภาวะต่างๆในระหว่างการหมักสามารถควบคุมได้โดยการใช้อุปกรณ์ที่ทันสมัย และใช้เทคโนโลยีชั้นสูงในการผลิต ดังนั้นจึงเป็นการลดการใช้แรงงานลง นอกจากนี้ กระบวนการหมักในอาหารเหลวยังสามารถใช้วัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบได้ทุกชนิด ใช้พื้นที่ในการผลิตน้อย และสามารถควบคุมสภาพปลอดเชื้อได้ง่าย (Sikyta, 1983) แต่ข้อเสียของการผลิตกรดมะนาวด้วยวิธีนี้ คือจำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความสามารถและเชี่ยวชาญสูงในการควบคุมและดูแลอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการผลิต

5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว

เพื่อให้การผลิตกรดมะนาวมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องมีการควบคุมปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิต ซึ่งปัจจัยดังกล่าว ได้แก่

5.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว โดยเฉพาะราและยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยพบว่าหลักในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่จะใช้ในการผลิตควรมีคุณสมบัติต่อไปนี้ (Prescott และ Dunn, 1959)

5.1.1 ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงและสม่ำเสมอ

5.1.2 สามารถแยกกรดมะนาวออกจากน้ำหมักได้ง่าย

5.1.3 เชื้อที่ใช้ไม่เกิดการกลายพันธุ์

5.1.4 ผลิตกรดชนิดอื่นที่ไม่ต้องการในปริมาณน้อยหรือไม่ผลิตเลย

5.1.5 ทนต่อโลหะหนักที่มีผลต่อการผลิตได้สูง

5.1.6 สามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ตลอดทั้งปี

5.2 ชนิดและความเข้มข้นของวัตถุดิบ

มีรายงานว่า จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้นั้น สามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2-12 อะตอมเป็นวัตถุดิบได้ โดยขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 2 และพบว่าน้ำตาลซูโครสและฟรุคโตส จะให้ผลผลิตสูงกว่ากลูโคส กากน้ำตาลจากอ้อย และกากน้ำตาลจากหัวบีท ตามลำดับ ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 14-20 เปอร์เซ็นต์ (Perlman และ Sih, 1960)

5.3 เกลืออนินทรีย์

เกลืออนินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดมะนาวได้แก่ เกลืออนินทรีย์ของธาตุโพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี เป็นต้น โดยความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ของธาตุต่างๆเหล่านี้ แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์ (Perlman และคณะ, 1946b; Wold และ Suzuki, 1976; Clark และคณะ, 1966)

5.4 ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตกรดมะนาว จากการทดลองพบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้นประมาณ 1.6-2.2 จะมีผลดีต่อการผลิตกรดมะนาว โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างดังกล่าว จะมีผลยับยั้งการผลิตกรดออกซาลิก นอกจากนี้การที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่ำ ยังสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อีกด้วย

5.5 ปริมาณออกซิเจน

ในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาว ราจะใช้น้ำตาลบางส่วนในการผลิตกรด ส่วนที่เหลือจะถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญแต่เนื่องจากออกซิเจนมีความลำคัญต่อการเจริญของเชื้อ ดังนั้นกรณีที่ผลิตโดยกระบวนการหมักบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยใช้ภาชนะปากกว้างและตื้น จะช่วยให้มีการถ่ายเทอากาศและออกซิเจนได้ดีกว่าภาชนะปากแคบและลึก นอกจากนี้ภาชนะตื้นจะทำให้เชื้อสัมผัสกับอาหารได้มากกว่าด้วย

ส่วนกรณีการผลิตกรดมะนาวด้วยกระบวนการหมักในอาหารเหลว (submerged culture) พบว่าปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตคือ 0.2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (Andrew, 1952) และสำหรับการผลิตกรดมะนาวด้วยกระบวนการหมักในอาหารเหลวโดยใช้รา *A. niger* ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตมีค่า 3-4 x 10^{-6} กรัมโมลออกซิเจนต่อมิลลิลิตรต่อนาที (Usami, 1978)

5.6 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้และภาวะอื่นๆที่ใช้ในการหมัก จากการศึกษาของ Perlman และ Sih (1960) พบว่าโดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส ส่วนในสายพันธุ์ *A. niger* อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส (Prescott และ Dunn, 1959) และพบว่าอุณหภูมิที่ทำการหมักสูงเกินไป จะทำให้เกิดการสะสมกรดออกซาลิกและกรดกลูโคนิก

ตารางที่ 2 วัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตกรดมะนาว

ประเภทของวัตถุดิบ	ตัวอย่างวัตถุดิบ	จุลินทรีย์และลักษณะการหมัก	รายการอ้างอิง
ไฮโดรคาร์บอน	n-alkane (9-20 C-atom) n-paraffin (9-30C-atom)	หมักในระดับขวดเขย่าโดยใช้ *Candida sp.*	Milsom และ Meers, 1985
น้ำตาล	กลูโคส ซูโครส มอลโตส ฟรุคโตส แมนโนส กากน้ำตาลจากอ้อยและหัวบีท น้ำผลไม้เช่น สับปะรด และน้ำมะพร้าวเข้มข้น	หมักในระดับขวดเขย่าและถังหมัก โดยใช้ได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่ผลิตกรดมะนาวได้	Kubicek และ Rohr (1984)
แป้ง	แป้งจากธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันฝรั่ง มันสำปะหลัง กากมัน รำข้าว แกลบ	หมักในระดับขาดเขย่าและถังหมักโดยใช้รา	นิมล (2532) Voraputhaporn และคณะ (1985)
ไขมัน	ไขมัน กรดไขมัน และน้ำมันธรรมชาติ	หมักในระดับขวดเขย่าโดยใช้ *Candida sp.* *Hansenula sp.* และ *Pichia sp.*	Nishio และ Kamikubo (1971) Yamada และ Yogo (1970)

6 แป้งมันสำปะหลัง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6:10:5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลีเมอร์ของกลูโคส ประกอบด้วยพอลีเมอร์เชิงเส้น คือ อะไมโลส (amylose) ที่หน่วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-D-(1,4)-glucosidic lingkage โดยมีหน่วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย และพอลีเมอร์เชิงกิ่ง คืออะไมโลเพคติน (amylopectin) ซึ่งหน่วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ (1,4)-glucosidic lingkage เป็นส่วนใหญ่ และส่วนที่แตกสาขานั้นเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ (1,6)-glucosidic lingkage แต่ละสาขาประกอบด้วยหน่วยกลูโคสประมาณ 15-25 หน่วย สำหรับแป้งมันสำปะหลังประกอบด้วยอะไมโลสคิดเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ 17 (Swinkles, 1983) มีน้ำหนักโมเลกุลของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินประมาณ 2.1×10^4 และ 3×10^6 ดาลตัน ตามลำดับ (Peat, 1954) โดยทั่วไปเม็ดแป้งจะมีขนาดตั้งแต่ 2-100 ไมครอน

6.1 ลักษณะความหนืดที่เกิดจากแป้งละลายในน้ำร้อนและน้ำเย็น

6.1.1 การเกิดเจลาติไนเซชัน (gelatinization) ของแป้ง

เม็ดแป้งไม่ละลายในน้ำเย็น โมเลกุลของแป้งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) เป็นจำนวนมากและยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน เมื่ออยู่ในน้ำเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำและพองตัวได้เล็กน้อย (Wurzburg, 1972) เนื่องจากพันธะระหว่างโมเลกุลของเม็ดแป้งในบริเวณที่เป็นผลึก (crystalline region) มีความแข็งแรงที่จะทนต่อการละลายได้ (Osman, 1965) เมื่อให้ความร้อนกับน้ำแป้งจะไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงใดๆของเม็ดแป้ง จนกระทั่งอุณหภูมิประมาณ 60-80 องศาเซลเซียส ความร้อนจะมีผลทำให้พันธะไฮโดรเจนที่ยึดโครงสร้างในเม็ดแป้งเข้าด้วยกันแตกออกทำให้ดูดซึมน้ำได้มากขึ้น ทำให้แป้งเกิดการพองตัว มีขนาดใหญ่กว่าเดิมหลายเท่า (Osman, 1965) การพองตัวของเม็ดแป้งทำให้แป้งละลายน้ำได้ดีขึ้น แป้งเปียก (paste) จะมีความใสและความหนืดมากขึ้น ปัจจัยที่ควบคุมการพองตัวของเม็ดแป้ง คือแรงยึดระหว่างพันธะไฮโดรเจนภายในเม็ดแป้ง สำหรับแป้งมันสำปะหลังจะเกิดเจลาติไนเซชัน ที่อุณหภูมิต่ำกว่าแป้งจากธัญญพืช และ แป้งข้าวโพด

6.1.2 การเกิดรีโทรเกรเดชัน (rethogradation)

เมื่อผสมแป้งกับน้ำและนำไปให้ความร้อน แล้วปล่อยให้เย็นตัวลง โมเลกุลของอะไมโลสที่อยู่ใกล้กันจะมาเรียงตัวกันแล้วเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล ทำให้เกิดโครงสร้างใหม่ที่อุ้มน้ำได้ดี มีผลให้ความหนืดเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิเย็นลง ความแข็งแรงของโครงสร้างนี้จะสูงขึ้นอีก เรียกว่า ความหนืดสุดท้าย (final viscosity) ซึ่งปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่ารีโทรเกรเดชัน

7 ชนิดของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง

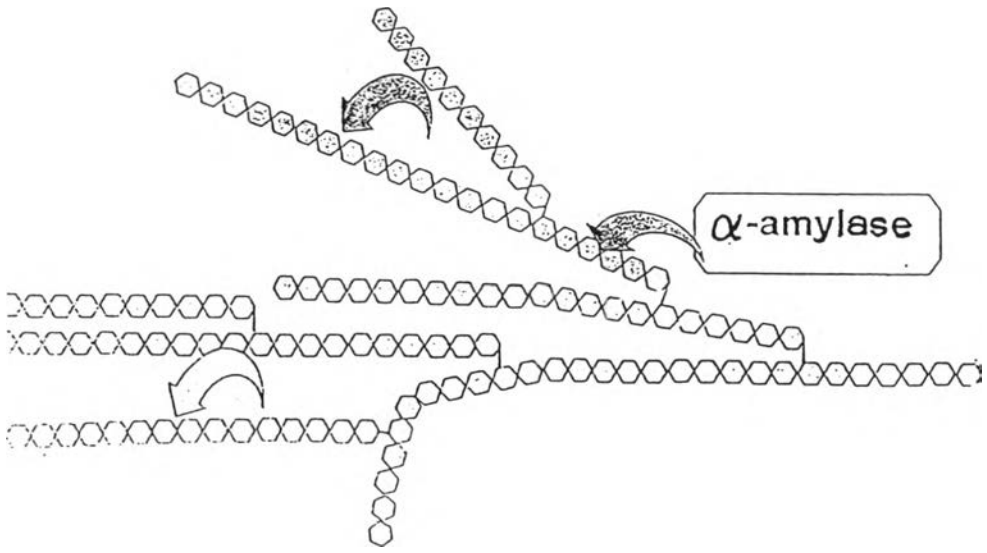
7.1 เอนไซม์กลูโคอะมิเลส

เอนไซม์กลูโคอะมิเลส หรือ α-1,4-glucan glucohydrolase หรือมีชื่ออื่น ๆ เช่น amiloglucosidase, mytase, sacoharogenic amylase และ δ - amylase จัดเป็นเอนไซม์ ประเภท exosplitting enzyme สามารถย่อยโพลีแซกคาไรด์ หรือ โอลิโกแซกคาไรด์ได้ โดยย่อยพันธะ glycosidic linkage ที่ตำแหน่ง α-1,4 และ α-1,6 จากปลายด้าน nonreducing เข้ามาเรื่อยๆให้ผลผลิตเป็นกลูโคสทีละหน่วย เอนไซม์กลูโคอะมิเลสสามารถย่อยมอลโตส, น้ำแป้ง และมอลโตไตรโอสได้เร็วมาก ย่อยซูโครส, raffinose, isomaltotetrose และ panose ได้ช้ามาก และไม่ย่อย methyl-α-D-glucopyranoside, methyl-β-D-glucopyranoside, nigarose, isomaltose dextran, cellubiose และ lactose (Birch และ Blankebrough, 1981)

7.2 เอนไซม์อัลฟาอะมิเลส

ชื่อสามัญของเอนไซม์นี้คือไดแอสเทส (diastase) ชื่อตาม Comission on enzyme คือ α-(1,4)-glucan-4-glucanohydrolase EC 3.2.1.1 เป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดอะมิเลส (endoamylase) โดยจะย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α-(1,4)-glycosidic linkgage ถ้าย่อยไม่สมบูรณ์จะได้กลูโคส มอลโตส และเดกซ์ตริน ถ้าการย่อยสมบูรณ์จะได้มอลโตส และกลูโคส เอนไซม์นี้จะไม่ย่อยสลายพันธะไกลโคไลซิลของแป้งที่ α-1-6 lingkage ในลักษณะ

ที่ตัดภายในสายโพลีเมอร์แบบเอนโดไฮโดรเลส (endohydrolase) (Whitaker, 1972) การตัดสายโพลีเมอร์ของแป้งด้วยเอนไซม์อัลฟาอะมิเลส สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงการย่อยภายในโมเลกุลของแป้งด้วยการใช้เอนไซม์อัลฟาอะมิเลส (Bernfeld, 1955)

8 การปรับปรุงสายพันธุ์ (Strain improvement)

จุลินทรีย์ที่แยกได้ตามธรรมชาติ โดยทั่วไปความสามารถในการสร้างผลิตภัณฑ์ จะถูกจำกัดโดยสารพันธุกรรม หรือ ยีนที่เป็นตัวควบคุม การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมนำมาใช้เพื่อเพิ่มผลผลิต การปรับปรุงสายพันธุ์มีหลายวิธี (Singleton และ Sainsbury, 1988) ได้แก่

8.1 การกลายพันธุ์ (Mutation) คือการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมโดยเกิดจากการเปลี่ยนแปลงชนิด จำนวน หรือลำดับของนิวคลีโอไทด์ในสารพันธุกรรม ซึ่งอาจเกิดได้เองตามธรรมชาติโดยจะมีอัตราการเกิดค่อนข้างต่ำ คือน้อยกว่า 1 ในล้านเซลล์ การกลายพันธุ์เป็นวิธีที่ง่ายสะดวกและปลอดภัยที่สุด ใช้ความรู้ทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ที่ต้องการปรับปรุงไม่มาก เทคนิคที่ใช้ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และมีราคาถูก แต่จะให้ผลแบบสุ่ม ซึ่งต้องมีการคัดเลือกเป็นจำนวนมาก

8.2 การรีคอมบิเนชัน (Recombination) คือการรวมกันของสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกันมาเชื่อมกันตรงตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน (homologus) ซึ่งวิธีการนี้ต้องอาศัยความรู้พื้นฐานทางด้านพันธุกรรมรวมทั้งคุณสมบัติ ทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาในระดับหนึ่ง

8.3 การทำโปรโตพลาสฟิวชัน (Protoplast fusion) คือการรวมโปรโตพลาสของเซลล์ที่ต่างชนิดกันเข้าด้วยกัน โดยการทำลายผนังเซลล์ออกก่อน แล้วจึงเหนี่ยวนำให้เซลล์มารวมกัน หลังจากนั้นกระตุ้นให้เซลล์สังเคราะห์ผนังเซลล์ใหม่ขึ้นมาแทน ซึ่งวิธีการดังกล่าวต้องอาศัยความรู้พื้นฐานทั้งทางด้านพันธุกรรมและทางด้านชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาระดับหนึ่ง

8.4 พันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) คือการตัดต่อยีนที่มีคุณสมบัติที่ต้องการจากเซลล์หนึ่งไปให้อีกเซลล์หนึ่งที่ต้องการให้มีคุณสมบัตินั้น โดยวิธีการดังกล่าวต้องอาศัยความรู้เกี่ยวกับพันธุกรรมของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาอย่างลึกซึ้ง เป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก อุปกรณ์ที่ใช้มีราคาแพง แต่มีประสิทธิภาพสูง

9 ชนิดของการกลายพันธุ์

9.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดเองตามธรรมชาติ (Spontaneous mutation)

เป็นการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในสารพันธุกรรมโดยวิธีทางธรรมชาติ ซึ่งอาจเกิดจากความผิดพลาดในระหว่างการแบ่งเซลล์ หรือจากปัจจัยบางอย่างที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต หรือรังสีเอ็กซ์ แต่จะเกิดในอัตราที่ต่ำมาก เช่น แบคทีเรียมีอัตราการเกิดการผ่าเหล่าตามธรรมชาติเพียงหนึ่งในหมื่นล้านถึงหนึ่งในล้านเซลล์ (10^{-10}-10^{-6}) แต่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) อัตราการเกิดการผ่าเหล่าตามธรรมชาติจะสูงขึ้นเล็กน้อยคือประมาณหนึ่งในแสน (10^{-5}) เซลล์ (สมใจ, 2537)

9.2 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยการชักนำ (Induced mutation)

เนื่องจากการเกิดการกลายพันธุ์เองตามธรรมชาติเกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำมาก ดังนั้นจึงมีการใช้สารก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และ เพื่อเพิ่มอัตราการกลายพันธุ์ให้สูงขึ้น พบว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้มากกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติประมาณ 100 เท่า การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารก่อการกลายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

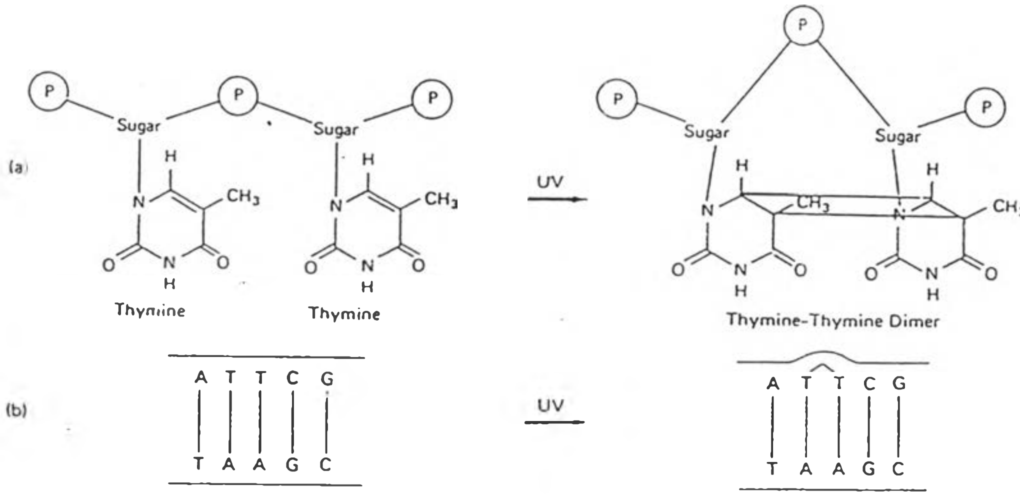
9.2.1 วิธีทางกายภาพ (Physical mutagenesis) ใช้รังสีเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ (radiation mutation) ส่วนมากเป็นรังสีที่มีคลื่นสั้นแบ่งออกเป็น

9.2.1.1 ไอออนไนซิง เรดิเอชัน(Ionizing radiation) รังสีกลุ่มนี้ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีแอลฟา รังสีเบต้า นิวตรอน ซึ่งรังสีเหล่านี้มาความสามารถในการทะลุทะลวงได้สูง สามารถทำให้สารตัวกลางแตกตัวได้ โดยพลังงานของรังสีจะไปทำลายพันธะฟอสโฟไดเอสเธอร์ (phosphodiester bond) ของสายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการตัดชิ้นส่วนของยีน ออกจากสายดีเอ็นเอสายใดสายหนึ่งหรือทั้งสองสาย (Fantini, 1975; Drake, 1970) เมื่อส่วนที่หักกลับมาต่อกันจะเกิดความผิดพลาดคืออาจกลับมาต่อกันแบบสลับข้าง สลับตำแหน่ง หรือการขาดหายไป ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ ทรานซิชัน (transition) อินเวอร์ชัน (invertion) ทรานสโลเคชัน (translocation) หรือดีลีชัน (deletion) ได้ (Hopwood, 1970)

9.2.1.2 นอนไอออไนซิง เรดิเอชัน (Non-ionizing radiation) รังสีในกลุ่มนี้ ได้แก่ แสงขาว (visible light) รังสีอินฟาเรด คลื่นไมโครเวฟ และรังสีอัลตราไวโอเลต ซึ่งรังสีกลุ่มนี้มีพลังงานต่ำกว่ารังสีในกลุ่มไอออไนซิง เรดิเอชัน จึงเป็นอันตรายน้อยกว่าแต่พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เช่นกัน

รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet light, UV) เป็นรังสีก่อการกลายพันธุ์ ทางด้านกายภาพ ที่นิยมใช้มากที่สุดในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ โดยปกติรังสี UV มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 200-400 นาโนเมตร แต่ช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีจะมีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เพราะเป็นช่วงความยาวคลื่นที่ดีเอ็นเอดูดซับรังสีได้มากที่สุด

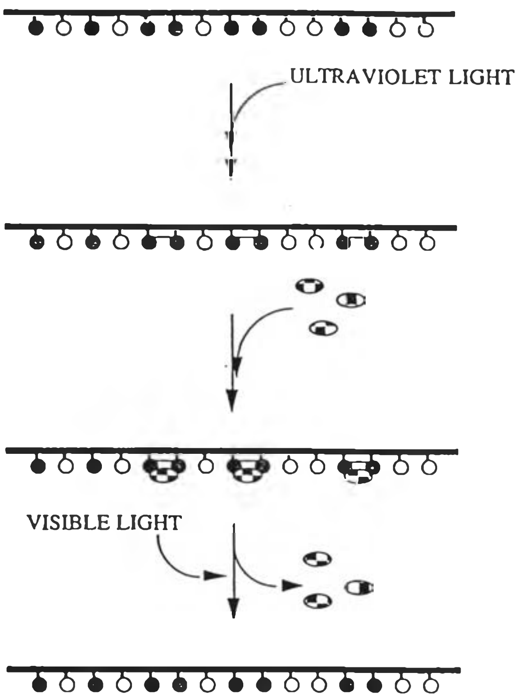
โดยรังสี UV จะมีผลทำให้เกิดพันธะระหว่างโมเลกุลของเบสไทมีน 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) เดียวกัน เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine-dimer) (รูปที่ 5) ไทมีน-ไซโตซีน ไดเมอร์ (thymine-cytosine dimer) และไซโตซีน ไดเมอร์ (cytosine-dimer) โดยพบว่าอัตราส่วนของการเกิดไดเมอร์เป็น 2:1:1 (สมใจ, 2537) มีผลทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอผิดรูป พันธะไฮโดรเจนถูกทำลาย ซึ่งทำให้เซลล์ตาย เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังพบว่า การเกิดการกลายพันธุ์ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณการฉายรังสี UV (Strickberger, 1985; Smith และ Keary, 1991)



รูปที่ 5 การเกิด ไทมีน ไดเมอร์ จากการฉายรังสี UV (Goodenough, 1984)

เมื่อเซลล์ถูกรังสี UV จะเกิด ไทมีน ไดเมอร์ บนสายดีเอ็นเอ เซลล์จะมีกลไกการแก้ไขความผิดพลาดที่เกิดขึ้น ปรากฏการณ์ที่ทำให้การเกิดไดเมอร์ สามารถกลับสู่สภาพปกติได้โดยแสงขาว (visible light) เรียกว่า โฟโตรีแอคติเวชั่น (photoreactivation) หรือโฟโตเรสโตรเรชั่น (photorestoration) เป็นการซ่อมแซมดีเอ็นเอโดยมีเอนไซม์โฟโตไลเอส (photolyase) ซึ่งทำงานโดยมีแสงเป็นตัวกระตุ้นมาตัดพันธะโควาเลนต์ ที่เชื่อมไดเมอร์ ออกจากกัน กลายเป็น โมโนเมอร์ (monomer) ของเบสไพริมิดีน (pyrimidine) กรณีที่เกิดขบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาข้างต้น จะไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ ดังนั้นในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ต้องพยายามไม่ให้สปอร์ที่ผ่านการฉายรังสี UV แล้วถูกแสงทันทีโดยการทำการทดลองในที่มืด หรือทำการทดลองภายใต้หลอดไฟสีเหลือง และต้องทำการบ่มเชื้อในที่มืดด้วย (Hopwood, 1970; Cladwell, 1995)

A



B

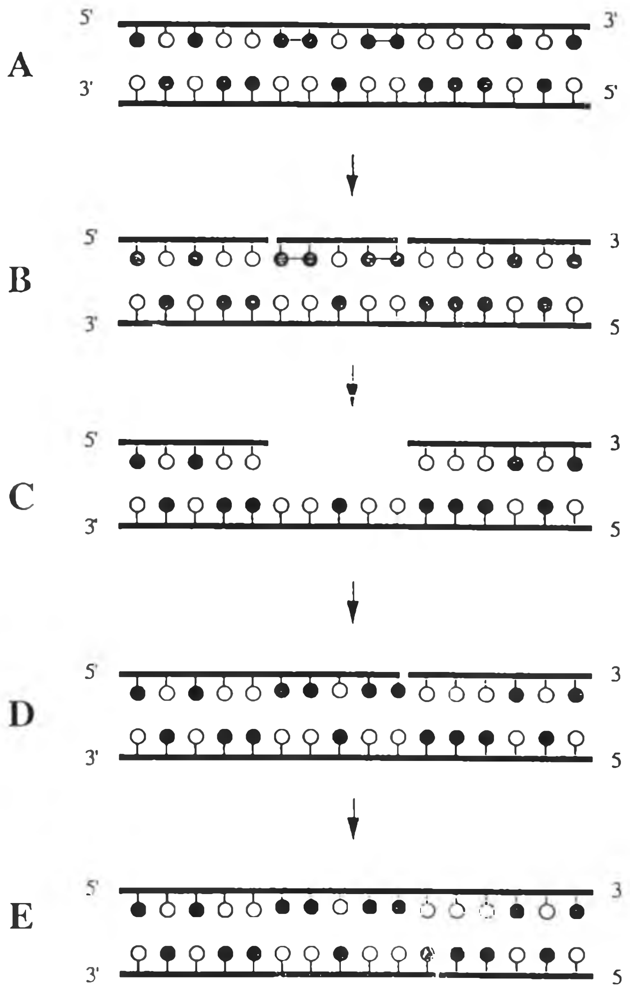
C

D

รูปที่ 6 การซ่อมแซมสายดีเอ็นเอที่ผิดปกติเนื่องจากการฉายรังสี UV ด้วยกระบวนการ โฟโตรีแอคติเวชั่น (Cladwell, 1995)

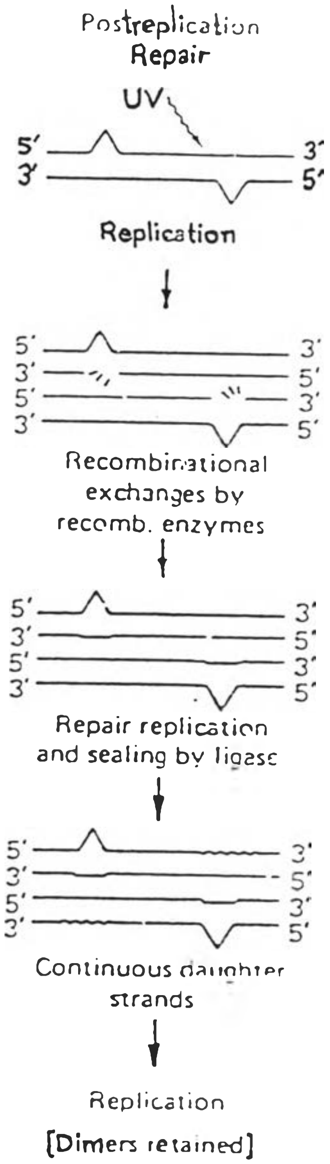
นอกจากนี้ ในที่ไม่มีแสงสว่างก็สามารถเกิดกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอได้ เรียกว่า การซ่อมแซมในที่มืด (dark repair) เรียกกระบวนการซ่อมแซมว่า เอ็กซิชันรีแพร์ (excision repair) (รูปที่ 7) โดยไทมีนไดเมอร์ จะถูกตัดออกจากดีเอ็นเอ โดยใช้เอนไซม์เอ็นโดนิวคลีเอส (endonuclease) มีผลทำให้เกิดช่องว่างก่อนตำแหน่งที่เกิดไดเมอร์ หลังจากนั้นจะมีการเติมเบสด้วยเอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) โดยใช้สายนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ที่อยู่ตรงข้ามเป็นแม่แบบ ดังนั้นจึงได้สายดีเอ็นเอที่เป็นปกติ ในกรณีนี้ก็จะไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์เช่นเดียวกัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 การซ่อมแซมสายดีเอ็นเอแบบ เอ็กซิชัน(Excision) (Cladwell,1995)

หากการซ่อมแซมทั้ง 2 แบบข้างต้นไม่ทำงานและเซลล์อยู่ในที่มืด เซลล์จะมีการซ่อมแซมดีเอ็นเออีกระบบหนึ่งเรียกว่า โพสต์เรปพิเคชัน (post replication) หรือรีคอมบิเนชันรีแพร์ (recombination repair) โดยการซ่อมแซมจะเกิดระหว่างการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ เนื่องจากเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจะหยุดการทำงานที่ตำแหน่งที่เกิดไดเมอร์ และข้ามไปทำงานอีกครั้งเมื่อพบรหัสเริ่ม (start codon) หลังไดเมอร์นั้นออกไปทำให้สายนิวคลีโอไทด์ที่สร้างใหม่เกิดช่องว่าง (gap) แต่สายนิวคลีโอไทด์ที่เกิดช่องว่างนี้ สามารถใช้สายนิวคลีโอไทด์อีกเส้นหนึ่งที่ถูกสังเคราะห์มาพร้อมๆ กัน เป็นต้น แบบในการสังเคราะห์ส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่หายไปแทนเพื่อซ่อมแซมช่องว่างที่เกิดขึ้นได้ (Singleton และ Sainsbury, 1988 ; Cladwell, 1995) ดังแสดงในรูปที่ 8

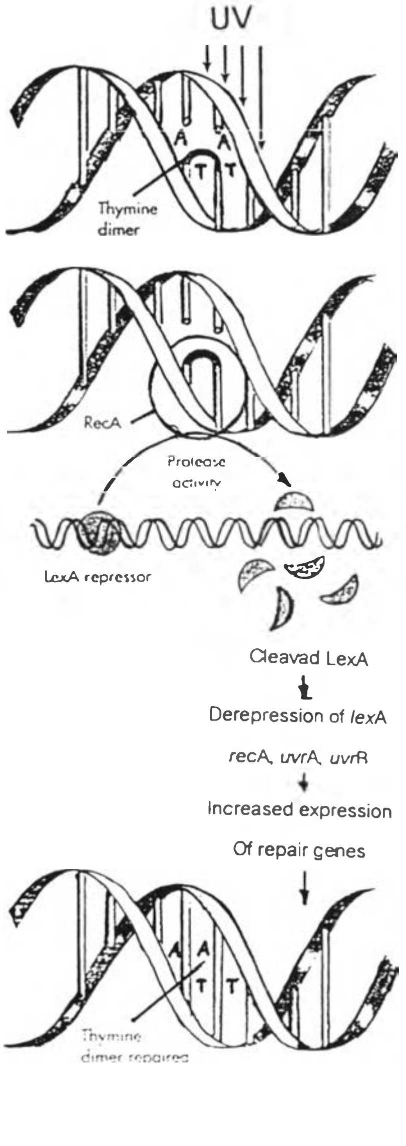


รูปที่ 8 การซ่อมแซมสายดีเอ็นเอแบบโพสต์เรปพิเคชั่น (Goodenough , 1984)

ดังนั้นจุลินทรีย์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV มีโอกาสเกิดการย้อนกลับ (reverse) เป็นสายพันธุ์เดิม เมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานๆ

กรณีที่เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมเนื่องจากการชักนำด้วยรังสี UV เกิดจากเมื่อเกิดไดเมอร์ขึ้น บริเวณนั้นจะไม่สามารถจับกันเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double helix) เนื่องจากเบสไทมีนไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับเบสอะดินีนในสายนิวคลีโอไทด์สายตรงข้ามได้ พบว่าบริเวณไดเมอร์นี้จะเป็นตำแหน่งที่ไม่แอคทีฟ และเมื่อเกิดการถอดรหัส (transcription) มาถึงบริเวณนี้การถอดรหัสจะหยุดไป

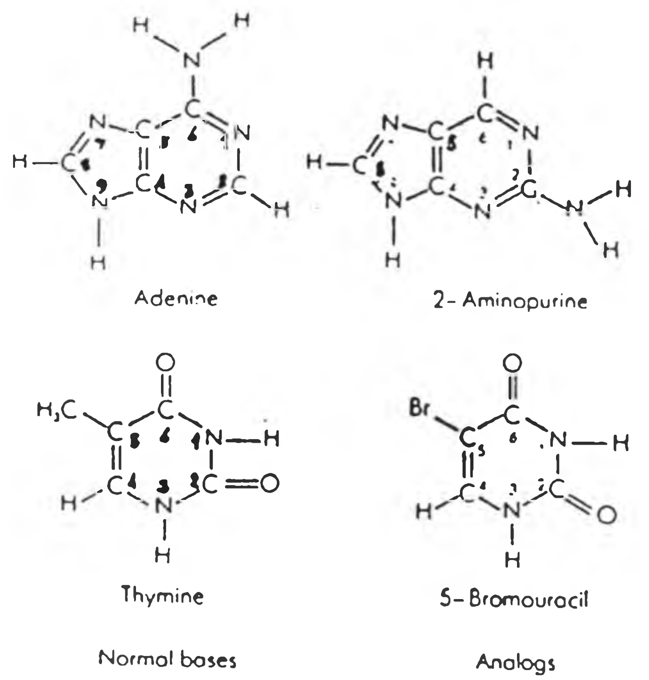
หรืออีกกรณีหนึ่งเกิดจาก ความผิดพลาดในการซ่อมแซม ซึ่งเป็นกระบวนการตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต เรียกว่ากระบวนการซ่อมแซมเอสโอเอส (SOS repair) (รูปที่ 9) เป็นการซ่อมแซมที่เกิดขึ้นหลังจากมีการแยกสายดีเอ็นเอออก ในขณะจำลองตัวเอง และเมื่อมีการอ่านรหัสมาถึงบริเวณนี้ เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจะนำเบสมาเติมบริเวณที่ขาดไปแบบสุ่ม และใช้ดีเอ็นเอสายที่ซ่อมแซมแล้วเป็นแม่แบบแทน มีผลทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนเดิม



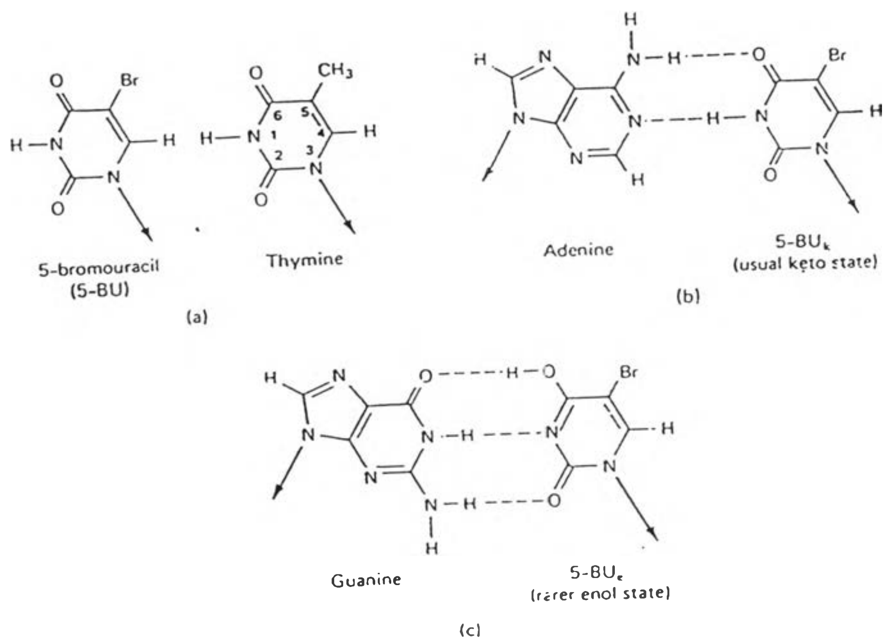
รูปที่ 9 กระบวนการ SOS repair (Atlas ,1995)

9.2.2 วิธีทางเคมี (Chemical mutagenesis) สารเคมีที่นำมาใช้เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ มีกลไกที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แตกต่างกันไป แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ตามลักษณะการทำงานคือ

9.2.2.1 เบสอนาลอก (Base analogs) เป็นการแทนที่ของสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายเบสในดีเอ็นเอ เช่น 2-อะมิโนเพียวรีน (2-aminopurine) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายอะดีนีน (adenine) และ 5-โบรโมยูราซิล (5-bromouracil) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายไทมีน (thymine) (รูปที่10) เมื่อมีสารเหล่านี้ไปแทนที่ดีเอ็นเอเบสในขณะที่มีการจำลองตัวของดีเอ็นเอ จะทำให้เกิดการจำลองตัวผิดเพราะสารเหล่านี้ไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้เหมือนในเบสปกติ ดังนั้นกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอซึ่งต้องอาศัยความจำเพาะของเบสและการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบส จึงไม่สามารถเกิดขึ้นได้ตามปกติ และส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ (สมใจ, 2537) รูปที่ 11 เป็นตัวอย่างการแทนที่ของ 5-โบรโมยูราซิล ซึ่งจะไปแทนที่ไทมีน โดยมีบางภาวะที่ 5-โบรโมยูราซิล จะถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (tautomeric shift) จากรูปคีโตนไปอยู่ในรูปอีนอล ทำให้สามารถเกิดพันธะกับกัวนีนได้



รูปที่ 10 ตัวอย่างสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายเบสในดีเอ็นเอ (สมใจ , 2537)



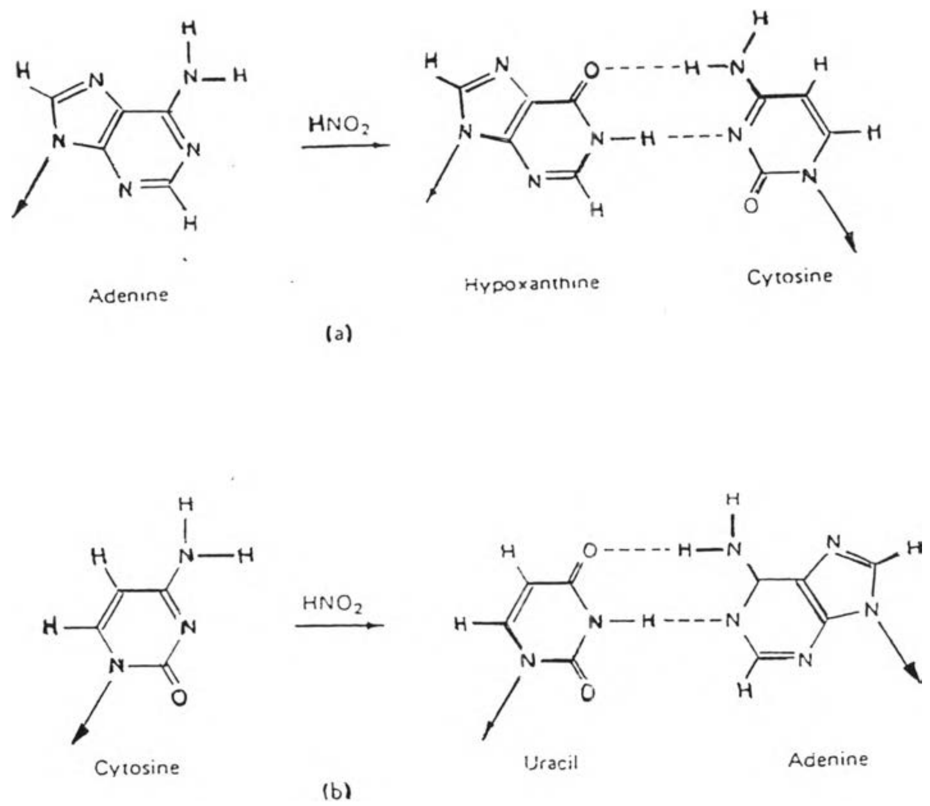
รูปที่ 11 คุณสมบัติการแทนที่ดีเอ็นเอเบสของ 5-โบรโมยูราซิล(Aver, 1984)

(a) การเกิดพันธะระหว่างโมเลกุล 5-โบรโมยูราซิลในรูปคีโตนกับอะดินีน

(b) การเกิดพันธะระหว่างโมเลกุล 5-โบรโมยูราซิลในรูปอีนอลกับกัวนีน

9.2.2.2 อินเตอร์คาเลทิงเอเจนท์ (Intercalating agent) เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลแบบราบเป็นวง (aromatic) 3 วงประกอบกัน และ สามารถสอดแทรกเข้าไปในระหว่างคู่เบสที่อยู่ตรงกลางของดีเอ็นเอเกลียวคู่ได้ ทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอฉีกขาดและเกิดความผิดปกติในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในระหว่างการถ่ายทอดพันธุกรรม หรือทำให้เกิดการตัดทิ้ง และทำให้เกิดเฟรมชิปมิวเตชัน จนเป็นผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ตัวอย่างสารเคมีในกลุ่มนี้ได้แก่ 9-อะมิโนอะคริดีน (9-aminoacridine) เอทธิเดียมโบรไมด์ (ethidiumbromide) โปรฟลาวิน (proflavin) และไนโตรเจนมัสตาด (nitrogen mustard) เป็นต้น

9.2.2.3 กรดไนตรัส (Nitrus acid) เป็นสารเคมีที่สามารถทำปฏิกิริยากับเบสในดีเอ็นเอ แล้วมีผลให้โครงสร้างของเบสผิดปกติไปจากเดิมได้โดยกรดไนตรัสจะไปทำปฏิกิริยาตัดกลุ่มอะมิโนในโมเลกุลของดีเอ็นเอเบสแล้วเติมออกซิเจนลงไป (oxidation) ซึ่งจะส่งผลให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเบส เปลี่ยนแปลงจากอะดีนีนเป็นไฮโปแซนทีน (hypoxanthin) ไซโตซีนเป็นยูราซิล และกัวนีนเป็นแซนทีน เมื่อเกิดการถ่ายทอดพันธุกรรม ไฮโปแซนทีนจะจับคู่กับไซโตซีน ยูราซิลจะจับคู่กับอะดีนีน ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ (Redei, 1982)



รูปที่ 12 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยกรดไนตรัส (Aver, 1984)

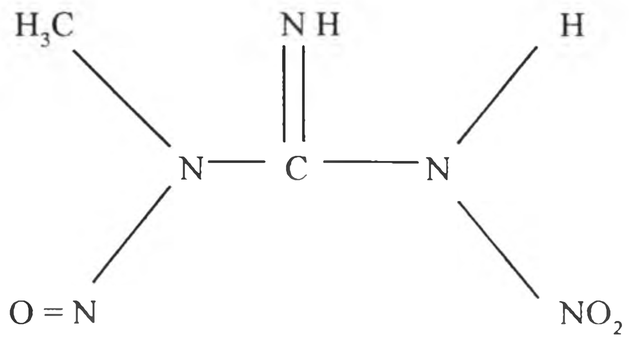
(a) การเกิดปฏิกิริยาระหว่างอะดีนีนกับกรดไนตริก ได้ไฮโปแซนทีน และการเกิด พันธะระหว่างไฮโปแซนทีนกับไซโตซีน

(b) การเกิดปฏิกิริยาระหว่างไซโตซีนกับกรดไนตริก ได้ยูราซิล และการเกิดพันธะระหว่างยูราซิลกับอะดีนีน

9.2.2.4 อัลคีเลติงเอเจนท์ (Alkylating agent) เป็นสารที่ก่อการกลายพันธุ์โดย จะใช้ส่วนอัลคิล (alkyl) เช่นเมธิล (methyl, CH_3) เอธิล (ethyl, CH_3CH_2) หรือ อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน(aliphatic hydrocarbon group) อื่นๆ จับที่ตำแหน่งต่างๆของดีเอ็นเอเบส ทำให้การจับคู่ของดีเอ็นเอนั้นผิดพลาด ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ได้แก่ ไนโตรเจนซัลเฟอร์มัสตาด (nitrogen sulfer mustard) เอธิลอีเธนซัลโฟเนต (ethyl ethane sulfonate, EES) เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate, EMS) และ เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG, MNNG, NG) (Drake, 1970; Aver,1984)

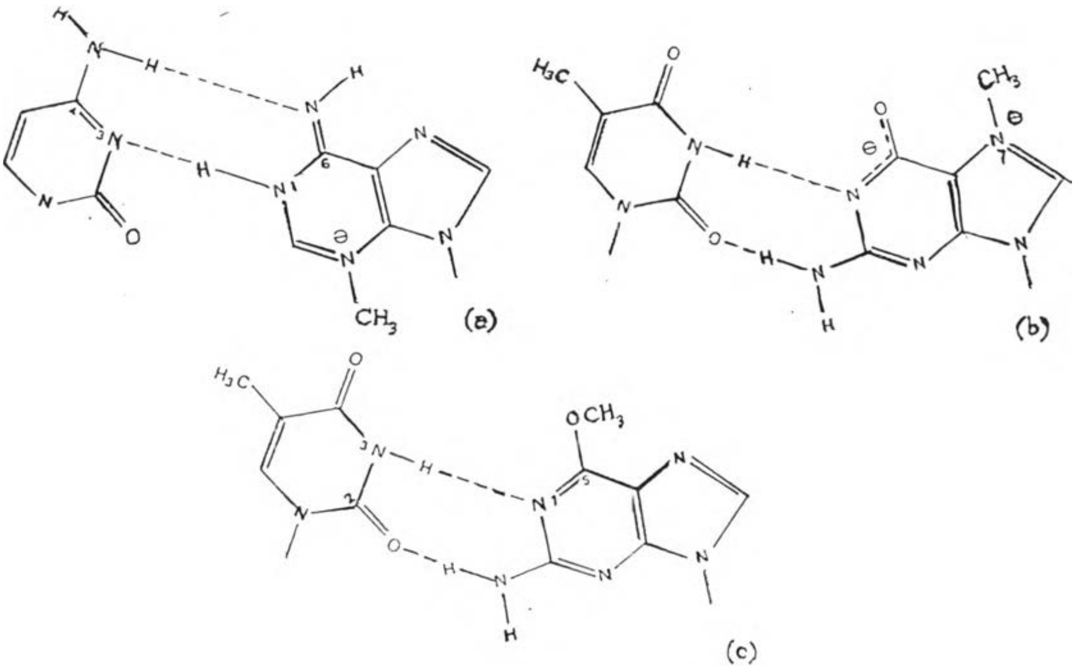
NTG เป็นสารประกอบที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ทั้งในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงและชั้นต่ำเพราะเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูง โดยส่วนมากนิยมใช้เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในขั้นที่ 2 (secondary mutation)(Miller, 1972)

NTG สังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกโดย Mckay และ Wright ในปี ค.ศ. 1947 จากปฏิกิริยาไนโตรเซชัน (nitrosation) ของ เมธิลไนโตรกัวนีดีน (methylnitroguanidine) และโซเดียมไนไตรต์ (sodium nitrite) NTG มีสูตรเคมีเป็น $C_2H_5N_5O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 147.10 มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง จุดหลอมเหลว 118 องศาเซลเซียส จุดเดือด 123.5 องศาเซลเซียส โครงสร้างทางเคมีของ NTG ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 โครงสร้างทางเคมีของ NTG (Mckay and Wright, 1947)

การทำงานของ NTG ต้องมีการแตกตัวจึงจะมีสมบัติเป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ในสภาวะที่เป็นกรด NTG จะแตกตัวให้กรดไนตรัส ส่วนในสภาวะที่เป็นด่างจะแตกตัวให้ไดอะโซมีเทน (diazomethane, CH_2N_2) NTG จะทำปฏิกิริยาโดยการชักนำให้เกิดการเติมหมู่อัลคิล 1 หมู่ให้กับเบส แล้วชักนำให้คู่เบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง เข้ามาอยู่แทนที่คู่เบสที่ปกติในระหว่างการจำลองตัวเอง ทำให้เบสบนสายดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลงไป การเติมหมู่อัลคิลจะเกิดที่ตำแหน่งไนโตรเจนหรือออกซิเจนของเบสแต่ละชนิด เช่น การเติมหมู่เมธิลที่ตำแหน่ง N-3 ของอะดินีน กลายเป็น N^3-เมธิลอะดินีน (N^3-methyladenine) หรือไฮโปแซนทีน ซึ่งจะสามารถจับกับไซโตซีนแทนกัวนีน การเติมหมู่เมธิลที่ตำแหน่ง N-7 ของ กัวนีน กลายเป็น N^7-เมธิลกัวนีน (N^7-methylguanine) หรือแซนทีน (Craddock, 1969) หรือเติมเมธิลที่ตำแหน่ง O-6 ของกัวนีน กลายเป็น O^6-เมธิลกัวนีน (O^6-methylguanine) ซึ่งสามารถไปจับกับไทมีนแทนอะดินีน เป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ (รูปที่14) (Singleton และ Sainbury, 1988) พบว่าการกลายพันธุ์ด้วย NTG ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์มักเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก GC ไปเป็น AT ประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ขึ้นกับค่าความเป็นกรดด่างขณะที่ทำปฏิกิริยา และสันนิษฐานว่า NTG จะมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้สูง ในขณะที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัวเพราะ NTG จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอที่กำลังจำลองตัวเองในกระบวนการถอดรหัส (Miller, 1972)



รูปที่ 14 โครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเอเบสเมื่อทำปฏิกิริยากับ NTG (Redei, 1982)

NTG เป็นสารที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เนื่องจากเป็นสารที่ให้ความถี่ในการกลายพันธุ์สูงในขณะที่มีการตายน้อย พบว่าที่ช่วงความเข้มข้นของ NTG ที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดอยู่ระหว่าง 0-50 เปอร์เซ็นต์ จะมีสปอร์ที่กลายพันธุ์แล้วเป็นจำนวนมาก (Miller, 1972; Fantini, 1975) ปัจจัยสำคัญของการใช้ NTG เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์คือ ความเข้มข้นที่ใช้ โดยยิ่งความเข้มข้นของ NTG สูงเปอร์เซ็นต์การรอดของสปอร์ยิ่งต่ำลง นอกจากนี้ยังพบว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สาร NTG สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้สูงกว่าวิธีการทางธรรมชาติถึง 10,000 เท่า และให้ผลการดีกว่าการใช้รังสี UV และรังสีเอ็กซ์ ถึง 10-100 เท่า (Sinha และ Chattoo, 1975) NTG สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงและชั้นต่ำ ดังนั้นในขณะที่ทำการทดลองควรทำด้วยความระมัดระวังอย่างสูง

10 รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดมะนาว

การผลิตกรดมะนาวระยะเริ่มแรก จะผลิตโดยการสกัดออกมาจากผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะนาว ต่อมาพบว่ารา *Penicillium* sp. สามารถผลิตกรดมะนาวได้ (Wehmer, 1903) และต่อมาพบว่า *Aspergillus niger* เป็นราที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวมากที่สุด และมีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตด้วยการปรับปรุงสายพันธุ์มาก (Bigelis และ Arora, 1992)

James และคณะ (1956) ได้เสนอวิธีการแยกเชื้อกลายพันธุ์ของรา *A. niger* ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง โดยการเลี้ยงราที่เป็นเชื้อกลายพันธุ์บนกระดาษกรองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาล เกลือแร่และโบรโมคลีซอลกรีน พบว่าขนาดของบริเวณกรดจะสัมพันธ์กับผลที่ได้จากการหมัก

Gardner และคณะ (1956) รายงานการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *A. niger* โดยใช้รังสีเอ็กซ์และรังสี UV เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่าสามารถปรับปรุงคุณภาพของการผลิตกรดมะนาวได้สูงเป็น 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่ราสายพันธุ์ตั้งต้นสามารถผลิตกรดมะนาวได้เพียง 21 เปอร์เซ็นต์

Hannan และคณะ (1973) ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *A. niger* ด้วยการใช้รังสีแกมมาเป็นตัวชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงถึง 110-118 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมผลิตได้ 29 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

Voraputhaporn และคณะ (1985) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยวิธีการหมักในอาหารเหลวโดยใช้ *A. niger* ในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 2.5 ลิตร และแป้งมันสำปะหลังซึ่งผ่านการย่อยบางส่วนด้วยเอนไซม์อะมิเลส ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าความสามารถในการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงกว่าในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยจะให้ผลผลิตสูงสุด 85.5 กรัมต่อลิตร เมื่อหมักนาน 7 วัน

ศยามล (2534) ทำการทดลองคัดแยกราจากทั้งหมด 12 สายพันธุ์และพบว่าสายพันธุ์ที่กำหนดรหัสเป็น A185 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงที่สุด และเมื่อนำมาเลี้ยงในระดับขวดเขย่าพบว่าสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 120 กรัมต่อลิตร โดยการใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 450 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นวัตถุดิบเริ่มต้น

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าในการผลิตกรดมะนาวด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลวนิยมใช้น้ำตาลและแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นวัตถุดิบเริ่มต้น ขณะที่การผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังโดยตรงยังไม่มี เนื่องจาก

Moyer (1953) พบว่าการผลิตกรดมะนาวจากแป้งด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลวโดย *A. niger* มักให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ แต่พบว่าถ้าใช้แป้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ จะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูง สาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตกรดมะนาวจากแป้งโดย *A. niger* มีระดับต่ำเนื่องจาก *A. niger* ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวส่วนใหญ่มีความสามารถในการใช้แป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ต่ำ (Usami และ Taketomi, 1960; Rugsaseel และคณะ, 1993) โดยพบว่า *A. niger* ที่ใช้สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ต่ำขณะที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส (protease) ได้สูง ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสที่ *A. niger* ผลิตขึ้นมีอิทธิพลที่สำคัญต่อเอนไซม์ย่อยแป้ง ดังรายงานต่างๆสนับสนุนดังต่อไปนี้

ในปี 1981 Hayashida และ Flor พบว่า *A. awamori* สายพันธุ์ *kawachi* ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์แล้วด้วยรังสี UV และ NTG สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งชนิด กลูโคอะมิเลส (glucoamylase)แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส จะมีความสามารถในการดูดซับและย่อยแป้งดิบได้มีประสิทธิภาพสูง ตรงข้ามกับเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้เช่นกัน แต่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ด้วย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการดูดซับและย่อยแป้งดิบได้ต่ำ

ปี 1992 Fukuda และคณะได้ทำการกลายพันธุ์ *A. awamori* สายพันธุ์ *kawashi* โดยใช้ NTG พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์กลูโคซิเดส (glucosidase) ได้ โดยที่เอนไซม์กลูโคอะมิเลสที่ผลิตขึ้นนี้จะมีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตอยู่ในโมเลกุลเป็นจำนวนมากและมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 110,000 นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งข้าวโพดดิบสูงกว่าเอนไซม์กลูโคอะมิเลสที่ได้จากสายพันธุ์ตั้งต้น

ปี 1994 Sarangbin และคณะ ได้ทำการทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็นออโตดิพลอยด์ (autodiploid) จาก *A. niger* สายพันธุ์ WU-2223L โดยใช้โคชิซิน (colchicine) พบว่าออโตดิพลอยด์ที่ได้มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้ 67.2 กรัมต่อลิตรในขณะที่สายพันธุ์ตั้งต้นผลิตได้ 62.0 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดมะนาวโดยใช้แป้ง (soluble starch) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าออโตดิพลอยด์สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 49.6 กรัมต่อลิตรซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นถึง 1.4 เท่า เมื่อนำมาตรวจสอบระดับเอนไซม์กลูโคอะมิเลส พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ตั้งต้นกับออโตดิพอยด์ แต่ระดับของเอนไซม์โปรติเอส (acid protease) ของออโตดิพลอยด์นั้นสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น เมื่อทดลองเติมเพบสแตติน (pepstatin) ซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติยับยั้งการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่า ระดับเอนไซม์กลูโคอะมิเลสในออโตดิพลอยด์สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตกรดมะนาวเมื่อเติมสารดังกล่าวจะสูงกว่าเมื่อไม่มีการเติมสารนี้

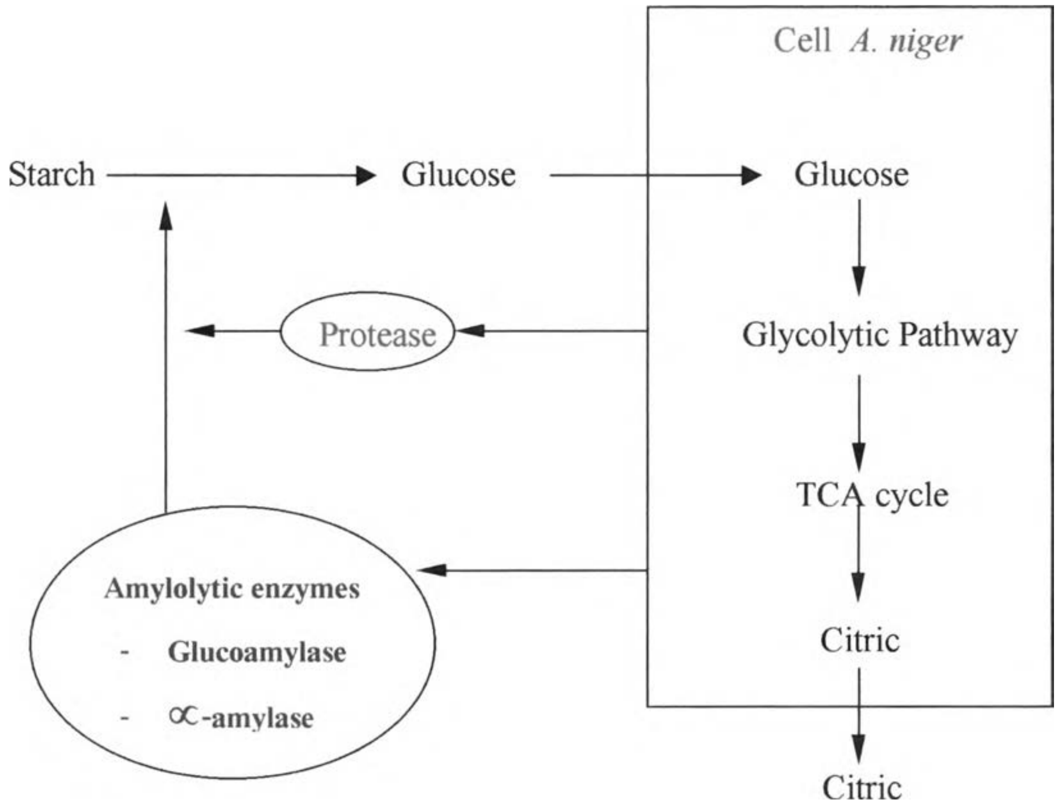
จากงานวิจัยของ Rugsaseel และคณะ (1993) ที่ผ่านมา ได้ทำการกลายพันธุ์ *A. niger* สายพันธุ์ WU-2223L โดยใช้รังสี UV แล้วคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย โดยอาศัยสมบัติที่

สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและกรดได้สูง พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 48.0 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สายพันธุ์ตั้งต้นผลิตได้ 35.1 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แป้ง (soluble starch) เป็นแหล่งคาร์บอนและเมื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์กลายเป็น 3.62 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ที่ได้จากสายพันธุ์ตั้งต้นเป็น 2.11 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งในงานวิจัยนี้ยังไม่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์โปรติเอส

มันสำปะหลังจัดเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญมากของประเทศไทย ไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกมันสำปะหลังรายใหญ่ที่สุดในโลก เนื่องจากมันสำปะหลังมีราคาค่อนข้างต่ำปัจจุบันได้มีการรณรงค์ให้ทำการวิจัยเพื่อแปรรูปมันสำปะหลังจากรูปวัตถุดิบไปเป็นผลผลิตที่มีคุณค่าและราคาสูงขึ้น (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2538)

การผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังโดย *A. niger* น่าจะเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มคุณค่าผลผลิตมันสำปะหลังอย่างมีประสิทธิภาพ ถึงแม้ว่าปัจจุบันประเทศไทยมีการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังในระดับอุตสาหกรรมแล้ว แต่การผลิตจะใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ในขณะที่ยังไม่มีการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังโดยตรง

เนื่องจากในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาว ซึ่งแป้งจะถูกย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ย่อยแป้ง (amylolytic enzyme) ได้แก่เอนไซม์กลูโคอะมิเลส และเอนไซม์อัลฟาอะมิเลส ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส จากนั้นน้ำตาลกลูโคสที่ได้จะถูกนำเข้าสู่เซลล์ แล้วผ่านกระบวนการไกลโคไลซีสได้เป็นกรดไพรูวิคหลังจากนั้นกรดไพรูวิคจะเข้าสู่วัฏจักรเครบ ได้เป็นกรดมะนาว แต่จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเมื่อเลี้ยง *A. niger* ในภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวจากแป้ง พบว่าไม่เพียงแต่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งแต่ยังสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตขึ้นนั้นจะไปย่อยเอนไซม์ย่อยแป้งทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้งลดลง จึงเป็นผลให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่จะนำเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งต้นตอในการผลิตกรดมะนาวลดลง ส่งผลให้กรดมะนาวซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการลดลงด้วย ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15 แผนภาพแสดงขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งเป็นกรดมะนาว รวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง

ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลัง จึงจำเป็นต้องปรับปรุงสายพันธุ์ *A. niger* ให้สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนได้ดีขึ้นนั่นคือต้องคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายของ *A. niger* ที่สามารถผลิตกรดมะนาวและเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูง แต่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำ ในภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวโดยใช้แป้งมันปะหลังเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลว ซึ่งจะใช้วิธีการกลายพันธุ์ ปรับปรุงสายพันธุ์ *A. niger* WU-2223L ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงในกระบวนการหมักในอาหารเหลว (Usami และ Taketomi, 1960) เป็นสายพันธุ์ตั้งต้น และใช้รังสี UV และสารเคมี เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrisoguanidine, NTG, MNNG, NG) เป็นตัวชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย ที่มีคุณสมบัติผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำ ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดได้

สูงบนอาหารที่ใช้คัดเลือก เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L โดยความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะคัดเลือกจากการงอกของสปอร์ในอาหารสูตร SL ที่มีเคซีนเป็นแหล่งพลังงานในระยะเวลาที่พบว่าสปอร์ของ WU-2223L งอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์แล้วกรองสปอร์ที่งอกทิ้งเพราะคาดว่าสปอร์ดังกล่าวเป็นสปอร์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูง (Fukuda และคณะ, 1992) ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งจะคัดเลือกบนจานอาหารแข็งที่ใช้แป้งดิบเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้เพราะจากงานวิจัยของ Hayashida และ Flor (1981) พบว่าเชื้อที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ดีจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำและจะผลิตเอ็นไซม์ย่อยแป้งสูง ส่วนความสามารถในการผลิตกรดจะคัดเลือกบนจากอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 14 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้เพราะมีรายงานว่าสปอร์ของ *A. niger* ที่งอกได้เร็วบนอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำตาลค่านี้จะมี glycolytic capacity สูง คุณสมบัติดังกล่าวเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการทำให้เชื้อนั้นผลิตกรดมะนาวได้สูงด้วย ดังนั้นคาดว่าเมื่อใช้ขั้นตอนการคัดเลือกข้างต้นจะสามารถคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังได้สูงขึ้นรวมทั้งผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงแต่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำ ภายใต้ภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดเลือก *A. niger* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังโดยวิธีการหมักในอาหารเหลวได้สูงและขณะเดียวกันผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงแต่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำ ซึ่งจะเป็นพื้นฐานเบื้องต้นที่สำคัญสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตหรือการเพิ่มผลผลิตของกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังในระดับขยายส่วนต่อไป

ขั้นตอนการวิจัย

1. ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของ *A. niger* WU-2223L ต่อการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังโดยวิธีการหมักในอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า

2. ปรับปรุงสายพันธุ์ *A. niger* WU-2223L เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลัง ด้วยการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตสลับกับการใช้สารเอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน แล้วคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความ

สามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสลดลง แต่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ในอาหารที่ใช้สำหรับคัดเลือกเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

3. ทดสอบความสามารถในการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังโดยวิธีการหมักในอาหารเหลวด้วยเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ พร้อมทั้งตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและเอนไซม์โปรติเอสที่สร้างขึ้นภายใต้ภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว

I19245217X