บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิด และทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 การหมัก

การหมัก (Fermentation) เป็นกระบวนทางชีวเคมีภายในเซลล์ เพื่อสร้างพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ด้วยเอนไซม์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้ และตัวรับอิเล็กตรอน การหมักในทางจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม หมายถึงกระบวนการผลิตผลผลิตใด ๆ ก็ตามที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวนมาก (Mass culture) ซึ่งครอบคลุมทั้งกระบวนการแบบใช้ และไม่ใช้ออกซิเจน ในขณะที่การหมักทางชีวเคมี หมายถึงเฉพาะกระบวนการแบบไม่ใช้ออกซิเจนเท่านั้น (สมใจ ศิริโภค. 2537)

1. ประเภทของการหมัก

1) การหมักแบ่งตามผลผลิตได้เป็น 4 ชนิด (สมใจ ศิริโภค. 2537) ได้แก่

(1) ผลผลิตเป็นตัวเซลล์ (Microbial cell) เช่น การผลิตยีสต์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบ (Bakers' yeast) การผลิตเซลล์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์ และสัตว์ (Single cell protein, SCP)

(2) ผลผลิตเป็นเอนไซม์ (Microbial enzyme) ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) เอนไซม์ไลเปส (Lipase) เอนไซม์โปรตีเอส (Proteases) เป็นต้น

(3) ผลผลิตเป็นสารเมทาบอไลท์ (Microbial metabolite) อาจจะเป็นสารเมทาบอไลท์ปฐมภูมิ (Primary metabolite) เช่น เอทานอล บิวทานอล ไลซีน วิตามิน เป็นต้น จุลินทรีย์จะผลิตสารเหล่านี้ขึ้นในช่วง Log phase และสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึมปฐมภูมิ ซึ่งพบในจุลินทรีย์บางชนิดในช่วง Stationary phase ของการเจริญ แต่มีความสำคัญ เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโต (Growth promoter) หรือมีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรค เป็นต้น

(4) เกิดการเปลี่ยนรูปของสารประกอบที่เติมลงไป (Transformation process) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบให้อยู่ในรูปที่คล้ายกัน แต่มีราคาสูงขึ้นเช่น กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู (การเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดน้ำส้ม) การผลิตยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

2) การหมักแบ่งตามความต้องการอากาศหรือออกซิเจนได้เป็น 2 ชนิด (ตะวัน ฉัตรสูงเนิน. 2546) ได้แก่

(1) Aerobic fermentation เป็นการหมักที่ต้องการอากาศ เช่น การหมักกรดซิตริก และกรดน้ำส้ม เป็นต้น

(2) Anaerobic fermentation เป็นการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจน เช่น การหมักอะซิโตน และบิวทานอล

3) การหมักแบ่งตามสภาพการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อได้เป็น 3 ชนิด (ตะวัน ฉัตรสูงเนิน. 2546) ได้แก่

(1) Septic fermentation เป็นการหมักในสภาพเปิดไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

(2) Semi-septic fermentation เป็นการหมักในสภาพปิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจากภายนอก แต่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ

(3) Aseptic fermentation เป็นการหมักในสภาพปิดที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อทั้งหมด

4) การหมักแบ่งตามลักษณะหรือปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็น 2 ชนิด (ตะวัน ฉัตรสูงเนิน. 2546) ได้แก่

(1) การหมักบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation)

(2) Submerge state fermentation เป็นการหมักที่ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเหลว

5) การหมักแบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้ ได้เป็น 3 ชนิด (ตะวัน ฉัตรสูงเนิน. 2546) ได้แก่

(1) การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) ทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้นปริมาณจำกัดเมื่อใส่จุลินทรีย์เพาะเลี้ยงลงไปในระบบแบบต่อเนื่องแล้วจะไม่มีการเติมสารใด ๆ ลงไปอีก

(2) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) โดยมีการเติมอาหารใหม่ และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา จึงทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง โดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอาหาร

(3) Fed-batch fermentation เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะ ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญ และใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก การหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้เพื่อแก้ปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัดในเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งถ้าใช้มากไปอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ หรืออาจทำให้มีปัญหาในการให้ออกซิเจนในปริมาณที่เพียงพอ

2. ขั้นตอนของการเตรียมการหมัก (Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J. 1995)

ในการเตรียมการหมักโดยทั่วไป ประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 6 ขั้นตอน ดังนี้คือ

1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งที่ใช้ในการผลิตเชื้อเริ่มต้น และใช้ในกระบวนการหมัก

2) การทำอาหารเลี้ยงเชื้อ ถังหมัก และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง ให้ปราศจากเชื้อ

3) การผลิตเชื้อเริ่มต้นที่บริสุทธิ์ และว่องไว (Active) ในปริมาณที่มากพอสำหรับการหมัก

4) การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมัก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารที่ต้องการ

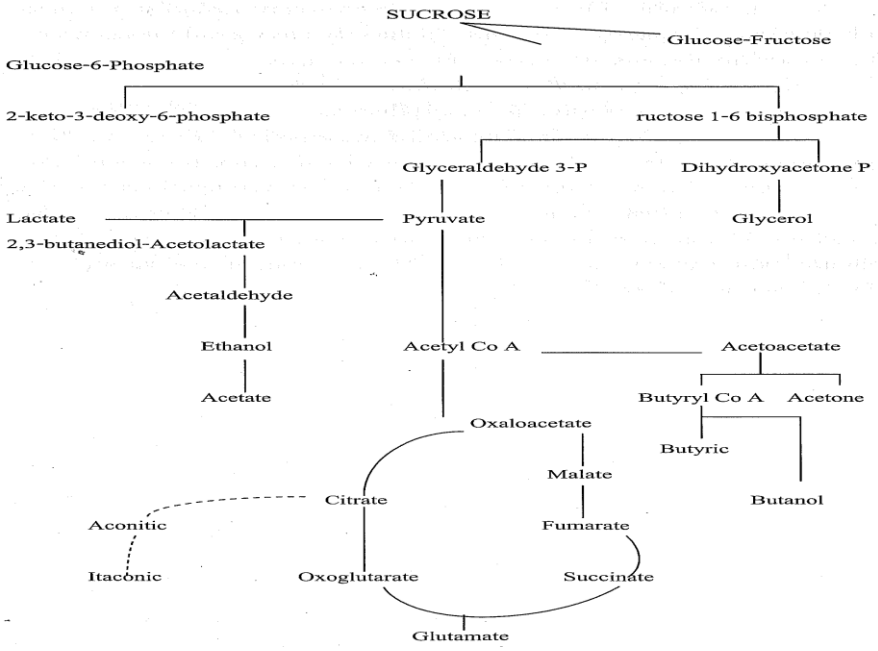
5) การสกัดผลผลิต และการทำให้บริสุทธิ์

6) การกำจัดของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการทั้งหมด

3. กลไกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก

การหมักในปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (Oxidition-reduction) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการใช้สารประกอบอินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักขึ้น และสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Medium) ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลายชนิดมาจากกระบวนการเมตาบลิซึม (Metabolism) ของน้ำตาล ดังแผนภูมิที่ 1

แผนภูมิที่ 1 ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการหมัก



ที่มา: Coombs. 1987 อ้างถึงใน จารุวรรณ มณีศรี. 2550

สภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในการสร้างสารต่าง ๆ ให้ได้ปริมาณมากนั้น สารบางชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคทั้งคน และสัตว์ ได้แก่ บางชนิดสามารถใช้เป็นสารตั้งต้น (Precursor) ในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ใช้เป็นตัวทำละลาย (Solvent) หรือใช้ประโยชน์ เพื่อเป็นวัตถุดิบ และการเปลี่ยนวัตถุดิบไปเป็นผลิตภัณฑ์ตัวใหม่ โดยจุลินทรีย์สามารถเขียนเป็นปฏิกิริยาทั่วไปได้ดังนี้ (จารุวรรณ มณีศรี. 2550)

วัตถุดิบ/สับสเตรต + จุลินทรีย์ ⟶ ผลิตภัณฑ์ใหม่

(Raw material/substrate) (Microorganisms) (New products)

4. ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก

การหมักเป็นกระบวนการแปรรูปโดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปรับสภาวะของอาหารให้เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการ แต่ไม่เหมาะสมกับการเจริญ และเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ชนิดที่เป็นอันตราย และชนิดที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย และยังทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสหรือลักษณะที่ต้องการ (มลศิริ วีโรทัย และปาริฉัตร หงส์ประภาส. 2542) โดยผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักมีดังนี้

1) ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และสัตว์น้ำ เช่น ไส้กรอกอีสาน แหนม ปลาร้า น้ำปลา น้ำบูดู เชื้อแบคทีเรียจะทำหน้าที่เปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นกรดแลคติก ซึ่งจะทำให้อาหารมีรสเปรี้ยว และความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ไม่เหมาะกับการเจริญ และเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ทั้งที่เป็นอันตราย และทำให้อาหารเน่าเสีย ความเข้มข้นของกรดแลคติกที่เกิดขึ้นประมาณ 0.8-1.2% ในการหมักอาจมีการเติมดินประสิวหรือสารประกอบไนไตรท์ และไนเตรท เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียคลอสตริเดียม และมีการเติมเครื่องเทศเพื่อเพิ่มกลิ่นรส กระบวนการหมักเพื่อให้เกิดกรดแลคติกมักทำให้อาหารอยู่ในสภาพที่ไม่มีอากาศหรือมีน้อย เช่น การห่อหมูด้วยใบตองหรือพลาสติกให้แน่นในการทำแหนม การปิดฝาภาชนะบรรจุ เช่น ไห โอ่ง ถังซีเมนต์ในระหว่างการทำน้ำปลาเป็นต้น เพื่อให้แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกเจริญได้ดี

2) ผลิตภัณฑ์จากผัก และผลไม้ เช่น ผัก และผลไม้ดอง ได้จากการหมักในน้ำเกลือความเข้มข้นประมาณ 2.5-6% เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับผลิตผลทางการเกษตรสร้างกรดแลคติก จนได้ความเข้มข้นของกรดแลคติกภายหลังกระบวนการหมักประมาณ 1%

3) กลุ่มผลิตภัณฑ์นม เช่น โยเกิร์ต เนยแข็ง เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติกจะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นกรดแลคติก ทำให้อาหารมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น

4) ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม เช่น ไวน์ สาเก กระแช่ สาโท บรั่นดี และวิสกี้ หรืออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว เช่น ข้าวหมาก ยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทธิลแอลกอฮอล ซึ่ง

เป็นพิษกับจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ยังหลงเหลืออยู่ในอาหาร ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนหรือทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสีย

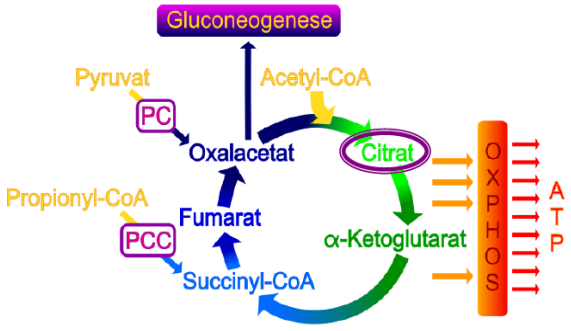
5) ผลิตภัณฑ์สารปรุงรส เช่น การผลิตน้ำส้มสายชู ทำโดยการนำเอทธิลแอลกอฮอลมาหมักต่อโดยแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติก (Acetic acid) หรือผลิตกรดซิตริก โดยใช้เชื้อราแอสเพอจิลัสไนเจอร์ (*Aspergillus niger*) หมักแป้งมันสำปะหลัง

6) กลุ่มผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง เช่น เต้าเจี้ยวหรือซีอิ๊ว ได้จากการหมักถั่วเหลืองโดยเชื้อราแอสเพอจิลัส ออไรเซ (*Aspergillus oryzae*) ซึ่งจะทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ย่อยโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนให้สั้นลง จากนั้นทำการหมักต่อโดยยีสต์ และแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกทำให้เกิดกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์

2.1.2 กรดซิตริก

กรดซิตริกเป็นกรดอ่อน ใช้ประโยชน์เพื่อการถนอมอาหาร โดยมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มรสชาดให้กับอาหารให้มีรสเปรี้ยว และมีกลิ่นหอมชวนรับประทาน ได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค สามารถเติมลงไปในอาหารโดยไม่เกิดอันตราย และสามารถย่อยสลายได้ง่ายและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม กรดซิตริกพบได้ตามธรรมชาติโดยทั่วไปในผัก และผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว โดยเฉพาะพืชตระกูลมะนาว สัปปะรด และส้ม ซึ่งมีสัดส่วนกรดซิตริกเป็นองค์ประกอบสูง ในระยะแรก ๆ การผลิตกรดซิตริกทำโดยคั้นมะนาวโดยตรงเพื่อให้ได้น้ำมะนาวซึ่งจะมีส่วนประกอบของกรดซิตริกประมาณร้อยละ 7-9 (อภิษฐา ช่างสุพรรณ. 2552) แต่ในปัจจุบันนิยมผลิตด้วยวิธีการหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยจุลินทรีย์กรรมวิธีการสังเคราะห์กรดซิตริกจากน้ำตาลกลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซีส (Glycolysis Pathway) (แผนภูมิที่ 2) ได้เป็นสารออกซาโลอะซิเตท (Oxaloacetate) แล้วสะสมเป็นกรดซิตริก โดยจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ เชื้อรา *Aspergillus niger* และยีสต์ *Candida Lypolitica*

แผนภูมิที่ 2 การผลิตกรดซิตริกผ่านวิถีไกลโคไลซีสของจุลินทรีย์



ที่มา: Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. 2007

กรดซิตริกที่ผลิตในปัจจุบันอยู่ในรูปผลึก Monohydrate ($C_6H_8O_7.H_2O$) ซึ่งมีน้ำประกอบอยู่ 1 โมเลกุล มีสีใส ไม่มีกลิ่น มีรสเปรี้ยว มีความสามารถละลายในน้ำเย็น (133 g/ml) มากกว่าการละลายในน้ำร้อน คุณสมบัติทางเคมีของกรดซิตริก กรดซิตริกมีน้ำหนักโมเลกุล 192.12 และประกอบด้วย คาร์บอน 37.51% ไฮโดรเจน 4.20% และออกซิเจน 58.29% (Windholz et al, 1976) กรดซิตริกที่อยู่ในรูป Anhydrate จะมีจุดเดือดที่ 153 องศาเซลเซียส ในรูปผลึกที่เป็นโมโนคลินิก โฮโลฮีดรา (Monoclinic holohedra) จะมีค่าความหนาแน่น (d) 1.665 ที่อุณหภูมิ 25°C ค่า pK_1 เท่ากับ 3.128 ค่า pK_2 เท่ากับ 4.767 และ pK_3 เท่ากับ 6.396 กรดซิตริกจะละลายในน้ำได้ดีขึ้นหากอุณหภูมิของน้ำสูงขึ้น โดยที่อุณหภูมิยิ่งสูงก็จะละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้นการละลายในน้ำของกรดซิตริกที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จะมีค่า 54.0% (w/w) ที่ 20 องศาเซลเซียส มีค่า 59.2% ที่ 30°C มีค่า 73.5% ที่ 70 องศาเซลเซียส มีค่า 84.0% กรดซิตริกอยู่ในรูปโมโนไฮเดรต (Monohydrate) หรือออโทรอมบิกคริสตอล (Orthorombic crystal) เมื่ออยู่ในอุณหภูมิปกติสารละลายกรดซิตริกมีความหนาแน่น 1.542 และสูญเสียน้ำในสภาวะแห้ง หรือมีอุณหภูมิที่ 40-50 องศาเซลเซียส แต่หากอยู่ในสภาวะอากาศชื้นจะละลายที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส จุดเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส pH 2.2 สารละลายกรดซิตริก 10% จะมีความหนาแน่น 1.0392 ที่ 30% จะมีความหนาแน่น 1.2244 ที่ 40% จะมีความหนาแน่น 1.1709 ที่ 50% จะมีความหนาแน่น 1.2204 ที่ 60% จะมีความหนาแน่น 1.2738 (สมศักดิ์ สรั่งบิน. 2542)

1. กระบวนการหมักกรดซิตริก แบ่งออกเป็น 2 กระบวนการ ดังนี้

1) Surface fermentation

(1) กระบวนการหมักบนผิวหน้าอาหารแข็ง (Koji process) หมักในถาดตื้น ๆ หนา 3-5 ซม. ใช้รำข้าวสาลี เศษวัสดุที่เป็นแป้ง และเซลลูโลส ปรับ pH 4-5 นึ่งฆ่าเชื้อ เติมสปอร์ของเชื้อราบ่ม 28-30°C นาน 4-5 วัน

(2) กระบวนการหมักบนผิวหน้าอาหารเหลว อาหารมีส่วนประกอบของน้ำตาลซูโครส เช่น กากน้ำตาล ปรับ pH 5-6 ฆ่าเชื้อ นำมาใส่ในภาชนะก้นแบน เติมสปอร์ของเชื้อรากระจายบนผิวหน้า บ่ม 30 เวลา 8-14 วัน

2) Submerged fermentation

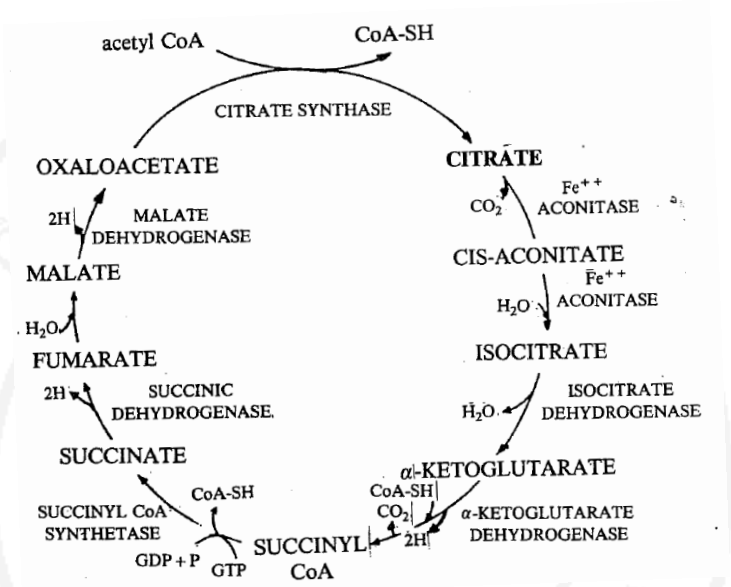
(1) เลี้ยงในถังหมักที่มีการให้อากาศ อุณหภูมิ 28-33°C pH 1.5-2.8 การให้อากาศ 0.2-1 vvm (ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที) หมักนาน 5-8 วัน

2. กลไกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักกรดซิตริก

Citric Acid Cycle (Tricarboxylic Acid Cycle หรือ TCA Cycle) เป็นแนวทางในการผลิตกรดซิตริก โดยอาศัยการหมักด้วยเชื้อรา โดยเฉพาะในกลุ่ม *Aspergillus niger* ทั้งนี้กรดซิตริกที่ได้จะเกิดการสะสมในปริมาณสูง เนื่องจากความผิดพลาดในการทำงานของ TCA cycle เป็นสำคัญ สำหรับเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการหมักกรดซิตริก ได้แก่ เอนไซม์ Aconitase, Isocitrate

dehydrogenase และ Citrate synthase โดยในช่วงของการสะสมกรดซิตริก เอนไซม์สองชนิดแรกจะมีกิจกรรมในระดับต่ำ ในขณะที่เอนไซม์ Citric synthase มีกิจกรรมในระดับสูง จึงทำให้เกิดการรวมตัวของ Acetyl CoA กับ Oxaloacetate เกิดเป็นกรดซิตริกขึ้นมา (วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532)

แผนภูมิที่ 3 แนวทางในการผลิตกรดซิตริกผ่านทาง tricarboxylic acid cycle



ที่มา: Kapoor, K.K., Chaudhary, K. and Tauro, P. 1982

สาร Oxaloacetate ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดซิตริก ถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยแนวทางในการสร้างหลายรูปแบบ ดังนี้

ปฏิกิริยา Dehydrogenation ของ Malate dehydrogenase ดังสมการ

$$Malate + NAD^{+} \rightarrow Oxaloacetate + NADH + H^{+}$$

ปฏิกิริยา Carboxylation ของ Pyruvate โดยอาศัยการรวมตัวของ Pyruvate กับคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งถูกเร่งด้วยเอนไซม์ Pyruvate carboxylase ดังสมการ

$$Pyruvate + CO_2 + H_2O + ATP \rightarrow Oxaloacetate + ADP + Pi$$

ปฏิกิริยา Carboxylation ของ Phosphoenolpyruvate โดยอาศัยหลัก Phosphoenol pyruvate carboxylase system (พบในยีนต์) ทั้งนี้จะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวของ Phosphoenolpyruvate กับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยไม่ต้องอาศัยพลังงานหรือ ATP (Woronick, C.L. and Johnson, M.J. 1960)

Glyoxylate cycle โดยที่เกิดการรวมตัวของ Glyoxylate กับ Acetyl CoA ซึ่งถูกเร่งด้วยเอนไซด์ Malate synthetase ดังสมการ (Mueller, H.M. 1975) ทั้งนี้ Malate ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนต่อไปเป็น Oxaloacetate อีกทอดหนึ่ง

Glyoxylate + AcetylCoA → *Malate + CoenzmeA*

สำหรับ Glyoxylate ที่ใช้นี้ สามารถสังเคราะห์ได้โดยอาศัยเอนไซม์ ดังนี้

Isocitate → *Succinate + Glyoxylate*

3. ชีวมวลที่สามารถนำมาผลิตกรดซิตริกโดยกระบวนการหมัก

1) การผลิตกรดซิตริกจากมะนาว

การผลิตกรดซิตริกดั้งเดิมผลิตจากการคั้นมะนาว ซึ่งจะมีส่วนประกอบกอบของกรดซิตริกประมาณร้อยละ 7-9 และนำน้ำมะนาวที่คั้นมาผสมแคลเซียมออกไซด์ ก่อให้เกิดเกลือแคลเซียมซิเตรท เติมกรดซัลฟุริก จะทำให้กรดซิตริกแยกตัวออก นำมาตกผลึก อบแห้ง และจำหน่ายเพื่อใช้ในการบริโภคตรง

2) การผลิตกรดซิตริกจากกากน้ำตาล

การผลิตกรดซิตริกจากกากน้ำตาลด้วยการหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* แบบแช่จม (Submerged Fermentation) เริ่มต้นโดยปรับกากน้ำตาลไปที่ความเข้มข้นน้ำตาลประมาณร้อยละ 15 หรือที่ 20 $^{\circ}$Brix และเติมสารอาหาร Ammonium Nitrate 2-2.5 g/l, Monopotassium Phosphate 0.3-1.0 g/l, Magnesium Sulphate 0.2-0.25 g/l เติมโลหะหนัก Fe, Zn, Mn เล็กน้อยที่ระดับ 0.01 g/l ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ (Sterilization) ปรับสภาวะกรดด่างที่ pH ประมาณ 6 เติมเชื้อ *Aspergillus niger* ML 516 ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อประมาณร้อยละ 2 ต่อน้ำหนัก และ ใช้อุณหภูมิการหมักประมาณ 28-30°C เติมอากาศ และกวนด้วยใบกวนประมาณ 8 วัน จะได้น้ำหมักที่มีกรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 60 นำน้ำหมักมาตกตะกอนด้วยปูนขาว ในรูปเกลือ ใช้กรดกำมะถันละลายกรดซิตริกออกจากผลึกเกลือ นำไปกรองแยกยิปซั่ม (Calcium Sulphate) ออกไป นำของเหลวที่ได้ผ่านการลดสีด้วยถ่าน (Active Carbon) จากนั้นนำมาต้ม และเคี่ยวตกผลึก อบแห้ง แล้วนำไปบรรจุเพื่อจำหน่ายต่อไปในรูปผลึก Monohydrate

3) การผลิตกรดซิตริกจากมันสำปะหลัง

ขั้นตอนการผลิตกรดซิตริกจากมันสำปะหลัง เริ่มจากการนำมันสำปะหลังมาบดย่อยให้เป็นผง และนำไปหมักในถังหมักด้วยเชื้อจุลิทรีย์ *Aspergillus niger* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นกรดซิตริก โดยจะควบคุมอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง และการเติมออกซิเจน พร้อมทั้งมีการกวนผสมภายในถังเพื่อให้จุลิทรีย์ทำงานให้มีประสิทธิภาพสูงสุด จากนั้นนำไปผ่านการ

กรองเพื่อนำกากมันออก ตกผลึกด้วยปูนขาว ใช้ถ่านกับกรดกำมะถันละลายกรดซิตริกออกจากผลึกเกลือก่อนนำไปกรองแยกยิปซั่มออกไป นำของเหลวที่ได้มาตกผลึก อบแห้ง แล้วนำไปบรรจุเพื่อจำหน่ายต่อไป

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก

1) สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์หลากสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตกรดซิตริก โดยเฉพาะรา และยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยพบว่าหลักในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่จะใช้ในการผลิต ควรมีคุณสมบัติต่อไปนี้ (Prescott, S. C. and Dunn, C. G. 1959)

(1) ให้ผลผลิตกรดซิตริกสูง และสม่ำเสมอ

(2) สามารถแยกกรดซิตริกออกจากน้ำหมักได้ง่าย

(3) เชื้อที่ใช้ไม่เกิดการกลายพันธุ์

(4) ผลิตกรดชนิดอื่นที่ไม่ต้องการในปริมาณน้อยหรือไม่ผลิตเลย

(5) ทนต่อโลหะหนักที่มีผลต่อการผลิตได้สูง

(6) สามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก และหาได้ตลอดทั้งปี

2) ชนิด และความเข้มข้นของวัตถุดิบ

จากการศึกษา พบว่า จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้นั้น สามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2-12 อะตอมเป็นวัตถุดิบได้ โดยขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ และพบว่าน้ำตาลซูโครส และฟรุคโตส จะให้ผลผลิตสูงกว่ากลูโคส กากน้ำตาลจากอ้อย และกากน้ำตาลจากหัวบีท ตามลำดับ ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 14-20 เปอร์เซ็นต์ (Perlman and Sih. 1960 อ้างถึงใน สุกัลยา ทาโบราณ. 2541: 11)

3) เกลืออนินทรีย์

เกลืออนินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดซิตริกได้แก่ เกลืออนินทรีย์ของธาตุโพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี เป็นต้น โดยความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ของธาตุต่างๆเหล่านี้ แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์ (Perlman et al. 1946b; Wold and Suzuki. 1976; Clark et al. 1966 อ้างถึงใน สุกัลยา ทาโบราณ. 2541: 11)

4) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตกรดซิตริก จากการทดลอง พบว่า ที่ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้นประมาณ 1.6-2.2 จะมีผลดีต่อการผลิตกรดซิตริก โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างดังกล่าว จะมีผลยับยั้งการผลิตกรดออกซาลิก นอกจากนี้การที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่ำ ยังสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย (Lockwood. 1976 อ้างถึงใน สุกัลยา ทาโบราณ. 2541: 11)

5) ปริมาณออกซิเจน

ในการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริก ราจะใช้น้ำตาลบางส่วนในการผลิตกรดส่วนที่เหลือจะถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญแต่เนื่องจากออกซิเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ ดังนั้นกรณีที่ผลิตโดยกระบวนการหมักบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยใช้ภาชนะปากกว้าง และตื้น จะช่วยให้มีการถ่ายเทอากาศ และออกซิเจนได้ดีกว่าภาชนะปากคม และลึก นอกจากนี้ภาชนะตื้นจะทำให้เชื้อสัมผัสกับอาหารได้มากกว่าด้วย

ส่วนกรณีการผลิตกรดซิตริกด้วยกระบวนการหมักในอาหารเหลว (Submerged culture) พบว่าปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตคือ 0.2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (Andrew, J.M. 1952) และสำหรับการผลิตกรดซิตริกด้วยกระบวนการหมักในอาหารเหลวโดยใช้เชื้อรา *A. niger* ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตมีค่า 3-4 $\times$ 10^{-6} กรัมโมลออกซิเจนต่อมิลลิลิตรต่อนาที (Usami. 1978 อ้างถึงใน สุกัลยา ทาโบราณ. 2541: 12)

6) อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ และภาวะอื่น ๆ ที่ใช้ในการหมัก จากการศึกษาของ Perlman และ Sih (1960) พบว่าโดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส ส่วนในสายพันธุ์ *A. niger* อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส (Prescott, S. C. and Dunn, C. G. 1959) และ พบว่า อุณหภูมิที่ทำการหมักสูงเกินไปจะทำให้เกิดการสะสมกรดออกซาลิก และกรดกลูโคนิก

5. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตกรดซิตริก

1) เชื้อรา *Aspergillus niger*

เชื้อราจัดอยู่ในคลาสดิวเทอโรไมซีตีส และดิวิชันเบสิดีโอไมโคตา ลักษณะรูปร่างเป็นไมซีเลียมที่แตกแขนง และมีผนังกัน ที่ส่วนปลายของโคนิดีโอจะโป่งออกเป็นเวสซิเคิล และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็น สเตอริกมาโคนิเดียมีสีต่าง ๆ กัน และมีลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละชนิด ส่วนใหญ่มีสีดำ น้ำตาล เขียว (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เส้นใยมีสีขาวถึงเหลือง อัดแน่น คอนิเดียสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มจัด รูปร่างค่อนข้ามกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5-4.5 ไมโครเมตร ปกติผนังมักขรุขระ แอสเพอจิลัมเป็นแบบไฟเซอริเอทมีน้อยมาก ๆ ที่เป็นทางอุตสาหกรรม ใน ปี ค.ศ. 1917 Currie และคณะ พบ *Aspergillus niger* สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงกว่า ต่อมาปี ค.ศ.1919 จึงได้มีการก่อตั้งโรงงานผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* แห่งแรกขึ้นในประเทศเบลเยี่ยม ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริกขนาดใหญ่ยังคงนิยมใช้ *Aspergillus niger* การผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *Aspergillus niger* ส่วนใหญ่จะใช้วิธี submerged fermentation โดยใช้ถังหมักที่ทนการ

กัดกร่อนแบบที่มีใบพัด (Stirred fermenter) หรือแบบ air-lift แต่ก็ยังคงมีการใช้วิธี surface fermentation อยู่ประมาณร้อยละ 20 อย่างไรก็ตามในประเทศอุตสาหกรรม การผลิตกรดซิตริกโดยวิธี surface fermentation กำลังจะถูกแทนที่โดยวิธี submerged fermentation มากขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า และใช้ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุมได้แบบอัตโนมัติ (สมใจ ศิริโภค. 2547)

2) เชื้อยีสต์

มีเชื้อยีสต์อีกหลายชนิดที่พบว่ามีการสะสมกรดซิตริกในระหว่างการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อยีสต์ดังกล่าว ได้แก่ Candida, Hansenula, Pichia, Debaryomyces, Torulopsis, kloeckera, Trichosporon, Torula, Rhodotorula, Sporobolomyces, Endomyces, Nocardia, Saccharomyces และ Zygosaccharomyces เป็นต้น ในบรรดาเชื้อยีสต์เหล่านี้ เชื้อ Candida จัดว่าเป็นเชื้อยีสต์ที่ใช้การผลิตกรดซิตริกอย่างกว้างขวาง และมีหลายสปีชี่ส์ (Species) อาทิเช่น *C. lipolytica, C. tropicalis, C. zeylanoides, C. intermedia, C. parapsilosis, C. petrophilum, C. subtropicalis, C. oleophila, C. hitachinica, C. citrica, C. guilliermondii,* และ *C. sucrose*

ในการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อยีสต์นี้มีวัตถุดิบ (Substrate) ที่ใช้หลายชนิดด้วยกัน เช่น กลูโคส อะซิเตท ไฮโดรคาร์บอน กากน้ำตาล แอลกอฮอล์ กรดไขมัน และน้ำมันธรรมชาติ (Natural oils) (วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532)

6. การใช้ประโยชน์กรดซิตริกในรูปแบบต่าง ๆ (สุกัลยา ทาโบราณ. 2541)

กรดซิตริกเป็นกรดที่มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ดังนี้

1) อุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่ม

มีการนำกรดซิตริกไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่มสูงมาก เพราะกรดซิตริกมีความสามารถในการละลายน้ำสูง มีความเป็นพิษต่ำ และเป็นกรดที่มีรสชาติดี โดยมักใช้กรดซิตริกเป็นตัวปรับกรด (Acidulant) ในอาหารกระป๋องหรือน้ำอัดลม (Menlo, P. 1981) เป็นตัวช่วยเพิ่มกลิ่นรส ลดความฝาด ควบคุมความเป็นกรด และป้องกันการขุ่นของเครื่องดื่มที่ทำจากน้ำผลไม้ (Rohr, M. and Kubicek, C.P. 1980) และยังใช้เป็นตัวปรับให้มีรสชาติดีโดยการผสมในซอสปรุงรส ไซรับ ลูกอม ลูกกวาด และมีคุณสมบัติในการช่วยเก็บรักษาอาหาร ใช้เป็นสารกันบูด และช่วยยืดอายุผลิตภัณฑ์พวกเนยแข็ง และเนยเหลว

2) อุตสาหกรรมทางเภสัชกรรม

ในการผลิตยาบางชนิดจะใช้กรดซิตริกเป็นส่วนผสมเพื่อควบคุมความเป็นกรด หรือเพื่อใช้เป็นตัวทำละลาย ช่วยให้ยามีการแตกตัวได้ดีขึ้น นอกจากนี้ ยังใช้ผสมในยาเพื่อให้เกิดฟองฟู่ในน้ำดื่ม โดยใช้ร่วมกับคาร์บอเนต และใช้ป้องกันการจับตัวเป็นก้อนของยา โดยใช้เป็นส่วนผสมในรูปของเกลือหรือเอสเทอร์ของกรดซิตริก

3) อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง กรดซิตริกจะถูกใช้เพื่อป้องกันการออกซิไดซ์ ปรับความเป็นกรดด่าง เป็นบัฟเฟอร์ (Buffer) ในเครื่องสำอาง เช่น ใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาเซทผม ครีมนวดผม และโลชั่นทาผิว โดยกรดซิตริกจะทำให้เกิดความแวววาว และทำให้ผลิตภัณฑ์มีความอ่อนนุ่มมากยิ่งขึ้น

4) อุตสาหกรรมอื่น ๆ

นอกจากอุตสาหกรรมสำคัญทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น กรดซิตริกยังถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ อีก เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอกจะใช้โซเดียมซิเตรทแทนการใช้ฟอสเฟต (Menlo, P. 1981) ใช้กรดซิตริกเป็นบัฟเฟอร์ในอุตสาหกรรมการถ่ายภาพ ใช้ผสมทำความสะอาดหม้อต้มน้ำ (Boiler) ทำความสะอาดโลหะ ล้างสนิม หมึกพิมพ์ น้ำหมึก สี และพบว่ามีการนำกรดซิตริกไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียด้วย

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตกรดซิตริก พบว่า สภาวะและปัจจัยที่สำคัญสำหรับการหมัก ได้แก่ วัตถุดิบ/สับสเตรต ค่าพีเอช และอุณหภูมิ ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปัจจัยที่สำคัญในการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตกรดซิตริก

วัตถุดิบ	อุณหภูมิในการหมัก	ค่าพีเอชเริ่มต้น	ผลผลิตกรดซิตริก	ที่มา
1. แกลบ ฟางข้าว ต้นข้าวโพด และเปลือกสับปะรด	อุณหภูมิห้อง	-	เปลือกสับปะรด ให้กรดซิตริกสูงสุด คือ 17.67 g/L	ฆาสิณี พูลพิพัฒน์ (2548)
2. มันแกว มันสำปะหลัง ข้าวฟ่าง และข้าวโพด	-	-	มันแกว ให้ผลผลิตกรดซิตริกได้สูงที่สุด คือ 331.4 กรัมต่อลิตร	สมศักดิ์ สรั่งบิน (2542)
3. แป้งมันสำปะหลัง *(Candida oleophila* C-73)	28°C	-	137.07 กรัมต่อลิตร	ธีรวัฒนา ภาระมาตย์ (2540)
4. แป้งมันสำปะหลัง	30°C	3.5	16.75 กรัมต่อลิตร	ชัยวัฒน์ บรรใดเพ็ชร (2536)
5. แป้งมันสำปะหลัง	30°C	6.5	147.9 กรัมต่อลิตร	สนธวรรณ สุภัทรประทีป (2536)
6. น้ำอ้อย	30°C	4	กรดซิตริก 112.8 กรัมต่อลิตร	ปรีชาพล ตันติประสิทธิกุล (2533)
7. ขุยมะพร้าว	อุณหภูมิห้อง	4	ผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด 68.4 กรัมต่อลิตร	วรรณวิมล โพธิ์แสง และวาสนา แซ่เลี่ยง (2533)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

วัตถุดิบ	อุณหภูมิในการหมัก	ค่าพีเอชเริ่มต้น	ผลผลิตกรดซิตริก	ที่มา
8. แป้งมันสำปะหลัง	30°C	6.5	ปริมาณกรดซิตริกเพิ่มขึ้นจาก 106 g/L เป็น 156 g/L	ศยามล นองบุญนาก (2533)
9. อาหารเหลวจากแป้งมันสำปะหลัง	30°C		พบว่า A. niger CA2 สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด 11.4%	นิมล กิจขันธ์ (2532)
10. รำข้าวเจ้า	-	-	ผลิตกรดซิตริกได้ 11.7 % เมื่ออยู่ในอาหารที่มี NH_4NO_3	นิมล กิจขันธ์ (2532)
11. น้ำคั้นเปลือกและแกนสับปะรด	35°C	-	สามารถผลิตกรดได้สูงถึง 64.38% ของน้ำตาลเริ่มต้น (11.49% โดยปริมาณ) ซึ่งเป็นปริมาณที่มีศักยภาพสูงพอต่อการอุตสาหกรรม	อัจฉริยา จารุจินดา (2529)
12. แป้งมันสำปะหลัง	-	3	ได้ปริมาณกรดสูงสุดเท่ากับ 2.67 เปอร์เซ็นต์	นิพนธ์ ยวนังกูร (2528)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

วัตถุดิบ	อุณหภูมิในการหมัก	ค่าพีเอชเริ่มต้น	ผลผลิตกรดซิตริก	ที่มา
13. กากมันสำปะหลัง	35°C	4.8 – 5.5	พบว่า A. niger C-3-30c สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด 12.26%	จิราภรณ์ โล่วงศ์วัฒน (2525)
14. เปลือกกล้วย	28°C	3	*	Karthikeyan, A. and Sivakumar, N. (2010)
15. กากน้ำตาล หัวบีท และ corn steep liquor	31.5°C	4	ได้ปริมาณกรดซิตริกเท่ากับ 87.81 %	Lotfy, W.A., Ghanem, K.M. and El-Helow, ER. (2007)
16. ชานอ้อย *(Aspergillus niger* DS 1)	–	–	** ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ 69.6, 64.5 และ 62.4% (ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาล)	Kumar, D. et al. (2003)
17. เปลือกข้าวโพด *(Aspergillus nige* NRRL 2001*)*	30°C	-	ได้ผลผลิตของกรดซิตริก 259 ± 10 กรัมต่อกิโลกรัม	Hang, Y. D. and Woodams, E.E. (2000)
18. แป้งไฮโดรไลเซส	30°C	2	ได้ผลผลิต 341 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง	Mourya, S. and Jauhri, K.S. (2000)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

วัตถุดิบ	อุณหภูมิในการหมัก	ค่าพีเอชเริ่มต้น	ผลผลิตกรดซิตริก	ที่มา
19. ฝักแครบ (Aspergillus niger)	30°C	6.5	ผลผลิตกรดซิตริก (55 ± 2%)	Roukas, T. (1999)
20. ชีสหางนม (*Aspergillus niger* CAIM 111)	-	3.5	ผลผลิตกรดซิตริก 28.24 %	El-Samragy, Y. A. et al. (1996)
21. ซังข้าวโพด *(Aspergillus niger* NRRL 2001*)*	30°C	-	250 กรัม/กิโลกรัม	Hang, Y. D. and Woodams, E.E. (2000)
22. เศษถั่วเหลือง *(Aspergillus niger)*	30°C	8.3	ผลการผลิตกรดซิตริก 5.10 กรัม/ 100 กรัมของแข็งแห้ง	Khare, S.K., Jha, K. and Gandhi, A.P. (1995)

*****สภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความชื้น 70%, อุณหภูมิ 28°C, pH เริ่มต้น 3, ปริมาณเชื้อ 10^8 สปอร์/มล.

**สภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความชื้น 75% น้ำหนักของแข็งแห้ง 31.8 กรัมน้ำตาล/100 กรัม, เมทานอล 4% (v/w) และอนุภาคขนาด 1.2 และ 1.6 มม.

2.3 กรอบแนวคิดการวิจัย

กรอบแนวคิดในการวิจัยเรื่องผลผลิต และสภาวะในการผลิตกรดซิตริกจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้ มีดังนี้

แผนภูมิที่ 4 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย