บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

กรดมะนาว(citric acid)เป็นกรดอินทรีย์ที่สำคัญชนิดหนึ่ง พบโดยทั่วไปทั้งในพืชและสัตว์ เนื่องจากเป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์(Krebs cycle) พบมากในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยวเช่น มะนาว ส้ม และองุ่น เป็นต้น กรดมะนาวถูกแยกและตกผลึกเป็นครั้งแรกจากน้ำมะนาวโดย Scheels ในปี 1784 (อ้างถึงใน Marison, 1988; Mattey, 1992) กรดมะนาวที่แยกได้จากน้ำผลไม้เรียกว่า กรดมะนาวธรรมชาติ(natural citric acid) ในช่วงแรกของการผลิตกรดมะนาวออกจำหน่ายจนถึงปี 1919 ได้จากน้ำมะนาวเป็นหลักแต่การผลิตกรดมะนาวไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาดทำให้มีราคาแพง จึงได้มีผู้คิดค้นวิธีการผลิตกรดมะนาวโดยวิธีทางเคมีและโดยเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด ในปี 1880 Grimoux และ Adam สามารถสังเคราะห์กรดมะนาวจากกลีเซอรอล แต่การใช้วิธีทางเคมีพบว่าต้นทุนสูงและได้ผลผลิตคุณภาพต่ำ เนื่องจากต้องใช้ปฏิกิริยาหลายขั้นตอน(อ้างถึงใน Abou-Zeid and Ashy, 1984; Mattey, 1992; Milsom and Meers,1985)

ในปี 1893 Wehmer ได้พบจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Citromyces* (*Penicillium*) ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้เป็นครั้งแรก ในปี 1917 Currie ได้พบเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน (อ้างถึงใน Mattey, 1992; Milsom and Meers,1985) ในปี 1923 Currie ร่วมกับบริษัท Chas.Pfizer & Co.Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา(อ้างถึงใน Miall,1978) ได้นำเชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้กระบวนการหมักบนผิวหน้าอาหาร(surface culture) จากวัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาล เรียกกรดมะนาวนี้ว่ากรดมะนาวจากการหมัก(fermentation citric acid) หลังสงครามโลกครั้งที่ 2 ได้มีการพัฒนากระบวนการผลิต เป็นการหมักในสภาพอาหารเหลว(submerged

culture)จากวัตถุดิบที่เป็นกลูโคสไซรัปหรือกากน้ำตาล(Perlman,1949 อ้างถึงใน Milsom and Meers,1985) ในปี 1965 ได้มีผู้ค้นพบสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวจากการหมักในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตและนอร์มัล-อัลเคน(Stottmeister et al.,1982 อ้างถึงใน Milsom and Meers,1985) ปัจจุบันมีการผลิตกรดมะนาวออกจำหน่ายทั่วโลกประมาณ 400,000 ตันต่อปี ส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยเชื้อรา *A. niger* และบางส่วนจากเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* (Mattey,1992)

1.2 <u>การผลิตกรดมะนาวโดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์</u>

กระบวนการหมักสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ เป็นกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้มากในประเทศอุตสาหกรรม เพราะว่าให้ผลผลิตสูง ใช้แรงงานและพื้นที่น้อย มีการออกแบบถังหมักหลายรูปแบบโดยต้องคำนึงถึงการกวน การให้อากาศและใช้วัสดุที่ทนกรดได้ดี ตัวอย่างเช่น ถังหมักแบบหอสูง(tower fermentor) ถังหมักแบบกวน(stirred tank fermentor) และถังหมักแบบแอร์ลิฟต์(air-lift fermentor) (Mattey,1992) ในการผลิตกรดมะนาวนิยมใช้ถังหมักแบบหอสูงและมีระบบการทำความเย็นที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากในระหว่างการหมักจะเกิดความร้อนขึ้น สำหรับขั้นตอนการหมักทำได้โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกสายพันธุ์แล้ว ในถังหมักขนาดเล็กเพื่อเตรียมหัวเชื้อถ่ายเชื้อที่เจริญเต็มที่ลงในถังหมักที่มีอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ ค่าความเป็นกรด-ด่างต้องไม่ต่ำเกินไปซึ่งสามารถควบคุมโดยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตหรือใช้ด่างแก่(Milsom and Meers,1985)

กระบวนการหมักสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ ใช้การหมักแบบแบทช์ (batch fermentation process)เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากป้องกันการปนเปื้อนได้ง่ายและสามารถเพิ่มการผลิตในแต่ละครั้งได้ การใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องสำหรับการผลิตกรดมะนาวได้มีผู้รายงานเช่นกัน(Aiba and Matsuoka,1979; Klasson, Clausen and Gaddy, 1989) นอกจากการใช้กระบวนการหมักที่กล่าวมาแล้วปัจจุบันได้มีการศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์ โดยใช้สารพวกโพลีอะคริลาไมด์เจล(Maddox and Kingston, 1983) คาร์ราจิแนนและอัลจิเนตเป็นต้น(Kautola et al.,1991; Potvin, Desrochers and Arcand, 1988) ข้อดีของการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์เมื่อ

เปรียบเทียบกับเชื้อรา *A. niger* คือ อัตราการเจริญและการผลิตกรดมะนาวเร็วกว่า ใช้แหล่งของคาร์บอนได้หลายชนิด และสามารถพัฒนากระบวนการหมักให้เป็นการหมักแบบต่อเนื่องได้(Milsom and Meers,1985; Kubicek and Rohr,1986)

1.3 ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์

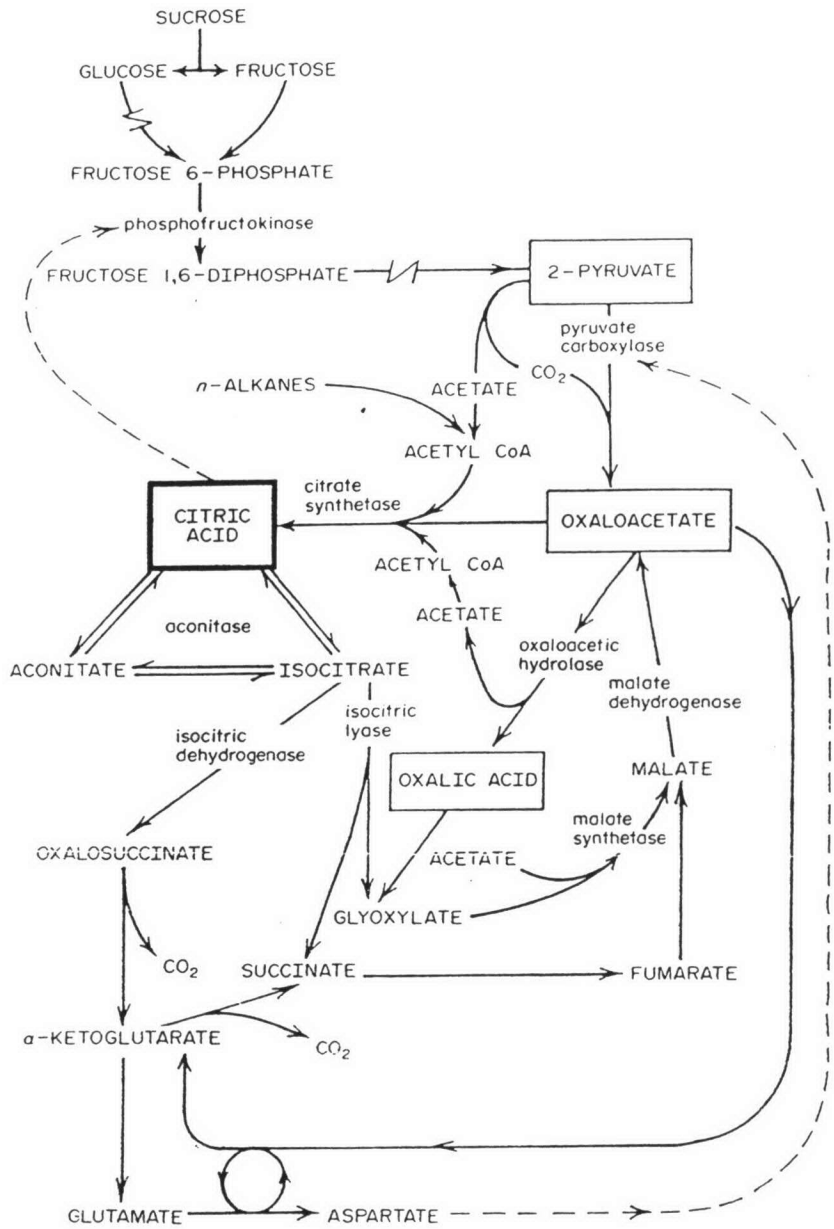
กรดมะนาวเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวัฏจักรเครปส์(Krebs cycle) ซึ่งแสดงในรูปที่ 1 สำหรับกลไกการผลิตกรดมะนาวจากน้ำตาลกลูโคสนั้น น้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวต(pyruvate) โดยวิถีไกลโคไลซิส(glycolysis pathway) และไพรูเวตที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิติล-โคเอ(acetyl-CoA) เพื่อเข้าสู่วิถีการผลิตกรดมะนาว โดยอะซิติล-โคเอ ที่เกิดขึ้นจะรวมกับออกซาโลอะซิเตต(oxaloacetate) โดยอาศัยเอนไซม์ซิเตรต ซินติเตส(citrate synthetase)ได้กรดมะนาวเกิดขึ้น ในระหว่างการสะสมกรดมะนาว ออกซาโลอะซิเตตถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยา การสร้างทดแทน(anaplerotic reaction) ซึ่งเกิดจากไพรูเวตรวมกับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอาศัยเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส(pyruvate carboxylase) (Milsom and Meers,1985) การสะสมกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นเนื่องจากมีความผิดปกติของวัฏจักรเครปส์ โดยมีเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิดได้แก่ อะโคนิเตส(aconitase)และไอโซซิเตรต ดีไฮโดรจิเนส(isocitrate dehydrogenase) ซึ่งในช่วงที่มีการผลิตกรดมะนาวเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด จะมีกิจกรรม(activity)ลดลง ในขณะที่เอนไซม์ซิเตรต ซินติเตส มีกิจกรรมสูงขึ้น(Marison,1988)

1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์

กระบวนการหมักสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ เป็นการหมักในสภาพอาหารเหลวจึงมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวซึ่งได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อยีสต์และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

1.4.1 สายพันธุ์ของเชื้อยีสต์

ปัจจุบันพบว่ามียีสต์หลายสายพันธุ์ ที่สามารถผลิตกรดมะนาวในระหว่างการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น *Candida* sp. *Debaromyces* sp. *Endomyces* sp.



<u>รูปที่ 1</u> วิถีการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ผ่านทางวัฏจักรเครปส์

ที่มา: Milsom and Meers(1985)

---- หมายถึง การยับยั้งแบบย้อนกลับ(feedback inhibition)

Hansinula sp. *Kloeckera* sp. *Nocardia* sp. *Picahia* sp. *Rhodotorula* sp. *Sporobolomyces* sp. *Saccharomyces* sp. *Torulopsis* sp. *Trichosporon* sp. และ *Zygosacharomyces* sp. แต่พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Candida* เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง(Marison,1988) สายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ต้องมีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้สูง ผลิตกรดไอโซซิตริกต่ำ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดและใช้เวลาสั้นในการหมัก

1.4.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว

1.4.2.1 แหล่งของคาร์บอน

การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์สามารถใช้แหล่งของคาร์บอนได้หลายชนิดเช่น กลูโคส กากน้ำตาล ไฮโดรคาร์บอน อะซิเตต แอลกอฮอล์ กรดไขมันและน้ำมันธรรมชาติ เป็นต้น(Marrison,1988) โดยแหล่งของคาร์บอนที่เลือกใช้ต้องมีราคาถูกและหาได้ง่ายเพื่อลดต้นทุนการผลิต น้ำตาลกลูโคสจัดเป็นแหล่งของคาร์บอนที่เชื้อยีสต์นำไปใช้ได้ง่ายและรวดเร็วแต่มีราคาแพง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาแหล่งของคาร์บอนที่มีราคาถูกกว่า Shah และคณะ(1993)ได้รายงานว่า การใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้ว(tapioca starch hydrolysate) ที่มีค่าสมมูลย์เดกซ์โตรสร้อยละ 94-96 สามารถใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนได้ดีสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Y. lipolytica*(DS-1) Iizuka และคณะ(1971) ได้รายงานว่าการใช้กากน้ำตาลที่ผ่านการย่อยด้วยกรดแล้ว สามารถใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและได้กรดมะนาวสูงเช่นกัน

1.4.2.2 แหล่งของไนโตรเจน

แหล่งของไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวอยู่ในรูปของอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน แหล่งของอินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน คอร์นสตีปลิเคอร์(corn-steep liquor) ส่วนแหล่งของอนินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย แอมโมเนียมอะซิเตต และ แอมโมเนีย เป็นต้น ชนิดของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 2 รูปแบบอาจจะ

ใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือใช้ควบคู่กันก็ได้(Iizuka et al.,1971) แต่แหล่งของไนโตรเจนต้องใช้ในปริมาณที่จำกัด เนื่องจากการสะสมกรดมะนาวจะเกิดขึ้นหลังจากที่แหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้หมดแล้ว(Kubicek and Rohr, 1986) ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.5-1.0 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Iizuka et al.,1971)

1.4.2.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นสารที่จำเป็นสำหรับเชื้อยีสต์ในการเจริญและการผลิตกรดมะนาว แต่การสะสมของกรดมะนาวจะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อมีการจำกัดปริมาณฟอสเฟต (Kubicek and Rohr,1986) Ajinomoto Co.,Inc.(1969) และ Shimizu และคณะ (1970) ได้รายงานว่า โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งของฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Candida* (อ้างถึงใน Abou-Zeid and Ashy,1984)

1.4.2.4 แร่ธาตุ

ได้มีผู้รายงานเกี่ยวกับผลของแร่ธาตุบางชนิดที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ตัวอย่างเช่น แมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟตเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาว(Abou-Zeid and Ashy,1984;Iizuka et al., 1971) Fired(1972) ได้รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อ *Candida* ในอาหารที่มีตะกั่วปริมาณ 0.5-1.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าอาหารที่ไม่เติมตะกั่ว Furukawa และคณะ(1977) ได้ศึกษาผลของทองแดงไอออน ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเตส พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของทองแดงไอออน ทำให้การผลิตกรดไอโซซิตริกลดลงและความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เหล็กไอออนเป็นแร่ธาตุอีกชนิดหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว เนื่องจากเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเตส การเติมเหล็กไอออนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าจะทำให้เกิดการสร้างกรดไอโซซิตริกสูงขึ้นแต่การผลิตกรดมะนาวลดลง(Furukawa et al.,1977)

1.4.2.5 สารเสริมอื่นๆ

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ นอกจากเติมสารต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีการเติมสารบางชนิดซึ่งเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการผลิตกรดมะนาว เช่น ไธอะมีน กรดนิโคตินิกและไบโอติน โดยเฉพาะไธอะมีนเป็นสารที่จำเป็นสำหรับเชื้อยีสต์ในการผลิตกรดมะนาว(Kubicek and Rohr,1986) หรืออาจใช้ในรูปของสารประกอบเช่น สารสกัดจากยีสต์และคอร์นสตีปลิเคอร์ เป็นต้น(Abou-Zeid and Ashy,1984; Iizuka et al.,1971)

1.4.2.6 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาวจะแตกต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์และวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์นั้น เมื่อมีการสะสมกรดมะนาวในระหว่างการหมักค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงและไปยับยั้งการทำงานของเซลล์ทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง(Moresi et al.,1980) ดังนั้นจึงได้มีการเติมสารบางชนิดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อรักษาค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ ตัวอย่างเช่น แคลเซียมคาร์บอเนต (Iizuka et al.,1971;Shah et al.,1993) โซเดียมไฮดรอกไซด์(Klasson et al.,1989; Nakanishi et al.,1972;Wejtatowicz, Rymowicz and Kautola,1991) โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์(Briffaud and Engasser,1979) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Rottini and Cardini,1981)เป็นต้น การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่านิยมใช้แคลเซียมคาร์บอเนต โดยเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น ปริมาณที่เหมาะสมขึ้นกับปริมาณกรดมะนาวที่เชื้อผลิตขึ้น แต่ถ้าเป็นการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักสามารถใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเติมในถังหมักตั้งแต่เริ่มต้น หรือใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์, โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เติมลงในถังหมักในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ส่วนแคลเซียมไฮดรอกไซด์เตรียมในรูปสารแขวนลอยในน้ำและเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในระหว่างการหมักเช่นกัน ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์อยู่ในช่วง 4.5-6.5(Kubicek and Rohr,1986) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างถ้าสูงเกินไป เชื้อยีสต์จะผลิตสารพวกโพลีออลส์(polyols) อิริทริทอล

(erythritol)และแมนนิทอล(mannitol) แทนการผลิตกรดมะนาว(Tabochi and Hara, 1970 อ้างถึงใน Mattey,1992)

1.4.2.7 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ เนื่องจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาวแตกต่างกัน โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส(Marison,1988)

1.4.2.8 การให้อากาศและการกวน

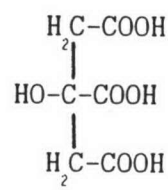
การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ เป็นการหมักในสภาวะที่ต้องการออกซิเจน ดังนั้นในระหว่างการหมักโดยเฉพาะในช่วงที่เชื้อมีการเจริญจำเป็นต้องให้อากาศอย่างเพียงพอ การถ่ายเทของออกซิเจนในถังหมักขึ้นกับองค์ประกอบหลายอย่างเช่น อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน องค์ประกอบและสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความดันและอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก(Rane and Sims,1994) การหมักในสภาพอาหารเหลวนั้น อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนต้องใช้ควบคู่กันอย่างเหมาะสม(Iizuka et al.,1971) ได้มีรายงานผลของการให้อากาศตัวอย่างเช่น Tabuchiและคณะ(1975)(อ้างถึงใน Abou-Zeid and Ashy, 1984) ได้รายงานว่า การผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดโดยเชื้อ *Candida lipolytica* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสนั้นต้องมีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอ ถ้าให้ออกซิเจนไม่เพียงพอ อัตราการผลิตกรดมะนาวจะลดลง Okoshiและคณะ(1987)ได้ศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากเชื้อ *Candida tropicalis* ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนความเข้มข้นสูง พบว่าการผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 5-60 ppm ถ้าเพิ่มสูงกว่า 60 ppm การผลิตกรดมะนาวจะลดลง นอกจากนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนยังทำให้การผลิตกรดไอโซซิตริกลดลงด้วย

1.4.2.9 ระยะเวลาในการหมัก

ระยะเวลาที่ใช้สำหรับการผลิตกรดมะนาวขึ้นกับสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ อาหารและสภาวะที่ใช้ในการหมัก ซึ่งโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 3-6 วัน(Marison,1988)

1.5 คุณสมบัติของกรดมะนาว

กรดมะนาวหรือกรด 2-ไฮดรอกซี-1,2,3-โพรเพนไตรคาร์บอกซิลิก สูตรทางเคมีคือ $C_6H_8O_7$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 192.13 ส่วนสูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2 กรดมะนาวมีค่า pK ที่ 25 องศาเซลเซียส ดังนี้ pKa_1 3.128, pKa_2 4.761 และ pKa_3 6.396 (Bouchard and Merritt, 1979) ลักษณะทั่วไปเป็นผลึกสีขาว มีรสเปรี้ยว มีความเป็นพิษต่ำ ความสามารถในการละลายในน้ำได้สูงขึ้นกับอุณหภูมิ และย่อยสลายได้ง่าย กรดมะนาวส่วนใหญ่ผลิตในรูปของกรดมะนาวแอนไฮดรัส กรดมะนาวโมโนไฮเดรต เกลือและเอสเทอร์ของกรดมะนาว(Marison,1988)



รูปที่ 2 โครงสร้างของกรดมะนาว

1.6 ประโยชน์ของกรดมะนาว

เนื่องจากกรดมะนาวเป็นสารที่มีรสเปรี้ยว สามารถละลายในน้ำได้สูง ย่อยสลายได้ง่าย มีความเป็นพิษต่ำ มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักและการเป็นบัฟเฟอร์ จึงมีการนำเอากรดมะนาว เกลือและเอสเทอร์ของกรดมะนาว ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มร้อยละ 75 เภสัชกรรมร้อยละ 10 และอุตสาหกรรมอื่นๆ ร้อยละ 15 (Bouchard and Merritt,1979; Mattey,1992)

1.6.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ใช้กรดมะนาวเป็นสารให้ความเปรี้ยวและเพิ่มรสชาติ ในการทำน้ำผลไม้ น้ำเชื่อม น้ำหวาน ลูกกวาด เจลลีและแยมเป็นต้น ใช้เป็นสารป้องกันการเกิดปฏิริยาออกซิเดชันในน้ำมันและไขมัน ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในอาหารแช่แข็ง

1.6.2 อุตสาหกรรมทางเภสัชกรรม ใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมของยาบางชนิด เพื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นส่วนผสมของยาลดกรดในกระเพาะอาหารที่ทำให้เกิดฟองฟู่ ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดมะนาวกับไบคาร์บอเนต-คาร์บอเนตในน้ำ ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเตรียมวิตามิน กรดมะนาวและโซเดียมซิเตรตใช้ในการเตรียมสารละลายสำหรับการป้องกันการแข็งตัวของเลือด ใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมเพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างและป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยโลหะหนักในการทำเครื่องสำอางเช่น ยาสระผม ครีมนวดผม โลชัน เป็นต้น

1.6.3 อุตสาหกรรมอื่นๆ ใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมในน้ำยาขัดโลหะ น้ำยาล้างสนิม เช่น ใช้กำจัดออกไซด์ของเหล็กและทองแดงที่เกิดขึ้นในหม้อต้มไอน้ำ ท่อให้ความร้อนเตาปฏิกรณ์นิวเคลียร์ ในการทำผงซักฟอกใช้กรดมะนาวที่อยู่ในรูปไตรโซเดียมซิเตรตแทนการใช้สารเตตราโปแตสเซียมไพโรฟอสเฟต ทำให้ย่อยสลายได้ง่าย ใช้ในกระบวนการกำจัดแกสซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงบางชนิด นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในอุตสากรรมการทำสี น้ำยาล้างรูป กระดาษอัดรูป เส้นใย กระดาษ โพลิเมอร์ เป็นต้น

1.7 จุดมุ่งหมายของงานวิจัย

จากการที่กรดมะนาวมีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม ประเทศไทยมีความต้องการใช้เพิ่มสูงขึ้นในแต่ละปี ต้องนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศเป็นจำนวนมากเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการ ดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนั้นการพัฒนากระบวนการผลิตและปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพสูง จึงมีความจำเป็นในการผลิตกรดมะนาวขึ้นใช้เองภายในประเทศและลดปริมาณการนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศ นอกจากนี้ภายในประเทศยังมีวัตถุดิบที่ได้จากการเกษตรหลายชนิด ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดมะนาว เช่น มันสำปะหลังและน้ำตาล เป็นต้น

จากการศึกษาของ เรวดี เลิศไตรรักษ์(2535) ได้คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล-พาราฟฟินส์ พบว่าสายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวได้ดี คือ *Candida oleophila* C-73 และยีสต์สายพันธุ์นี้ยังสามารถผลิตกรดมะนาวได้เช่นกันเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน งานวิจัยนี้มีจุด

มุ่งหมายเพื่อที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *C. oleophila* C-73 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนทั้งในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนต่อไป

1.8 <u>วัตถุประสงค์ของงานวิจัย</u>

1.8.1 ศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C .oleophila* C-73 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

1.8.2 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.9 <u>ขั้นตอนการวิจัย</u>

1.9.1 ศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *C. oleophil*a C-73 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

1.9.2 ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในระดับขวดเขย่า

1.9.3 ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 1 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวของประเทศไทยระหว่างปี 2531-2536

ปี พ.ศ.	ปริมาณ(กิโลกรัม)	มูลค่า(บาท)
2531	771,111	26,127,593
2532	1,460,893	45,802,953
2533	2,113,734	57,264,118
2534	2,398,451	64,844,372
2535	3,985,387	131,742,434
2536 (ม.ค.-ส.ค.)	1,316,993	45,423,432

ที่มา กรมศุลกากร