บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

กรดมะนาว (citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง มีชื่อทางเคมีว่า 2-ไฮดรอกซี -1, 2, 3 - โพรเพนไทรคาร์บอกซิลิก เป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle หรือ tricarboxylic acid cycle) มีการสกัดแยกและตกผลึกกรดมะนาวจากน้ำมะนาวได้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1784 โดย Karl Wilhem Scheele (อ้างถึงใน Grewal and Kalra, 1995) นอกจากในน้ำมะนาวแล้วยังพบในพืชตระกูลส้ม (citrus fruits) หลายชนิด ได้แก่ ส้ม สับปะรด แพร์ พีช และผลมะเดื่อเป็นต้น จึงเรียกกรดมะนาวที่ผลิตได้จากผลไม้เหล่านี้ว่า กรดมะนาวธรรมชาติ (natural citric acid) (Milsom and Meers,1985) แต่การผลิตกรดมะนาวธรรมชาติดังกล่าวนี้ ไม่เพียงพอต่อความต้องการ เนื่องจากจะต้องใช้ผลมะนาวปริมาณมากถึง 30-40 ตัน ในการผลิตกรดมะนาวให้ได้ปริมาณเพียง 1 ตัน (Rohr and Kubicek, 1980) ในเวลาต่อมาจึงมีผู้พยายามคิดค้นกระบวนการผลิตกรดมะนาววิธีต่างๆ ขึ้น ในปี ค.ศ. 1880 Grimoux และ Adams สามารถทำการสังเคราะห์กรดมะนาวจากกลีเซอรอลได้ แต่วิธีการนี้ก็ยังไม่เหมาะสม เนื่องจากวัตถุดิบมีราคาแพง ไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน และเป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ที่มีหลายขั้นตอนอาจเกิดอันตรายได้ (อ้างถึงใน Mattey, 1992) ต่อมาในปีค.ศ. 1893 Wehmer เป็นบุคคลแรกที่พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Mucor* และ *Penicillium* สามารถผลิตกรดมะนาวได้ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบและเรียกกรดมะนาวชนิดนี้ว่า กรดมะนาวจากการหมัก (fermentation citric acid)(อ้างถึงใน Marison, 1988) ในปี ค.ศ. 1917 Currie และคณะรายงานถึงการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* สำเร็จเป็นครั้งแรกและให้ผลผลิตกรดมะนาวที่สูง (อ้างถึงใน Kubicek and Rohr, 1986) จากการค้นพบนี้ทำให้เกิดความสนใจในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมขึ้น โดยในปี ค.ศ. 1919 ได้มีการก่อตั้งโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อผลิตกรดมะนาวขึ้นเป็นแห่งแรกในประเทศเบลเยี่ยมโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ในการผลิต ในระยะต่อมามีการก่อตั้งโรงงานผลิตกรดมะนาวขึ้นอีกหลายแห่งและใช้กระบวนการผลิตโดยการหมักบนผิวหน้าอาหาร (surface culture) โดยใช้น้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิต (Mattey, 1992; Milsom and Meers,1985) ภายหลังสงครามโลกครั้งที่สองได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตเป็นการหมักในอาหารเหลว (submerged

culture) จากวัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลกลูโคสหรือกากน้ำตาล (อ้างถึงใน Rohr and Kubicek, 1980; Mattey, 1992)

การผลิตกรดมะนาวนอกจากเชื้อราแล้วพบว่ายีสต์และแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถผลิตกรดมะนาวได้ (Grewal and Kalra, 1995) ต่อมาในปี ค.ศ 1932 มีรายงานว่า Wieland และ Sanderhoff สามารถผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ได้เป็นครั้งแรกโดยใช้อะซิเตทเป็นวัตถุดิบในการผลิต (อ้างถึงใน Cartledge, 1987) สำหรับแบคทีเรียนั้นพบว่าให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำกว่ายีสต์และราจึงไม่ค่อยได้รับความสนใจในการผลิตระดับอุตสาหกรรม (Marison, 1988) ในปัจจุบันการผลิตกรดมะนาวเพื่อเป็นการค้าจะผลิตจากกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* และบางส่วนผลิตจากยีสต์ *Yarrowia lipolytica* (Mattey, 1992)

1.2 การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ในระดับอุตสาหกรรมจะใช้กระบวนการหมักในอาหารเหลว เนื่องจากให้ผลผลิตในปริมาณที่สูง สามารถทำการปรับปรุงและควบคุมการผลิตได้ง่าย โดยการใช้อุปกรณ์และเทคโนโลยีที่ทันสมัย มีการใช้เนื้อที่และแรงงานน้อยกว่าการหมักในสภาพอาหารแข็ง ถังหมักที่ใช้มีการออกแบบได้หลายรูปแบบ เช่น ถังหมักแบบหอสูง (tower fermentor) ถังหมักแบบกวน (stirred tank fermentor) และถังหมักแบบแอร์ลิฟต์ (air-lift fermentor) (Mattey, 1992) วัสดุที่ใช้ในการทำถังหมักจะต้องเป็นวัสดุที่สามารถทนกรดได้ดี ในระหว่างทำการหมักจะต้องมีระบบทำความเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิที่สูงขึ้นให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆที่จะต้องทำการควบคุม ได้แก่ การกวน การให้อากาศ ค่าความเป็นกรด-ด่างและการกำจัดฟอง (Abou-Zeid and Ashy, 1984)

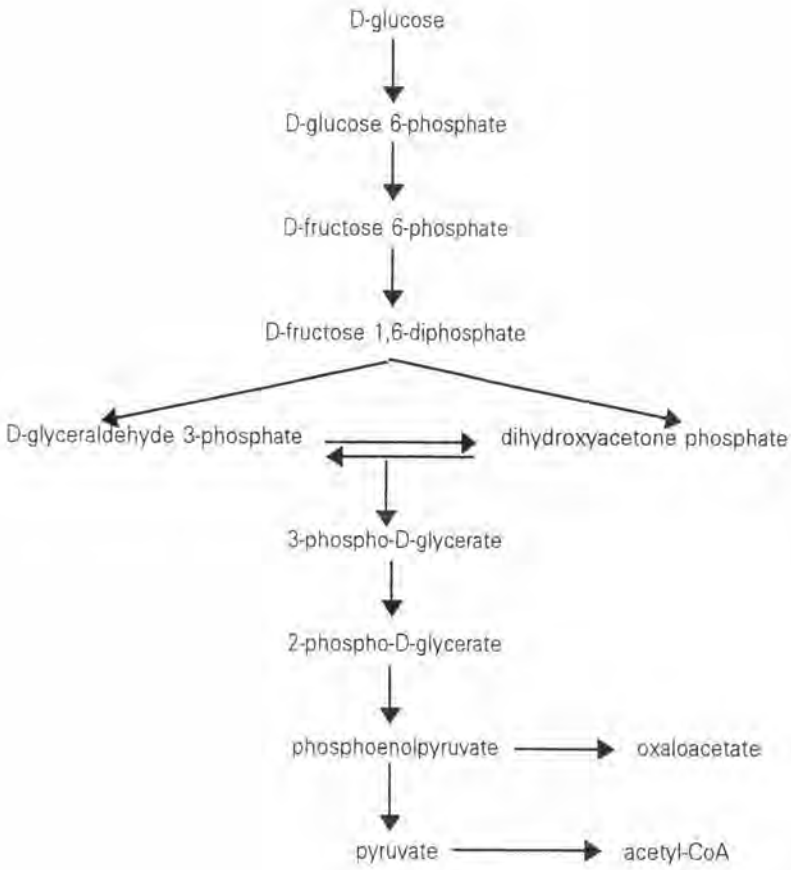
การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ส่วนใหญ่จะทำการหมักแบบแบตช์ เนื่องจากป้องกันระบบการหมักจากการปนเปื้อนได้ดีและสามารถเพิ่มผลผลิตในการหมักแต่ละครั้งได้ การหมักแบบอื่นๆ ได้แก่ การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) (Aiba and Matsuoka, 1979; Klasson, Clausen and Gaddy, 1989) การหมักแบบแบ่งเติมสารอาหารบางอย่าง (fed-batch process) (Rane and Sims, 1995) นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยคาร์ราจีแนนและอัลจิเนต (Rymowicz et al., 1993)

ข้อดีของการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ คือ มีความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด สามารถทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นที่สูงของน้ำตาลได้ มีการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าเชื้อราทำให้ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น มีความไวต่อโลหะและอิออนต่างๆ น้อยกว่าเชื้อรา ไม่มีปัญหาการฉีก

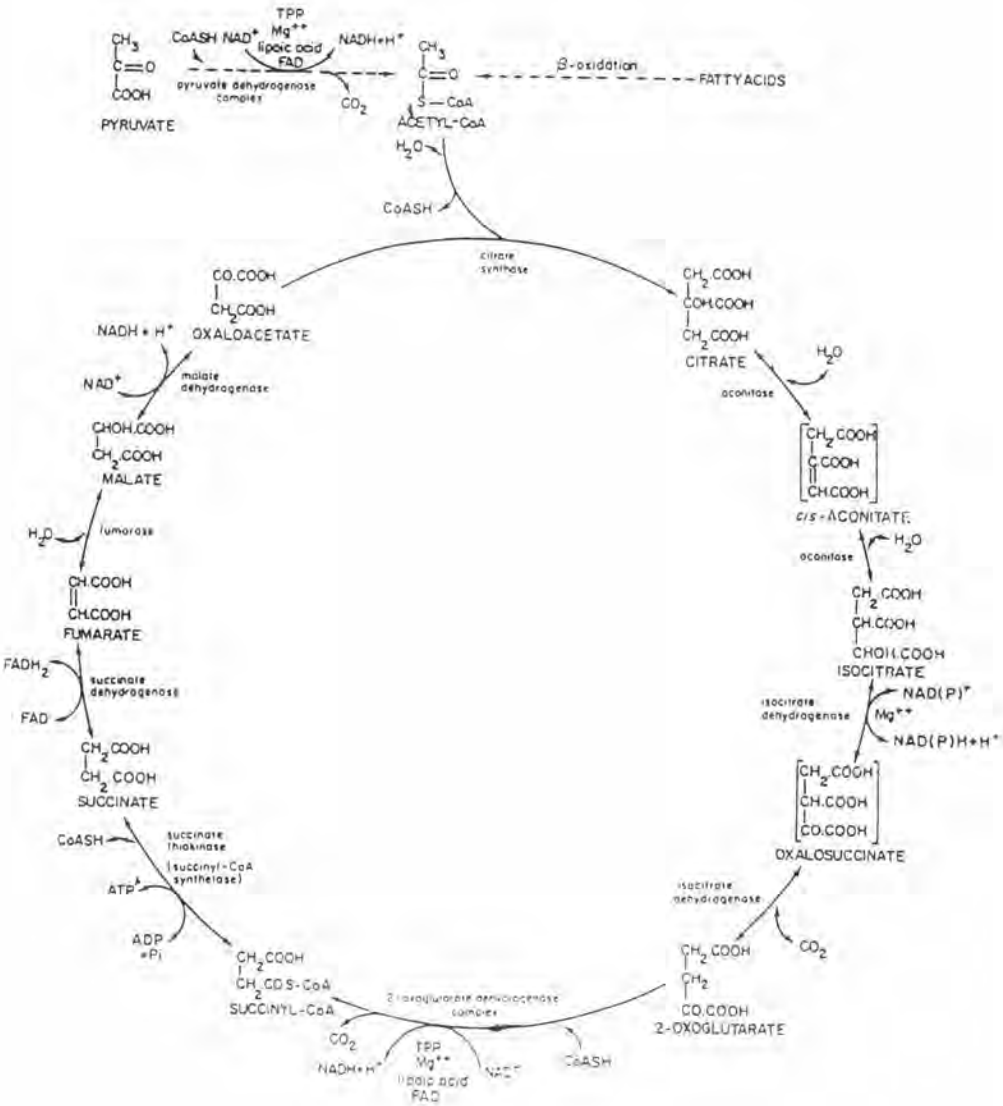
ขาดของเซลล์ในระหว่างทำการหมัก ผลผลิตกรดมะนาวที่ได้ไม่มีการปนเปื้อนจากสีของรงควัตถุ และสามารถทำเป็นกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องได้ทำให้อัตราการผลิตกรดมะนาวสูงกว่าเชื้อรา (Grewal and Kalra, 1995) ส่วนข้อเสียที่พบ คือ มีการปนเปื้อนของกรดไอโซซิทริก (Marison, 1988; Rane and Sims, 1993)

1.3 ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

กรดมะนาวเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle หรือ tricarboxylic acid cycle หรือ citric acid cycle) ซึ่งเกิดในไมโทคอนเดรีย สำหรับกลไกการผลิตกรดมะนาวจากน้ำตาลกลูโคสนั้น พบว่ากรดมะนาวเกิดจากการย่อยสลายกลูโคสผ่านวิถีไกลโคลิซิส (Glycolytic pathway หรือ Embden-Meyerhof Parnas pathway) ดังแสดงในรูปที่1-1 กลูโคสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไพรูเวตและไพรูเวตที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นแอซีทิลโคเอนไซม์เอเพื่อเข้าสู่วิถีการผลิตกรดมะนาวโดยแอซีทิลโคเอนไซม์เอจะรวมตัวกับออกซาโลแอซีเทตโดยอาศัยเอนไซม์ซิเทรตซินเทสได้กรดมะนาวเกิดขึ้นโดยวัฏจักรเครปส์ ดังรูปที่1-2 ในระหว่างการผลิตกรดมะนาวนั้นออกซาโลแอซีเทตในปฏิกิริยาจะถูกสร้างขึ้นจากไพรูเวตรวมตัวกับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอาศัยเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลสช่วยเร่งปฏิกิริยา (Milsom and Meers, 1985) การผลิตกรดมะนาวจะถูกยับยั้งโดยเอนไซม์อะโคนิเทสและไอโซซิเทรตดีไฮโดรจีเนสซึ่งในช่วงที่มีการผลิตกรดมะนาวเอนไซม์ทั้งสองจะมีกิจกรรมต่ำลงในขณะที่ซิเทรตซินเทสจะมีกิจกรรมสูงขึ้น (Miall,1978)



รูปที่ 1-1 ปฏิกิริยาต่างๆของวิถีไกลโคลิซิส
ที่มา: Miall, 1978



รูปที่ 1-2 วัฏจักรเครปส์หรือวัฏจักรกรดมะนาว

ที่มา: Singleton and Sainbury, 1988

1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์เป็นการหมักในสภาพอาหารเหลว มีปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้อง 2 ประการ คือ สายพันธุ์ยีสต์ และภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

1.4.1 สายพันธุ์ของยีสต์

ยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง ได้แก่ *Candida* sp. *Hansenula* sp. *Pichia* sp. *Debaromyces* sp. *Torulopsis* sp. *Zygosaccharomyces* sp. (Marison, 1988) *Candida utilis* (Cassio and Leao, 1991) *Saccharomyces lipolytica, Candida oleophila, Candida tropicalis, Candida guilliermondii, Candida citroformes* (Grewal and Kalra, 1995) โดยเฉพาะในกลุ่มของ *Candida* sp. สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดี การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่จะนำไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวต้องคำนึงถึงประสิทธิภาพการผลิตที่ให้กรดมะนาวในปริมาณสูงและมีปริมาณกรดไอโซซิทริกต่ำ ให้ผลผลิตกรดมะนาวในปริมาณคงที่และสม่ำเสมอ มีความทนต่อโลหะหนักที่มีผลต่อการผลิตได้สูง ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด (Grewal and Kalra, 1995 ; Marison, 1988)

1.4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

1.4.2.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ ได้แก่ กลูโคส อัลเคน กากน้ำตาล (Rane and Sims, 1993) ไฮโดรคาร์บอน กรดไขมัน เอทานอล พาราฟิน (Ikeno et al.,1975)ในการผลิตจะต้องเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ยีสต์ เนื่องจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิตกรดมะนาว (Kim and Roberts, 1991) การจะเลือกใช้สารใดขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในการผลิต ควรเป็นสารที่มีราคาถูก มีปริมาณมาก และสามารถที่จะนำมาใช้ได้ตลอดเวลา

1.4.2.2 แหล่งไนโตรเจน

การผลิตกรดมะนาวจะเกิดขึ้นในภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด แต่ปริมาณไนโตรเจนก็มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ปริมาณและชนิดของไนโตรเจนให้เหมาะสมซึ่งยีสต์สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้ทั้งในรูปของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ (Good et al, 1985 , Kubicek and Rohr, 1986) สารอินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) สารสกัดจากยีสต์ เพปโทน ส่วนสารอนินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมไนเทรต แอมโมเนียมแอซีเทต โซเดียมไนเทรต และยูเรีย (Abou-Zeid and Ashy, 1984; Iizuka et al., 1971)

1.4.2.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นธาตุที่สำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อให้ได้พลังงาน และเป็นองค์ประกอบของส่วนสำคัญต่างๆในเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ และฟอสฟอลิปิด การควบคุมปริมาณฟอสเฟตให้เหมาะสมมีความสำคัญต่อการสะสมและการผลิตกรดมะนาวเนื่องจากฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้ผลผลิตกรดมะนาวลดลง (Kubicek and Rohr, 1986) แหล่งฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ คือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Abou-Zeid and Ashy, 1984)

1.4.2.4 แร่ธาตุ

แร่ธาตุหลายชนิดมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม ทองแดง สังกะสี เป็นต้นโดยแมกนีเซียมซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟตมีความจำเป็นต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว (Iizuka et al.,1971) แมกนีเซียมเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์จำพวกไคเนส (Marison, 1988) ในปี ค.ศ 1977 Furukawa และคณะพบว่าไอออนของทองแดงเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเทสทำให้กรดไอโซซิทริกลดลง ส่วนไอออนของเหล็กที่มากเกินไปจะเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเทสซึ่งจะเปลี่ยนกรดมะนาวไปเป็นกรดไอโซซิทริก ในปีค.ศ.1972 Friedรายงานว่าการเติมสารประกอบของตะกั่วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การผลิตกรดมะนาวของยีสต์ *Candida* มีปริมาณสูงขึ้น ดังนั้นการเลือกใช้สารใดเป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารจะต้องคำนึงถึงชนิดและปริมาณของแร่ธาตุนั้นๆ ซึ่งจะส่งผลต่อการผลิตกรดมะนาว

1.4.2.5 สารเสริมอื่นๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้น อาจจะต้องมีการเติมสารบางอย่าง เช่น ไทอะมีนในรูปของไทอะมีนคลอไรด์ กรดนิโคทินิก และไบโอติน เป็นต้น (Kubicek and Rohr, 1986) ในปี ค.ศ.1973 Tabuchi และHara พบว่าปริมาณไทอะมีนที่เพียงพอจะมีผลต่อการผลิตกรดมะนาว ถ้าขาดไทอะมีนจะทำให้มีการผลิตคีโทกลูทาเลตมากขึ้นและมีซิเทรตลดลง (อ้างถึงใน กำเนิด, 2534) นอกจากนี้สารเสริมชนิดอื่นในรูปของสารประกอบได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ และน้ำแช่ข้าวโพด (Iizuka et al., 1971)

1.4.2.6 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เนื่องจากยีสต์สามารถทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงจำกัดประมาณ 4.5-6.5 ซึ่งต่างจากเชื้อราที่สามารถทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำๆ ได้ (Mattey, 1992) ในระหว่างการหมักจะมีการสะสมกรดมะนาวมากขึ้น ทำให้มีความเป็นกรดมากขึ้นซึ่งมีผลต่อการ

เจริญ ยับยั้งการใช้กลูโคสของยีสต์และทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง (Kim and Roberts, 1991) ดังนั้นการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์จึงจำเป็นต้องเติมสารเพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น (Kubicek and Rohr, 1986) การจะเลือกใช้สารชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสม มีรายงานว่าการใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และสารประกอบของโซเดียม ทำให้ผลผลิตของกรดมะนาวต่ำกว่าที่ควร เนื่องจากจะทำให้กรดมะนาวสลายตัวเกิดเป็นกรดออกซาลิกและกรดแอซีติก(Bouchard and Merritt, 1979)

1.4.2.7 อุณหภูมิและระยะเวลาในการหมัก

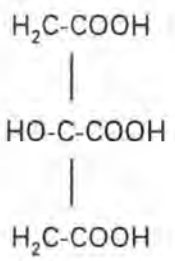
อุณหภูมิในระหว่างการหมักมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต การผลิตและการสะสมกรดมะนาวโดยยีสต์ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส (Marison, 1988) Nakanishi และคณะ (1972) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Candida zeylanoides* KY5802 พบว่าที่อุณหภูมิสูงจะทำให้การเจริญของยีสต์และการผลิตกรดมะนาวลดลง ส่วนที่อุณหภูมิต่ำแม้ว่ายีสต์จะเจริญได้ดีแต่ก็ให้ผลผลิตกรดมะนาวไม่สูงเท่าที่ควร Furukawa และคณะ (1977) ทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์สายพันธุ์กลาย *Candida citrica* MT-1001 พบว่าอุณหภูมิที่สูงกว่า 30 องศาเซลเซียสจะทำให้ผลผลิตกรดมะนาวลดลงแม้ว่าที่อุณหภูมิสูงยีสต์สายพันธุ์นี้จะเจริญได้ดีก็ตาม เนื่องจากยีสต์นำสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตมาก และสร้างกรดอินทรีย์ชนิดอื่นแทนการสร้างกรดมะนาว ระยะเวลาในการหมักกรดมะนาวโดยยีสต์ส่วนใหญ่ใช้เวลา 3-6 วัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ อาหาร และภาวะในการหมัก (Marison, 1988)

1.4.2.8 การให้อากาศ

การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์เป็นการหมักแบบต้องการอากาศดังนั้นในระหว่างการหมัก โดยเฉพาะช่วงที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจำเป็นต้องให้อากาศอย่างเพียงพอ Rane และ Sims (1994) พบว่า เมื่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายมีมากขึ้นจะทำให้อัตราการผลิตกรดมะนาวสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และการถ่ายเทออกซิเจนในถังหมักขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความดันและอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก Okoshi และคณะ(1987) พบว่าการสะสมของกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida tropicallis* จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของออกซิเจน แต่เมื่อออกซิเจนมีระดับสูงกว่า 60 ppm ภายใต้ความดันเท่ากับ 2.0 บรรยากาศจะทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง

1.5 คุณสมบัติของกรดมะนาว

กรดมะนาวหรือกรด 2-ไฮดรอกซี-1,2,3-โพรเพนไทรคาร์บอกซิลิก สูตรทางเคมีคือ $C_6H_8O_7$ มีสูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1-3 กรดมะนาวมีค่า pK ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คือ pKa_1 = 3.128, pKa_2 = 4.761 และ pKa_3 = 6.396 กรดมะนาวปราศจากน้ำ(anhydrous citric acid) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 192.13 ตกผลึกได้จากสารละลายกรดมะนาวเข้มข้นขณะร้อน มีจุดหลอมเหลวที่ 150 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นเท่ากับ 1.665 ส่วนกรดมะนาวโมโนไฮเดรต (citric acid monohydrate) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 210.14 ตกผลึกได้จากสารละลายกรดมะนาวที่เย็น มีจุดหลอมเหลวที่ 100 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นเท่ากับ 1.542 และอุณหภูมิที่เปลี่ยนสภาพ (transition temperature) จากกรดมะนาวโมโนไฮเดรตเป็นกรดมะนาวปราศจากน้ำเท่ากับ 36.6 ± 0.15 องศาเซลเซียส (Bouchard and Merritt, 1979) ลักษณะทั่วไปเป็นผลึกสีขาวมีรสเปรี้ยว มีความเป็นพิษต่ำ มีความสามารถในการละลายน้ำได้สูงโดยขึ้นกับอุณหภูมิและย่อยสลายได้ง่าย กรดมะนาวส่วนใหญ่ผลิตในรูปของกรดมะนาวปราศจากน้ำ กรดมะนาวโมโนไฮเดรต เกลือและเอสเทอร์ของกรดมะนาว (Marison, 1988) คุณลักษณะของกรดมะนาวที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ และที่ผลิตออกจำหน่ายจะต้องได้มาตรฐานตามพระราชบัญญัติมาตรฐานอุตสาหกรรม ดังแสดงในตารางที่ 1-1



รูปที่ 1-3 โครงสร้างของกรดมะนาว
ที่มา: ดัดแปลงจาก Miall, 1978

1.6 มาตรฐานของกรดมะนาว

ตารางที่ 1-1 คุณลักษณะทางเคมีตามมาตรฐานของกรดมะนาว

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด	
		กรดซิทริกโมโนไฮเดรต	กรดซิทริกปราศจากน้ำ
1	ความบริสุทธิ์ $C_6H_8O_7$ คำนวณในสภาพแห้ง ร้อยละ	99.5 ถึง 101.0	99.5 ถึง 101.0
2	น้ำ ร้อยละ	7.5 ถึง 8.8	ไม่เกิน 0.5
3	กากที่เหลือจากการเผา ร้อยละ ไม่เกิน	0.05	0.05
4	ออกซาเลต มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	350	350
5	ซัลเฟต มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	150	150
6	สารหนู มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	3	3
7	โลหะหนัก (คำนวณเป็นตะกั่ว) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	10	10
8	แบเรียม	สารละลายตัวอย่างต้อง ไม่ขุ่นกว่าสารละลายมาตรฐาน สอบเทียบ	
9	แคลเซียม มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	200	200
10	เหล็ก มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
11	คลอไรด์ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
12	สารที่สลายให้คาร์บอนได้ง่าย (readily carbonizable substance)	สีของสารละลายตัวอย่าง ต้องไม่เข้มกว่าสีของสารละลายสีมาตรฐาน	

ที่มา พระราชบัญญัติมาตรฐานอุตสาหกรรม (กรดซิทริก) พ.ศ. 2535

1.7 ประโยชน์ของกรดมะนาว

กรดมะนาวเป็นกรดอินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆเป็นจำนวนมาก องค์การอนามัยโลกและองค์การอาหารและยาให้การยอมรับว่ากรดมะนาวเป็นสารที่เติมลงในอาหารได้โดยปราศจากอันตราย ไม่เป็นพิษ ปลอดภัยในการสัมผัสด้วยมือและย่อยสลายได้ง่าย (Bor-Cle, 1992) ปัจจุบันความต้องการกรดมะนาวมีสูงขึ้นมากและมีแนวโน้มว่าจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ประมาณร้อยละ 2-3 ต่อปี (Goldberg, Peleg and Rokem, 1991) มีการใช้กรดมะนาวในอุตสาหกรรมต่างๆได้แก่ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มประมาณร้อยละ 70 อุตสาหกรรมเภสัชกรรม ร้อยละ 12 และอุตสาหกรรมอื่นๆ อีกประมาณร้อยละ 18 (Marison, 1988) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1.7.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ใช้กรดมะนาวช่วยส่งเสริมกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ประเภท น้ำผลไม้ ลูกกวาด เจลลี เป็นต้น ช่วยลดความฝาด ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ป้องกันการบูดเสียในเครื่องดื่ม เป็นสารป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในน้ำมันและไขมัน ป้องกันการตกผลึกของน้ำผึ้ง ป้องกันการขุ่นของเครื่องดื่มที่ทำจากน้ำผลไม้และยังป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในอาหารแช่แข็ง (Goldberg, Peleg, and Rokem, 1991)

1.7.2 อุตสาหกรรมทางเภสัชกรรม

ใช้กรดมะนาวในยาลดกรดในกระเพาะอาหารโดยใช้ผสมกับไบคาร์บอนเนตซึ่งทำให้เกิดฟองฟูในน้ำดื่ม ใช้เป็นสารปรับกรด-ด่างในยาบางชนิด เกลือแคลเซียมซิเทรตใช้ในการเตรียมสารละลายเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดระหว่างการถ่ายเลือด และช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเตรียมวิตามิน เป็นต้น (Bouchard and Merritt, 1979)

1.7.3 อุตสาหกรรมอื่นๆ

อุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก เริ่มสนใจใช้โซเดียมซิเทรตแทนฟอสเฟตในการผลิตผงซักฟอกเนื่องจากย่อยสลายได้ง่ายกว่าฟอสเฟต และเป็นสารที่ไม่ช่วยเสริมการเจริญเติบโตของวัชพืชในน้ำ ไม่เป็นพิษต่อปลา ทางด้านอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางจะใช้กรดมะนาวเป็นสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในครีมนวดผม น้ำยาดัดผม น้ำยาทำความสะอาดใบหน้าและโลชั่น ในอุตสาหกรรมโลหะใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมในน้ำยาขัดโลหะ น้ำยาล้างสนิม นอกจากนี้ยังใช้กรดมะนาวในระบบการกำจัดก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในเหมืองถลุงแร่โลหะและโรงงานที่มีการใช้ถ่านหินเป็นแหล่งพลังงานโดยใช้สารละลายผสมของโซเดียมซิเทรต กรดมะนาว และโซเดียมไทโอซัลเฟต เป็นตัวดูดซับก๊าซที่เกิดขึ้น เป็นต้น (Bouchard and Merritt, 1979)

1.8 การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากปลูกได้ง่ายและมีเกษตรกรปลูกกันเป็นจำนวนมากเพื่อนำไปผลิตแป้งมันสำปะหลัง แต่ภายหลังจากขั้นตอนการผลิตแป้งมันสำปะหลังแล้วจะมีกากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งแต่เดิมเป็นภาระในการจัดการและการขนส่งเป็นอย่างมาก จะมีการใช้ประโยชน์ได้โดยการนำไปผสมในอาหารสัตว์ ต่อมาพบว่าในกากมันสำปะหลังมีแป้งเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 56 โดยน้ำหนักแห้ง (Grace,1977) แต่มีโปรตีนอยู่ในปริมาณต่ำมาก ดังนั้นจึงมีการศึกษาและวิจัยเพื่อนำกากมันสำปะหลังซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ยิ่งขึ้น ดังเช่นงานวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไปนี้

จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒน์ (2525) ศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Aspergillus niger* An12 จากวัสดุที่ประกอบด้วยกากมันสำปะหลัง ผสมรำข้าวเจ้า

ในประเทศไต้หวัน มีการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Aspergillus niger* จากกากมันสำปะหลังซึ่งทำการหมักแบบแห้ง (อ้างถึงใน อัจฉริยา จารุจินดา, 2539)

สาวิตร ตระกูลน่าเลื่อมใส (2530) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas gelatinosa* จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเป็นอาหารปลาเพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยงและคุณค่าทางอาหารโดยการเลี้ยงผสมกับเชื้อ *Rhodopsaeudomonas sphaeroides* P47

สินีนาถ เจียมอนุกูลกิจ (2539) ศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* NN-39 จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

จิรวรรณ อภิรักษากร (2540)ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลัง

Srikanta et al. (1987) พัฒนาเทคนิคการทำให้เกิดแซคคาริฟิเคชันในกากมันสำปะหลังเพื่อใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์

Jaleel et al. (1988) รายงานการทำให้กากมันสำปะหลังเกิดแซคคาริฟิเคชันและนำมาใช้ผลิตเอทานอล

1.9 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

เนื่องจากมีการใช้กรดมะนาวในอุตสาหกรรมต่างๆเป็นจำนวนมากและประเทศไทยยังมีปริมาณการผลิตกรดมะนาวไม่เพียงพอต่อความต้องการ ต้องนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศทุกปี ดังตารางที่ 1-2 ดังนั้นจึงมีการศึกษากระบวนการผลิตเพื่อให้สามารถผลิตกรดมะนาวภายในประเทศได้อย่างเพียงพอ นอกจากนี้ในการผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากากมันสำปะหลังที่ผ่านการผลิตแป้งมันสำปะหลังแล้วยังคงมีปริมาณแป้งเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 56 (Grace,1977) สามารถที่จะนำมาทำการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกได้สารละลายน้ำตาลกลูโคส นำไปใช้ในการผลิตกรดมะนาว (สินีนาถ, 2539) ซึ่งจะช่วยให้สามารถใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังได้มากขึ้น

สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการวิจัยและทำการกลายพันธุ์ยีสต์ *Candida oleophila* เพื่อพัฒนาการผลิตกรดมะนาว โดยในปี 2539 สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ ทำการกลายพันธุ์และคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพผลิตกรดมะนาวได้ดี งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากยีสต์ *Candida oleophila* สายพันธุ์กลาย โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อปรับปรุงการผลิตกรดมะนาวให้ดีขึ้น

1.10 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1.การคัดเลือก *Candida oleophila* สายพันธุ์กลายจำนวน 5 สายพันธุ์ ที่ผลิตกรดมะนาวได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.ศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าโดย *Candida oleophila* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก

4.ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในระดับขวดเขย่า

ตารางที่ 1-2 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวของประเทศไทยระหว่างปี 2531 - 2542

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	2,226,539	72,735,321
2537	3,484,410	101,905,659
2538	5,568,146	171,830,940
2539	3,056,073	102,561,454
2540	4,535,422	150,003,744
2541	1,285,372	52,478,529
2542 (ม.ค.- ก.พ.)	323,554	12,307,281

ที่มา: กรมศุลกากร