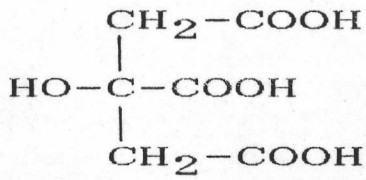
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.ประวัติความเป็นมา

กรดมะนาว (citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ที่มีชื่อทางเคมีว่า กรด 2 ไฮดรอกซี -1,2,3- โพรเพน ไตรคาร์บอกซิลิก (2 hydroxy-1,2,3-propane tricarboxylic acid) จัดเป็นสารตัวกลางที่สำคัญ (key intermediate) ในวัฏจักรเครบ (Kreb's Cycle หรือ Citric Acid Cycle หรือ Tricarboxylic Acid Cycle) ของระบบสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย (1,2)(รูปที่ 1)



รูปที่ 1 โครงสร้างของกรดมะนาว

กรดมะนาวถูกสกัดได้จากพืชตระกูลส้ม (citrus fruits) เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1784 โดย Scheele ซึ่งกรดมะนาวที่ได้จากการสกัดน้ำผลไม้นี้จัดเป็น กรดมะนาวธรรมชาติ (natural citric acid)(1) ประเทศอิตาลีเริ่มผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม โดยการสกัดน้ำผลไม้หลายชนิด เช่น มะนาว ส้ม และสับปะรด และแพร่หลายเข้าไปสู่ประเทศอังกฤษ สหรัฐอเมริกา เยอรมัน และฝรั่งเศส (1,3) ในปีค.ศ. 1893 Wehmer พบว่า เชื้อรา Penicillium ที่หมักในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบสามารถผลิตกรดมะนาวได้ ซึ่งกรดที่ได้นี้จัดเป็น กรดมะนาวจากการหมัก (fermentation citric acid)(1) ต่อมาเชื้อรา Aspergillus niger ที่หมักในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ถูกค้นพบว่า สามารถผลิตกรดมะนาวได้โดย Currie และคณะ ในปี ค.ศ.1917 (3,4) ซึ่งตรงกับรายงานของ Doelger และ Prescott ในปี 1934(1,2,3) การผลิตกรดมะนาวโดยการหมักเชื้อราในอาหารที่

ตารางที่ 1 ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว

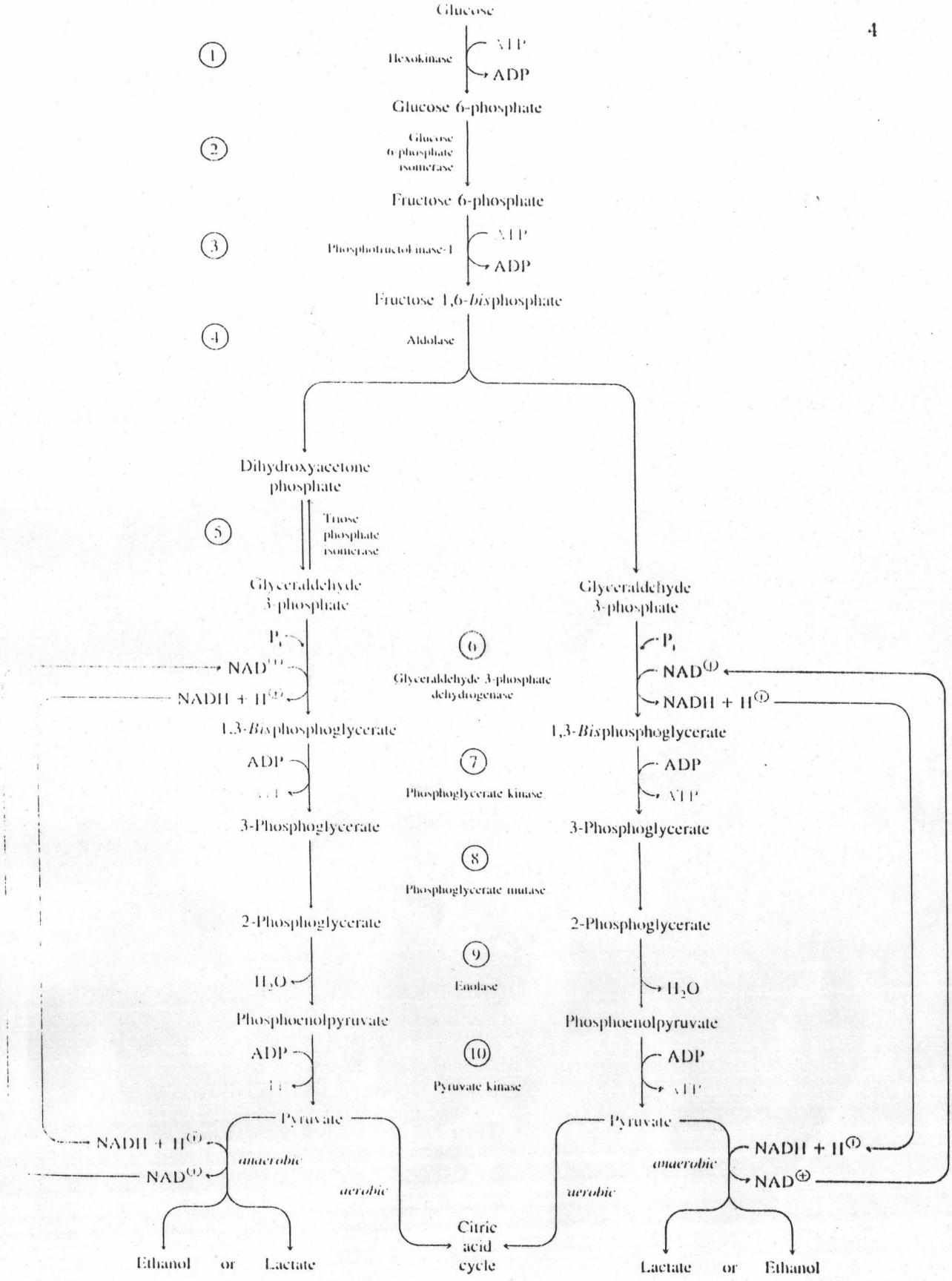
จุลินทรีย์	ชนิดของจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus niger	รา	1,2,3,12,13
A. clavatus	รา	10,13
A. wentii	รา	9
A. luchuensis	รา	2,8,17,24
Penicillium janthinellum	รา	2,8
P. luteum	รา	1,8,9,17
P. restricum	รา	2,8,9
P. critinum	รา	17,24
Mucor piriformis	รา	17,24
Arthrobactor paraffineus	แบคทีเรีย	2,17
Bacillus licheniformis	แบคทีเรีย	8
B. subtilis	แบคทีเรีย	8
Corynebacterium sp.	แบคทีเรีย	17
Candida lipolytica	ยีสต์	2
C. oleophila	ยีสต์	2
C. guilliermondii	ยีสต์	24
C. tropicalis	ยีสต์	4
C. parapsilosis	ยีสต์	4
C. zeylanoides	ยีสต์	4
C. subtropicalis	ยีสต์	4

มีซูโครสเป็นองค์ประกอบในระดับอุตสาหกรรมเริ่มขึ้นในประเทศเบลเยี่ยมในปี ค.ศ.1919 ต่อมามีการนำแหล่งอาหารที่มีราคาถูก เช่น กากน้ำตาล มาใช้แทนน้ำตาล (4) จากการค้นพบนี้ ทำให้การผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยใช้วิธีการหมักด้วยจุลินทรีย์แทนการสกัดจากน้ำผลไม้ (2) ตัวอย่างจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีรายงานว่า สามารถผลิตกรดมะนาวได้ แสดงไว้ในตารางที่ 1

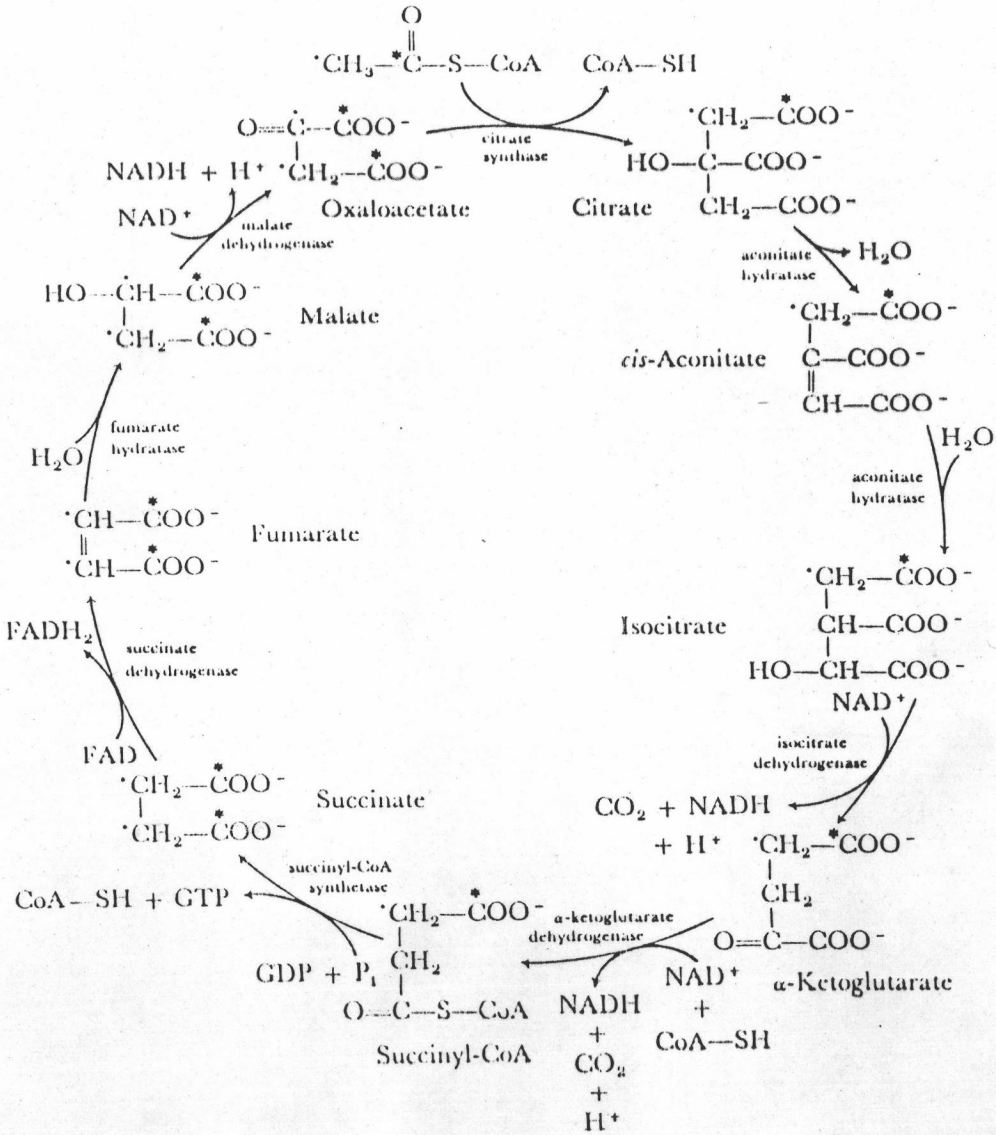
2. การสังเคราะห์กรดมะนาว

เชื้อรา Aspergillus niger สามารถย่อยสลายกลูโคสโดยผ่านวิถีไกลโคไลติค (Glycolytic pathway หรือ Glycolysis) ได้ไพรูเวท (pyruvate) จากนั้นไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนเป็น อะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) โดยมีเอนไซม์ไพรูเวทดีไฮโดรจีเนส (pyruvate dehydrogenase complex) ช่วยเร่งปฏิกิริยา และเปลี่ยนเป็นออกซาโลอะซิเตท (oxaloacetate) โดยมีเอนไซม์ไพรูเวทคาร์บอกซิเลส (pyruvate carboxylase) ช่วยเร่งปฏิกิริยา เมื่อเข้าสู่วัฏจักรเครบเอนไซม์ซิเตรทซินเทส (citrate synthase) จะเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวระหว่าง อะซิติลโคเอซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 2 อะตอม กับ ออกซาโลอะซิเตท ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 4 อะตอม ได้กรดมะนาวซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (5,6)

มีการศึกษาการควบคุมการสังเคราะห์กรดมะนาวโดยเชื้อรามานานกว่า 30 ปี แล้ว ซึ่งการศึกษาโดยทั่วไปนิยมตรวจสอบเอนไซม์ในเซลล์ของ Aspergillus niger ในระหว่างการหมักกรดมะนาว (2,7) ในปี ค.ศ.1981 Rohr และ Kubicek (7) รายงานว่า ถ้าอัตราการทำงานของวิถีไกลโคไลติคสูง จะมีการสะสมกรดมะนาวในปริมาณสูง ดังนั้น Rohr และ Kubicek จึงได้ทำการตรวจสอบเอนไซม์ฟอสโฟฟรุกโตไคเนส (phosphofructokinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ควบคุม (regulatory enzyme) ในวิถีไกลโคไลติคของเชื้อ Aspergillus niger พบว่า เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งโดยกรดมะนาว และ ATP ทำให้เชื้อราผลิตกรดมะนาวลดลง การเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมอิออนจะช่วยลดการยับยั้งของกรดมะนาว ทำให้วิถีไกลโคไลติคทำงานได้ตามปกติ (7,18) การสะสมกรดมะนาวซึ่งเป็นสารตัวกลางตัวหนึ่งในวัฏจักรเครบ (รูปที่ 3)นั้น จะเกิดจากการที่วัฏจักรเครบดำเนินไปไม่ครบวงจร (4,32) เมื่อเอนไซม์



รูปที่ 2 วิถีไกลโคไลติค



รูปที่ 3 วัฏจักรเครบ

ซิเตรทซินเทสเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวระหว่าง ออกซาโลอะซิเตท และ อะซิติลโคเอ ได้กรดมะนาวแล้ว กรดมะนาวจะไปยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) ซึ่งช่วยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไอโซซิเตรท (isocitrate) เป็นออกโซกลูตาเรท (2-oxoglutarate)(2,4) นอกจากนี้ กลูโคส และ แอมโมเนียมอิออน จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ออกโซกลูตาเรทดีไฮโดรจีเนส (2-oxoglutarate dehydrogenase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน ออกโซกลูตาเรทให้เป็น ซัคซิเนท (succinate) การยับยั้งนี้จะช่วยให้เชื้อราสะสมกรดมะนาวได้ปริมาณมาก เนื่องจากเป็นขั้นตอนเดียวในวัฏจักรเครบที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ (32)

3. กระบวนการผลิต

3.1 กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง (Solid State Fermentation หรือ Koji Process)

กระบวนการโคจิเป็นวิธีดั้งเดิมที่นิยมใช้ผลิตกรดมะนาวในประเทศญี่ปุ่น เริ่มต้นจากการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากมันฝรั่งชนิดหวาน ซังข้าวโพด รำข้าว มาเติมน้ำ และนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วจึงนำมาใส่ถาดที่มีความลึก 3-5 ซม. เติมสปอร์ของเชื้อ Aspergillus niger สายพันธุ์ที่เหมาะสม ความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นในอาหารมีค่าเท่ากับ 5.5 หมักที่อุณหภูมิ 30 °ซ. นาน 5-8 วัน ความเป็นกรด-ด่างจะลดลงเหลือประมาณ 2.0 จากนั้นจึงนำมาสกัดเอากรดมะนาว (4,9) วัตถุดิบที่มีแป้ง หรือ เซลลูโลส เป็นองค์ประกอบอาจจะนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ก่อน แล้วจึงเติมสปอร์ของเชื้อรา เพื่อลดระยะเวลาในการหมัก วิธีนี้ให้ผลผลิตประมาณร้อยละ 60-80 กรัม (เทียบจากน้ำตาลที่ใช้)

3.2 กระบวนการหมักบนผิวอาหารเหลว (Surface Process หรือ Liquid State Fermentation หรือ Shallow Pan Process)

กระบวนการนี้เป็นกระบวนการผลิตที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมมา ตั้งแต่ ค.ศ. 1919(2) กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ใช้เงินลงทุนต่ำ และใช้เทคโนโลยีแบบง่ายๆ จึงนิยมใช้มาจนถึงปัจจุบัน(17) เริ่มจากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ เช่น ซูโครส กากน้ำตาลจากหัวบีท ใส่ลงในถาดซึ่งถูกเรียงซ้อนกันไว้บนชั้น ในห้องบ่มที่

ปราศจากเชื้อ(4) ถาดหรือภาชนะก้นแบนที่ใช้ต้องเป็นวัสดุที่ทนทานต่อการกัดกร่อนของกรด เช่น อลูมิเนียม หรือ เหล็กปลอดสนิม (4,8,9) การหมักเริ่มจากการถ่ายสปอร์ของเชื้อ Aspergillus niger ให้กระจายลงบนผิวหน้าของอาหารอย่างทั่วถึง บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 40-60 เป็นเวลานาน 8-12 วัน จนกระทั่งสายใยของเชื้อราเจริญปกคลุมผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลงเหลือ 1.5-2.0 (8,17) เมื่อการหมักสิ้นสุดลงจึงทำการกรองน้ำหมักไปสกัดกรดมะนาว ส่วนเส้นใยของเชื้อราที่เหลืออาจนำไปใช้ในการหมักอีกครั้งหรืออาจแยกทิ้งไป ผลผลิตจากการผลิตแบบนี้ได้กรดมะนาวประมาณ 75 กรัมต่อ กลูโคสที่ใช้ 100 กรัม (4)

3.3 กระบวนการหมักในอาหารเหลว (The Submerged Process หรือ Submerged Fermentation)

ปริมาณกรดมะนาวมากกว่าร้อยละ 80 ของปริมาณที่ผลิตได้ทั้งหมดในปัจจุบันผลิตโดยวิธีการหมักในอาหารเหลว กระบวนการนี้มีข้อได้เปรียบกว่ากระบวนการอื่นคือ ค่าใช้จ่ายด้านแรงงานต่ำ อัตราการผลิตกรดมะนาวสูง และสามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ได้ดี แต่ค่าใช้จ่ายด้านพลังงานจะสูง รวมทั้งต้องใช้บุคคลากรที่มีความสามารถสูงมาควบคุมการผลิตที่ใช้เทคโนโลยีชั้นสูง (17) การหมักในอาหารเหลวนิยมเลี้ยงจุลินทรีย์ในปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) หรือ ถังหมัก (fermentor) ซึ่งถูกสร้างด้วยวัสดุพิเศษที่ทนต่อการกัดกร่อนของกรดที่จะทำลายผิวด้านในของถังหมัก ซึ่งทำให้อิออนของโลหะหลุดออกมาปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สูญเสียสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาว (2) อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้จะมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 14-20 (1,9) ได้แก่ กากน้ำตาล วัสดุ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวฟ่าง แป้งมันฝรั่ง ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (amylase) นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อก่อนเติมหัวเชื้อ Aspergillus niger ที่เตรียมไว้ หรืออาจเติมสปอร์ลงในถังหมักใหญ่ การเตรียมหัวเชื้อจากถังหมักขนาดเล็กก่อน จะมีส่วนช่วยเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาดใหญ่ การหมักจะใช้อุณหภูมิ 30 °ซ. มีการให้อากาศ 0.5-1.5 ลิตร/ลิตรอาหาร/นาที (vvm.) นาน 5-8 วัน แล้วจึงแยกน้ำหมักไปสกัดกรดมะนาว (2,17)

4.ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว

4.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ราหลายชนิดมีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว บางชนิดก็ผลิตได้มาก บางชนิดก็ผลิตได้น้อย บางชนิดก็ผลิตสารอื่นปะปนมามากอันจะมีผลต่อการแยกกรดมะนาว การคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว (1) Aspergillus niger เป็นเชื้อราที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณสูงทั้งในระดับการทดลอง และระดับอุตสาหกรรม จุลินทรีย์ชนิดนี้มีข้อได้เปรียบจุลินทรีย์ชนิดอื่นคือ ให้ผลผลิตสูง ควบคุมกลไกทางชีวเคมีได้อย่างสม่ำเสมอ เพาะเลี้ยงได้ง่าย สร้างผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการในปริมาณต่ำ

4.2 วัตถุดิบ

4.2.1 แหล่งคาร์บอน

เชื้อราโดยทั่วไปใช้สารประกอบคาร์บอน เพื่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ได้มากมายหลายชนิด นับตั้งแต่สารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น น้ำตาล กรดอินทรีย์ และอัลกอฮอล์ ไปจนถึงสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน ลิปิด โพลีแซคคาไรท์ และลิกนิน (23) Aspergillus niger สามารถใช้สารประกอบอินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง น้ำตาลที่มีคาร์บอน 2 3 4 5 6 7 และ 12 อะตอม เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวได้(1) ดังแสดงในตารางที่ 2

นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้ว ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างกรดมะนาว ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวโดยทั่วไปอยู่ระหว่างร้อยละ 14-20 (1) การผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก แต่จะประสบปัญหาการปนเปื้อนสารอื่นที่มีผลทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง แป้งมันสำปะหลังหรือแป้งชนิดอื่นจะถูกนำมาย่อยโดยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (-amylase) แล้วจึงนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ(20) ส่วนน้ำเชื่อม (syrup) และ น้ำตาลชนิดที่ขายทั่วไปตามท้องตลาด หรือ น้ำตาลที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ต้องนำมากำจัดแคทอิออน (cation) โดยผ่านคอลัมน์ เช่น Amberlite IR-20(H) (19,21) กากน้ำตาลชนิดต่างๆมีอิออน และสารอื่นปะปนอยู่มากจะนำมากำจัดอิออนของโลหะที่ปนเปื้อนโดยเติมโปตัสเซียมเฟอร์โรไซยาเนท (potassium ferrocyanate)

ตารางที่ 2 แหล่งคาร์บอนที่เชื้อรา Aspergillus niger สามารถใช้ผลิตกรดมะนาวได้

แหล่งคาร์บอน	เอกสารอ้างอิง
ซูโครส	1,3,10,13
กลูโคส	1,3,12,13
ฟรุกโตส	17,19
แป้งมันฝรั่ง	17
แป้งที่ย่อยแล้ว	17,20
แป้งละลายน้ำ	20
แป้งมันสำปะหลัง	20
กากน้ำตาลจากอ้อย	3,17
กากน้ำตาลจากหัวบีท	3,11,17
กากน้ำตาลจากข้าวโพด	20
กากน้ำตาลจากการทำน้ำตาลทรายขาว (blackstrap molasses)	21
ชานอ้อย (sugar cane bagasses)	22
ของเหลือจากการทำฝ้าย (cotton waste)	14
ของเหลือจากการทำเนย (whey permeate)	2
น้ำตาลจากคารอบ (carob sugar)	2
ของเหลือจากการผลิตเบียร์ (brewery waste)	16
น้ำทิ้งที่ได้จากการผลิตสับปะรด	2
เซลลูโลส (wood hemicellulose)	15

ในปริมาณที่เหมาะสมตามชนิดของกากน้ำตาลและชนิดของจุลินทรีย์ เนื่องจากปริมาณของโปตัสเซียมเฟอร์โรไซยาเนทที่มากเกินพอจะมีอิทธิพลต่อการหมักในขั้นต่อไป (11,17,21) น้ำตาลโมเลกุลเล็กอื่นๆ เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส นิยมใช้ในระดับการทดลองเพื่อศึกษาลักษณะทางชีวเคมี การปรับปรุงสายพันธุ์ และ ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการสร้างกรดมะนาว

4.2.2 แหล่งไนโตรเจน

เชื้อราน้ำไนโตรเจนไปใช้ในการสังเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญภายในเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต และ การสร้างผลิตภัณฑ์ เชื้อราโดยทั่วไปสามารถใช้ได้ทั้งสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen compounds) และสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน (inorganic nitrogen compounds) แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการผลิตกรดมะนาว ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท โซเดียมซัลเฟต แอมโมเนีย และอื่นๆ (1,2) ส่วนเปปโตน ผงสกัดยีสต์ และกากถั่วเหลืองจะช่วยในด้านการเจริญเติบโตได้ดีกว่าในด้านการผลิตกรดมะนาว (25) การเพิ่มแอมโมเนียมอิออนในระหว่างที่การผลิตกรดมะนาวของเชื้อราเริ่มลดลง อาจช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อราได้ เนื่องจากแอมโมเนียมอิออนถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซล (24)

4.2.3 แร่ธาตุ

เชื้อรา Aspergillus niger สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวต้องการแร่ธาตุสำคัญ 4 ชนิด ได้แก่ เหล็ก ทองแดง สังกะสี และแมงกานีส สำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตกรดมะนาว ความเข้มข้นของแร่ธาตุในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตกรดมะนาว จนอาจกล่าวได้ว่า การเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวส่วนหนึ่งขึ้นอยู่ที่การควบคุมความเข้มข้นของแร่ธาตุให้พอเหมาะ ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้และแหล่งอาหารที่ใช้ด้วย (4,17)

Shu และ Johnson (10) รายงานว่า เมื่อมีเหล็กและสังกะสีบนอยู่ในอาหาร ควรจะลดปริมาณฟอสเฟตลงให้พอเหมาะแก่การเจริญและการผลิตกรดมะนาว อย่างไรก็ตามถ้าลดปริมาณฟอสเฟตลงมากเกินไปจะทำให้เชื้อราเจริญช้า และการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตกรดมะนาวก็ลดลงด้วย ส่วนปริมาณแมงกานีสที่มากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อลิตร

จะมีผลให้การสะสมกรดมะนาวลดน้อยลงในอาหารที่มีฟอสเฟตต่ำ (10) ในปี ค.ศ.1966 Clark และคณะ (27) ทำการกำจัดแร่ธาตุออกจากกากน้ำตาลที่ใช้ผลิตกรดมะนาว พบว่า แมงกานีสอิออนมีผลให้การผลิตกรดมะนาวลดลง มากกว่าผลจากการเติมเหล็กและสังกะสี

สำหรับแร่ธาตุอื่นๆ เช่น อลูมิเนียมอิออน โมลิบดิเนียมอิออน ในความเข้มข้นที่พอเหมาะ จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อรา แต่ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโต ส่วนผลกระทบเนื่องจากแร่ธาตุดังกล่าว ต่อการผลิตกรดมะนาว ยังไม่ทราบชัดเจน (8)

4.3 สภาวะการเลี้ยงเชื้อ

4.3.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวอยู่ในช่วง 28-30 °ซ. ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อราโดยทั่วไป สำหรับ Aspergillus niger นั้นเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 28-30 °ซ. เช่นกัน(25)

4.3.2 ความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวนั้น ความเป็นกรด-ด่างของอาหารจะอยู่ในช่วง 1.7-2.0 ซึ่งการรักษาความเป็นกรด-ด่างจะมีส่วนสำคัญที่จะช่วยให้การผลิตกรดมะนาวดำเนินต่อไปได้ สำหรับเชื้อรา Aspergillus niger นั้นเมื่อความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 2 จะได้กรดมะนาวเป็นผลิตภัณฑ์หลัก แต่ถ้าความเป็นกรด-ด่างของอาหารสูงกว่า 3 จะมีการสะสมกรดออกซาลิค (oxalic acid) และ กรดกลูโคนิค (gluconic acid) ในปริมาณที่มากกว่ากรดมะนาว (2,4)

4.3.3 อัตราการให้อากาศ

การให้อากาศจัดเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับกระบวนการหมักในอาหารเหลว การให้ออกซิเจนบริสุทธิ์จะช่วยเพิ่มการสร้างกรดมะนาวได้ดี แต่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย จึงไม่เป็นที่นิยม การควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักสามารถทำได้ โดยปรับอัตราการให้อากาศ ซึ่งส่วนใหญ่อัตราการให้อากาศอยู่ในช่วง 0.5-1.0 ลิตร/ลิตรอาหาร/นาที

5.ประโยชน์ของกรดมะนาว

องค์การอนามัยโลก และ องค์การอาหารและยา ให้การยอมรับกรดมะนาวว่าเป็นสารที่เติมลงในอาหารได้โดยปราศจากอันตราย เนื่องจากเป็นกรดที่มีรสชาดดี มีความสามารถในการละลายสูง และย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ (2,4) ในปัจจุบันมีการนำกรดมะนาวไปใช้ในอุสาหกรรมหลายชนิด (2,3,4) ได้แก่

อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

กรดมะนาวปริมาณมากกว่าร้อยละ 60 ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม(2) กรดมะนาวที่ใช้ผสมลงในอาหาร และเครื่องดื่ม ใช้เพื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เพิ่มกลิ่นรส ลดความฝาด ป้องกันการสลายตัวของวิตะมินซี (ascorbic acid) ป้องกันการขุ่นของเครื่องดื่มที่ทำจากน้ำผลไม้ และช่วยในการเก็บรักษาเพื่อถนอมอาหาร ตัวอย่าง อาหาร และเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของกรดมะนาว ได้แก่ น้ำหวาน น้ำอัดลม เยลลี่ แยม เนยแข็ง ซอส น้ำเชื่อม ลูกอม ลูกกวาด ไอศกรีม ไวน์ชนิดต่างๆ อาหารแช่แข็ง ผลิตภัณฑ์นม และน้ำตาลอินเวอร์ท

อุตสาหกรรมยา

ใช้กรดมะนาวเพื่อเป็นตัวทำละลาย ช่วยให้ยาแตกตัวได้ดีขึ้น ช่วยเพิ่มฟองฟู่ร่วมกับไบคาร์บอเนท และป้องกันการจับตัวเป็นก้อน

อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์

ใช้กรดมะนาวเพื่อเป็นตัวป้องกันการออกซิไดซ์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง เป็นบัฟเฟอร์ (buffer) ในส่วนผสมของเครื่องสำอางค์

อุตสาหกรรมอื่น ๆ

ใช้กรดมะนาวเพื่อแทนฟอสเฟตในอุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมการฟอกย้อม เป็นบัฟเฟอร์ในอุตสาหกรรมการถ่ายภาพ อุตสาหกรรมผลิตน้ำมัน อุตสาหกรรมซีเมนต์ อุตสาหกรรมโพลีเมอร์ และใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

6. มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

กรดมะนาวเป็นกรดที่นิยมใช้แพร่หลายในอุตสาหกรรมหลายชนิด ความต้องการกรดมะนาวในตลาดมีปริมาณสูง แต่ในประเทศไทยมีโรงงานผลิตกรดมะนาวเพียงโรงงานเดียว ได้แก่ บริษัทอุตสาหกรรมกรดมะนาว จำกัด ซึ่งใช้วิธีการผลิตแบบการหมักบนอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลัง เป็นวัตถุดิบนั้น ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ยังไม่พอเพียงต่อความต้องการของตลาดภายในประเทศ อันเป็นผลให้ประเทศไทย ต้องสั่งซื้อกรดมะนาวจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 3

สำหรับประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีผลผลิตที่ได้จากการเกษตรที่มีราคาถูกอยู่หลายชนิด เช่น แป้งมันสำปะหลัง ซังข้าวโพด กากรำข้าว กากถั่วเหลือง เป็นต้น และประเทศไทยกำลังก้าวเข้าสู่การเป็นประเทศกึ่งอุตสาหกรรม ทำให้อุตสาหกรรมซึ่งใช้วัตถุดิบจากการเกษตร เป็นอุตสาหกรรมที่ได้รับความสนใจทั้งทางภาครัฐบาลและเอกชน การพัฒนาการผลิตวัตถุดิบทางเกษตรกรรมที่มีราคาถูกให้เป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมที่มีราคาแพงขึ้น จึงเป็นปัจจัยพื้นฐานในการพัฒนา อุตสาหกรรมการเกษตรของประเทศ

งานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อรา Aspergillus niger สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว ในระดับขวดเขย่า สำหรับนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และขยายส่วนต่อไป

ตารางที่ 3 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าและส่งออกกรดมะนาวของประเทศไทย

การนำเข้า			การส่งออก		
พ.ศ.	ปริมาณการนำเข้า (ก.ก.)	มูลค่า (บาท)	พ.ศ.	ปริมาณการส่งออก (ก.ก.)	มูลค่า (บาท)
2523	543,216	19,655,734			
2524	648,075	24,726,395	2524	64,100	2,022,462
2525	297,168	9,146,429	2525	125,378	3,154,090
2526	420,106	13,649,075	2526	104,434	2,957,901
2527	751,338	23,604,120			
2528	738,142	27,484,485	2528	126,950	3,429,857
2529	441,486	15,038,971	2529	339,000	9,286,195

* ธนาคารกรุงเทพ จำกัด

7. ขั้นตอนการดำเนินงาน

7.1 คัดเลือกเชื้อรา Aspergillus niger สายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า

7.2 หาชนิดและปริมาณสารแหล่งคาร์บอน สารแหล่งไนโตรเจน และสารอาหารอื่นที่จำเป็นต่อการผลิตกรดมะนาว ของเชื้อราสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว ในระดับขวดเขย่า

7.3 หาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว ของเชื้อราสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว ในระดับขวดเขย่า

7.4 ศึกษาการผลิตกรดมะนาวของเชื้อรา Aspergillus niger สายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

017234