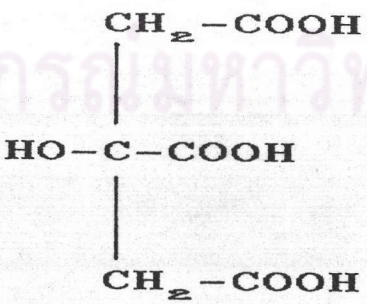
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1. คุณสมบัติของกรดมะนาว

กรดมะนาว (citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีคาร์บอนอยู่ 6 อะตอมใน 1โมเลกุล มีหมู่ฟังก์ชันนัล (functional group) คือ หมู่คาร์บ็อกซิล(carboxyl group) 3 หมู่และมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) 1 หมู่ มีชื่อทางเคมีว่า กรด 2-ไฮดรอกซี-1,2,3-โพรเพนไตรคาร์บอกไซลิก (2-hydroxy-1,2,3-propanetri carboxylic acid) และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 1 [1,2,3,4] กรดมะนาวที่อยู่ในรูปที่ปราศจากน้ำ (anhydrous form หรือ $C_6H_8O_7$) จะมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 153 ° ซ. มีค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.542[5] ผลิตได้จากการตกตะกอนสารละลายของกรดมะนาวขณะที่ร้อนอยู่ ส่วนกรดมะนาวชนิดที่มีน้ำอยู่ 1 โมเลกุล(mono hydrate form หรือ $C_6H_8O_7.H_2O$)มีจุดหลอมเหลวที่ 100° ซ. ผลิตได้จากการตกตะกอนสารละลายของกรดมะนาวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 36.6° ซ.[2] กรดมะนาวละลายได้ดีในน้ำและอัลกอฮอล ละลายได้น้อยในอีเธอร์[5] ซึ่งความสามารถในการละลายน้ำของกรดชนิดนี้จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ โดยถ้าอุณหภูมิยิ่งสูงก็จะละลายในน้ำได้ดียิ่งขึ้นดังแสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว

ตารางที่ 1 ความสามารถในการละลายของกรดมะนาวในน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ[๘]

อุณหภูมิ(°ซ.)	ร้อยละของกรดมะนาว	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	$C_6H_8O_7$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ประวัติความเป็นมาของการผลิตกรดมะนาว

ในปี ค.ศ.1784 Scheele สามารถสกัดแยกและตกผลึกกรดมะนาวจากน้ำมะนาวได้เป็นครั้งแรก[1,2,3,4,7,8] กรดมะนาวนี้นอกจากจะพบในน้ำมะนาวแล้วยังพบในน้ำผลไม้อีกหลายชนิด ได้แก่ ส้ม สับปะรด ลูกแพร์ ผลมะเดื่อ เป็นต้นรวมเรียกผลไม้ประเภทนี้ว่าผลไม้ตระกูลส้ม (citrus fruits) ในระยะแรกของการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมนั้น ผลิตได้จากการตกตะกอนสารละลายของกรดมะนาวในน้ำผลไม้ในรูปของเกลือแคลเซียมซิเตรต (calcium citrate) เรียกกรดมะนาวที่ผลิตได้จากผลไม้เหล่านี้ว่า กรดมะนาวธรรมชาติ (natural citric acid)[3,4] กระบวนการผลิตกรดด้วยวิธีดังกล่าวนี้ ในการผลิตกรดมะนาวปริมาณ 1 ตัน ต้องใช้ผลมะนาวปริมาณถึง 30-40 ตัน[8] ซึ่งในช่วงประมาณปี ค.ศ.1922 อิตาลีเป็นประเทศที่ผลิตกรดมะนาวในรูปของเกลือแคลเซียม จากกระบวนการดังกล่าวข้างต้นได้มากถึงร้อยละ 90 ของการผลิตกรดมะนาวทั้งหมดทั่วโลก ความต้องการกรดชนิดนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ประกอบกับการใช้ผลไม้ประเภทนี้เพื่อผลิตเครื่องดื่มมากขึ้น[3] ผลคือการผลิตกรดมะนาวธรรมชาติไม่เพียงพอต่อความต้องการ และมีราคาสูงขึ้น ทำให้มีผู้พยายามคิดค้นกระบวนการการผลิตกรดมะนาวแบบต่างๆ ขึ้น เช่น การสังเคราะห์ทางเคมีของกรดมะนาวจากกลีเซอรอลจากการค้นพบของ Grimoux และ คณะในปี ค.ศ.1880[2] แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสมอันเนื่องมาจากการใช้วัตถุดิบที่มีราคาแพง และเป็นอันตรายรวมทั้งปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นมีหลายขั้นตอนทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน ต่อมาในปี ค.ศ.1893 Wehmer เป็นคนแรกที่ค้นพบว่าเชื้อรา Penicillium glucum และ Mucor ที่หมักในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบสามารผลิตกรดมะนาวได้[1,2,3,4,7,8] เรียกกรดมะนาวชนิดนี้ว่า กรดมะนาวจากการหมัก(fermentation citric acid) Wehmer พยายามพัฒนากระบวนการผลิตโดยใช้เชื้อราที่เขาค้นพบเพื่อขยายเข้าสู่ในระดับอุตสาหกรรม แต่ไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องจากปัญหาจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น และระยะเวลาที่ใช้ในการหมักยาวนานเกินไป[8] ต่อมาในปี ค.ศ.1916 ปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้ เมื่อ Currie และคณะ พบว่า เชื้อรา Aspergillus niger ที่หมักบนอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 2 (จากค่าความเป็นกรดด่างนี้ช่วยลดปัญหาการปนเปื้อน

เป็นจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้) สามารถผลิตกรดมะนาวได้ผลผลิตสูงเกินกว่าร้อยละ 60 ในระยะเวลาเพียง 1-2 สัปดาห์ ดังนั้นในปี ค.ศ.1919 โรงงานอุตสาหกรรมแห่งแรกที่ผลิตกรดมะนาวจากการหมักถูกสร้างขึ้นในประเทศเบลเยี่ยม แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนากระบวนการผลิต การศึกษาองค์ประกอบอาหารที่ใช้ในการหมัก รวมทั้งการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตสูงก็ยังคงดำเนินต่อไปดังสรุปได้ตาม ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การพัฒนากระบวนการผลิตกรดมะนาวในช่วงระยะเวลาต่างๆ[1]

1893	Wehmer ค้นพบว่าเชื้อรา Cytromyces (ปัจจุบันคือ Penicillium sp.) สามารถผลิตกรดมะนาวได้
1917	Currie สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวจากเชื้อ Aspergillus nigerได้
1919	โรงงานอุตสาหกรรมผลิตกรดมะนาวจากการหมักแห่งแรก ถูกสร้างขึ้นที่ประเทศเบลเยี่ยม (Societe des Produits Organiques de Tirlemont)
1923-1938	มีการสร้างโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกรดมะนาวอื่นๆ อีกใน เบลเยี่ยม (Sturge) เชคโกสโลวาเกีย (Kaznejov) อเมริกา (Pfizer) สหภาพโซเวียต และ เยอรมันนี(Benckiser)
1930	Bernhauers ศึกษากระบวนการผลิตกรดมะนาวโดยวิธีการหมักบนผิวอาหารเหลว (surface citric acid production)
1944	บริษัท Szusc ศึกษากระบวนการผลิตกรดมะนาวโดยวิธีการหมักในอาหารเหลว (submerged process) เป็นครั้งแรก
1947	Johnson ศึกษากระบวนการผลิตกรดมะนาวโดยวิธีการหมักในอาหารเหลว ซึ่งใช้เป็นพื้นฐานในการผลิตกรดในระดับอุตสาหกรรมต่อไป
1968	Tanaka และคณะ ได้จดทะเบียนเอกสารสิทธิบัตรเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นสารแหล่งคาร์บอน

ในระยะต้นของศตวรรษที่ 18 ปรากฏการณ์การสลายตัวไปอย่างรวดเร็วของน้ำมันดิบรวมทั้งก๊าซจำพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น มีเธน อีเธน โปรเพน และบิวเธนที่เกิดการรั่วซึมจากใต้พื้นผิวโลกบริเวณที่แหล่งน้ำมันดิบอยู่ แล้วกระจายออกสู่พื้นผิวดินและผิวน้ำ ยังไม่สามารถหาคำอธิบายได้อย่างแน่ชัด การสลายตัวของสารดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเกินกว่าการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาเคมีธรรมดา[8] ต่อมามีการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้มากขึ้นทำให้ทราบว่าเกิดจากจุลินทรีย์ทั่วไปที่มีอยู่บนพื้นผิวดินและในน้ำนั่นเอง ซึ่งตรงกับรายงานของ Miyoshi ในปี ค.ศ.1895 เกี่ยวกับความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อรา Botrytis cinera บนอาหารที่มีนอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตาม การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ นั้นมีอยู่น้อยมาก จนกระทั่งในช่วงทศวรรษที่ 60 นี้เอง การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์ของนอร์มัล พาราฟฟินส์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein)[9] รวมทั้งผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น กรดอะมิโน[10,11] วิตะมิน[12] โคเอ็นไซม์ กรดอินทรีย์[13,14] ฯลฯ ได้กระทำกันอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่น ต่อมาในปี ค.ศ.1966 Tanaka และคณะ พบว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น Corynebacterium[15] Arthrobacter[16,17] และ Brevibacterium[15] สามารถผลิตกรดมะนาวได้โดยใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์ที่มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนในช่วง 9 ถึง 30 อะตอมเป็นแหล่งคาร์บอน แต่การค้นพบของเขาไม่สามารถขยายเข้าสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ จนกระทั่งมีการค้นพบยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์ เป็นแหล่งคาร์บอนและผลิตกรดมะนาวได้ในปริมาณสูงนอกจากจุลินทรีย์ที่กล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีอีกหลายชนิดที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ในอาหารที่นอร์มัล พาราฟฟินส์ เป็นแหล่งคาร์บอนดังแสดงใน ตารางที่ 3 ในปัจจุบัน ถึงแม้ว่าเชื้อรายังคงเป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้การผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมอันสืบเนื่องมา ตั้งแต่อดีตก็ตามแต่การศึกษาค้นคว้าเพื่อพัฒนาการผลิตยังคงดำเนินต่อไปเรื่อยๆ โดยเฉพาะในระยะหลังก็หันมาสนใจศึกษาเชื้อยีสต์กันมากขึ้น จนกระทั่งบริษัท Liquichimica ในประเทศอิตาลีเป็นบริษัทแรกที่ผลิตกรดมะนาวโดยใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นวัตถุดิบซึ่งสามารถผลิตกรดมะนาวได้ถึง 53,000 ตันต่อปี[2]

ตารางที่ 3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวโดยใช้นอร์มัลพาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์	ชนิดของจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Candida lipolytica	ยีสต์	18,19,20,21,22
Candida tropicalis	ยีสต์	18,23
Candida oleophila	ยีสต์	24,25
Candida zeylanoides	ยีสต์	16,26,27,28
Candida citrica	ยีสต์	29
Candida sp.	ยีสต์	18,30
Brettanomyces classenii	ยีสต์	15,31
Hansenula silvicola	ยีสต์	15,31
Kloeckera sp.	ยีสต์	15,31
Torulopsis famata	ยีสต์	17
Saccharomyces acidifaciens	ยีสต์	15
Trichosporon behrendii	ยีสต์	15
Trichosporon capitatum	ยีสต์	15
Debaryomyces hansenii	ยีสต์	15
Penicillium janthinellum	รา	17,32
Penicillium restrictum	รา	32
Penicillium paraherquei	รา	32
Aspergillus elegan	รา	32
Aspergillus glucus	รา	15
Brevibacterium flavum	แบคทีเรีย	15
Micrococcus ammoniagenes	แบคทีเรีย	15
Corynebacterium hydrocarboclastus	แบคทีเรีย	15

3. ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

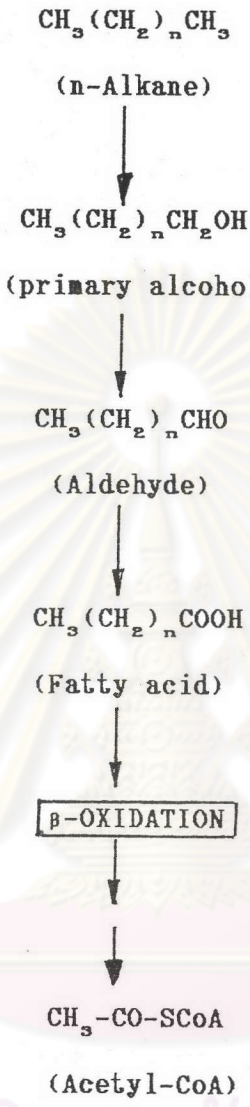
วัฏจักรเครบ(Krebs'cycle หรือTricarboxylic acid cycle หรือ Citric acid cycle) เป็นแนวทางที่สำคัญของการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อจุลินทรีย์ กรดมะนาวจัดเป็นผลิตภัณฑ์ของเมตาบอลิซึมแบบปฐมภูมิ(primary metabolite) ซึ่งในสภาวะปกติทั่วไปกรดชนิดนี้ถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ในปริมาณน้อย ดังนั้นกรดมะนาวที่ถูกผลิตในปริมาณสูงๆ เกิดขึ้นได้จากความผิดพลาดของการทำงานในวัฏจักรเครบและความบกพร่องของจีนส์ (genes)ที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์บางตัวในวัฏจักรนี้[2,4,8] สำหรับเอ็นไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดมะนาวโดยการหมักนี้ได้แก่ เอ็นไซม์อะโคนิเตรต ไฮดราเทส (aconitate hydratase) ไอโซซิเตรต ดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase)และซิเตรตซินเทส (citrate synthase)โดยในช่วงการสะสมกรดมะนาวเอ็นไซม์สองชนิดแรกจะมีกิจกรรมในระดับต่ำ ในขณะที่เอ็นไซม์ซิเตรตซินเทสมีกิจกรรมในระดับสูง[4,33] จึงทำให้เกิดการรวมตัวของอะซิทิลโคเอ (acetyl CoA) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 2 อะตอมกับออกซาโลอะซิเตรต (oxaloacetate) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 4 อะตอมเกิดเป็นกรดมะนาวขึ้นมา[34]

สำหรับยีสต์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีนอร์มัลพาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น เริ่มต้นจะต้องมีการออกซิไดซ์นอร์มัล พาราฟฟินส์หรือที่รู้จักโดยทั่วไปว่านอร์มัล อัลเคนส์(n-alkanes)ให้กลายเป็น สารประกอบจำพวกอัลกอฮอล (primary alcohol)เสียก่อนโดยมีระบบที่ซับซ้อนของเอ็นไซม์ไฮดรอกไซเลส (complex hydroxy lase system)เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา[9,35] ซึ่งเอ็นไซม์ของระบบนี้จะแตกต่างกันออกไปแล้วแต่ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากนั้นสารประกอบจำพวกอัลกอฮอลจะถูกออกซิไดซ์ต่อจนกลายเป็นอัลดีไฮด์(aldehyde) และเป็นกรดไขมัน(fatty acid)ในที่สุด(รูปที่ 2) โดยมีเอ็นไซม์อัลกอฮอล ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) และเอ็นไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำขึ้นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาตามลำดับ ปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นจะเกิดขึ้นในไมโครโซม(microsome)ของเซลล์ จากนั้นกรดไขมันที่ได้จะถูกออกซิไดซ์ต่อโดยผ่านกระบวนการเบต้า ออกซิเดชั่น(β-oxidation) ซึ่งเกิดขึ้นที่เปอร์ออกซีโซม(peroxisome)[36] จนได้อะซิทิล โคเอเมื่อนอร์มัล อัลเคนส์มีจำนวนอะตอม

ของคาร์บอนเป็นเลขคู่ หรือได้โปรปิโอนิลโคเอ(propionyl CoA) กับอะซิทิลโคเอ เมื่อนอร์มัล อัลเคนมีจำนวนอะตอมของคาร์บอนเป็นเลขคี่ จากนั้นอะซิติล โคเอจะผ่านเข้าสู่วัฏจักรเครปต่อไปโดยรวมตัวกับออกซาโลอะซิเตรตได้เป็นกรดมะนาวขึ้น(รูปที่ 4) ส่วนโปรปิโอนิลโคเอนั้นจากรายงานของBoulton และ Ratledge(1984)โดยทำการศึกษาในยีสต์ Candida lipolyticaพบว่าโปรปิโอนิลโคเอจะผ่านเข้าวัฏจักรกรดเมทธิลซิตริก (Methyl citric acid cycle) ดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาเคมีควบคู่ไปกับวัฏจักรเครป โดยสารตัวกลางที่เกิดขึ้นจะคล้ายคลึงกันแต่จะแตกต่างกันตรงที่จะเกิดกรดที่มีคาร์บอน 7 อะตอมแทนกรดที่มีคาร์บอน 6 อะตอม[33,37]ได้แก่เมทธิลซิเตรต(methyl citrate) เมทธิลซิสอะโคนิเตรต (methyl cisaconitate) เมทธิลไอโซซิเตรต (methyl isocitrate) ซึ่งต่อมาเมทธิลไอโซซิเตรตจะถูกเปลี่ยนเป็น ซัคซิเนต(succinate)และไพรูเวต(pyruvate) จากนั้นจึงจะเข้าสู่วัฏจักรเครปต่อไปโดยวัฏจักรทั้ง 2 นี้จะเกิดขึ้นที่ไมโตคอนเดรีย(mitochondria)[34,35] ของเชื้อจุลินทรีย์

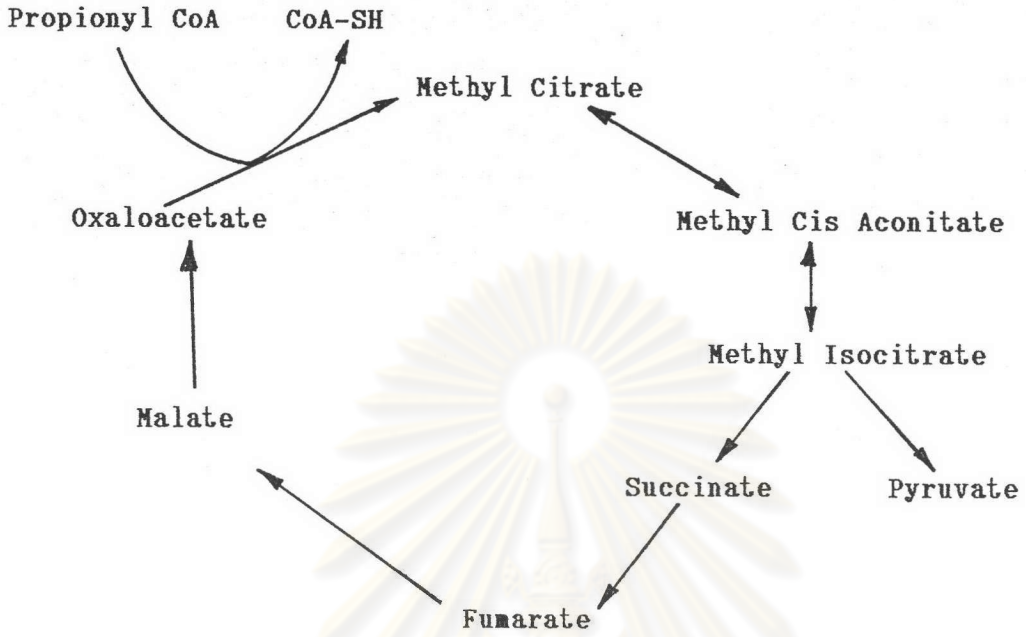
นอกจากนี้แล้ว การสังเคราะห์กรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน ยังอาศัยวัฏจักรไกลออกซาเลต(glyoxylate cycle)ได้อีกทางหนึ่ง ดังแสดงในรูปที่ 4 วัฏจักรนี้จะเกิดขึ้นในเปอร์ออกซีโซม[36] เช่นเดียวกับการเกิดเบต้าออกซิเดชั่นของกรดไขมัน ทำหน้าที่ในการช่วยสร้างสารตัวกลางบางตัวเพิ่มให้กับวัฏจักรเครป เช่น มาเลต ซัคซิเนต เป็นต้น จากนั้นสารเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปกลายเป็น ออกซาโลอะซิเตรตซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสร้างกรดมะนาว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

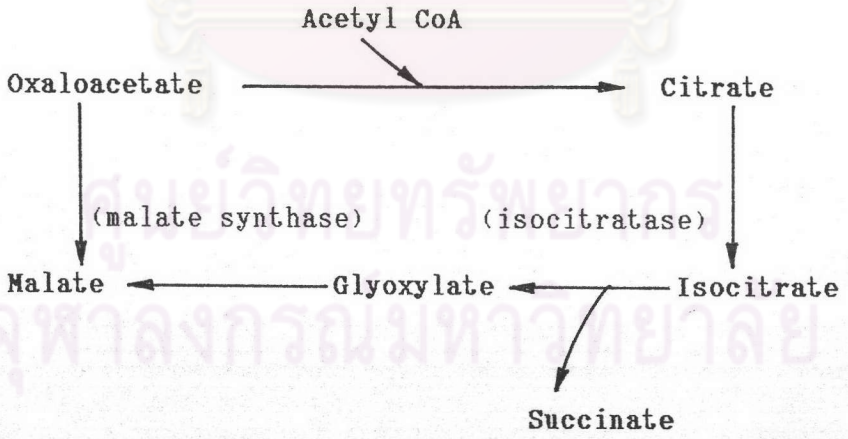


รูปที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของนอร์มัล พาราฟฟินส์จนได้อะซิทิล โคเอ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

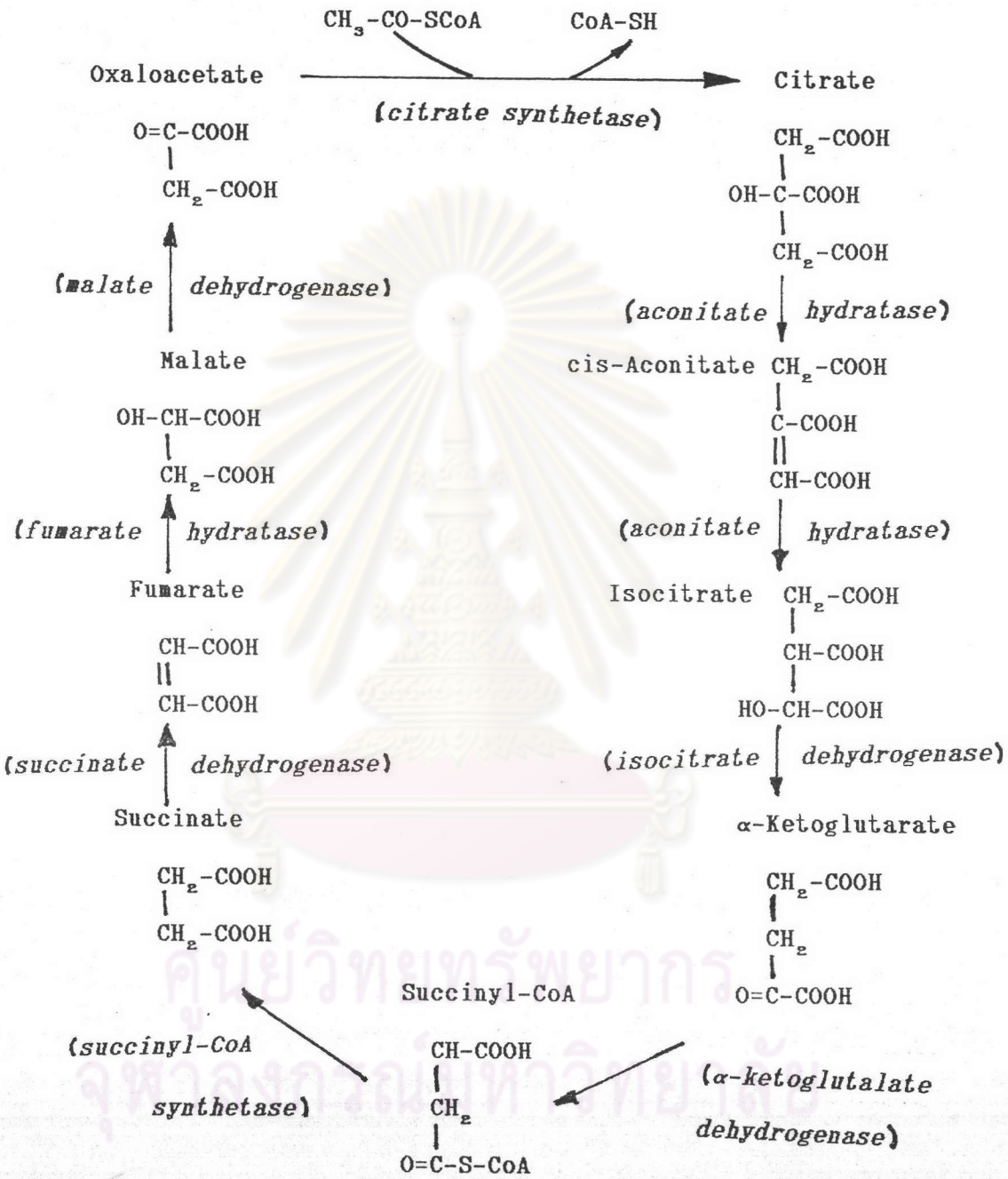


รูปที่ 3 วัฏจักรกรดเมทธิลซิตริก (Methyl Citric Acid Cycle)



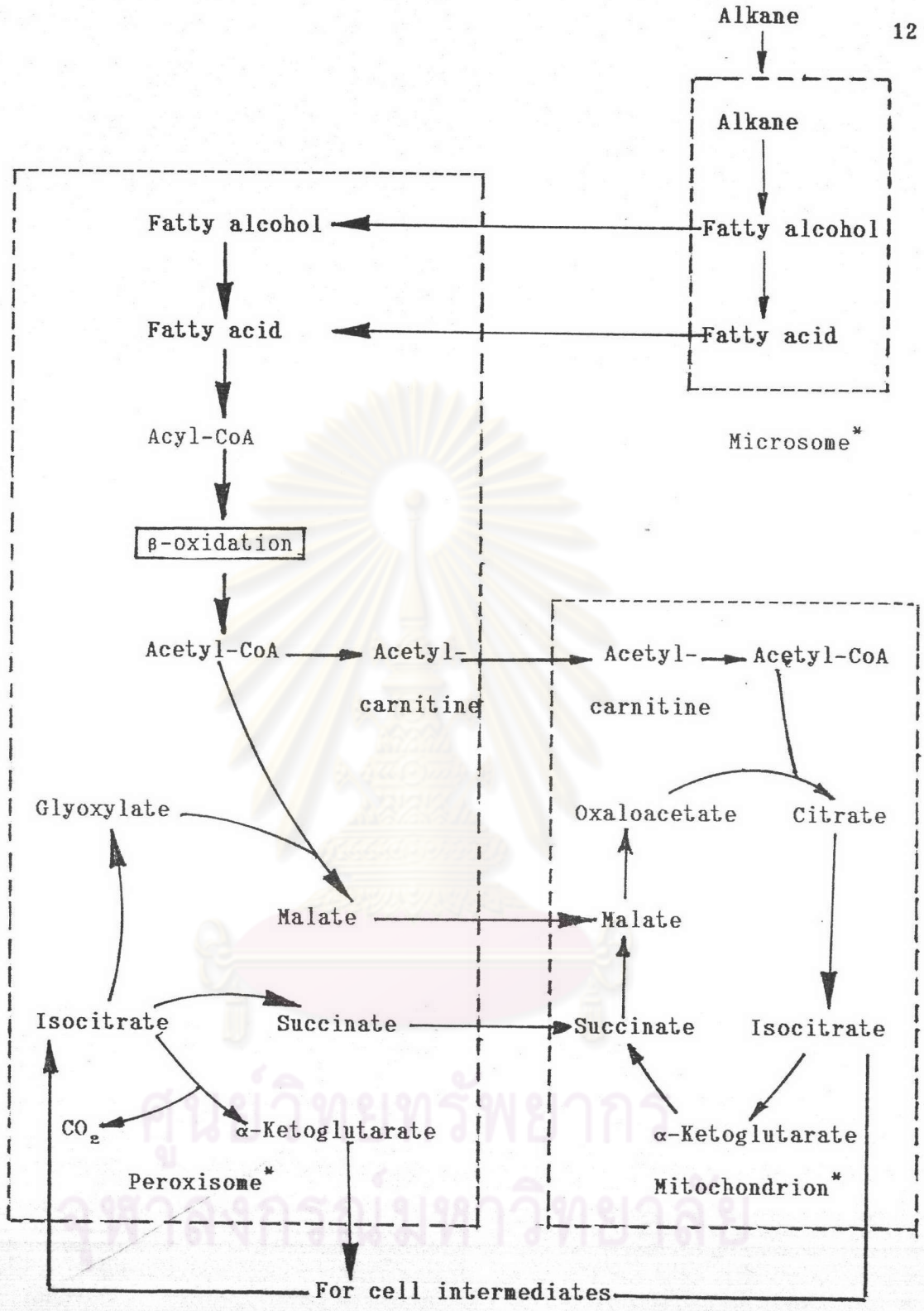
รูปที่ 4 วัฏจักรไกลออกซาเลต (Glyoxylate cycle)

หมายเหตุ เครื่องหมายวงเล็บ( ) หมายถึง เอ็นไซม์



รูปที่ 5 วัฏจักรเครป หรือ วัฏจักรกรดมะนาว

หมายเหตุ วงเล็บ( ) หมายถึง เอ็นไซม์



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายนอร์มัลพาราฟฟินส์ในไมโครโซม การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจนได้อะซิทิลโคเอ และการสร้างกรดมะนาวในไมโตรคอนเดรีย[35]

หมายเหตุ * หมายถึง ออกาเนลล์ต่างๆในเซลล์ของจุลินทรีย์

4. การผลิตกรดมะนาวเป็นการค้า

ปัจจุบันการผลิตกรดมะนาวในเชิงการค้าโดยวิธีการหมักเป็นวิธีที่แพร่หลายมาก กระบวนการผลิตกรดมะนาวดังกล่าว วัตถุดิบที่ใช้ และปริมาณการผลิตต่อปีของบริษัทต่างๆ นั้นแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 4[38] กระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวแบ่งออกเป็น 3 กระบวนการด้วยกันคือ

4.1 การหมักในสภาพของแข็ง(Solid state fermentation หรือ Japanese koji process)

การหมักในสภาพที่เป็นของแข็งหรือโคจิ เป็นวิธีดั้งเดิมที่คิดค้นโดย Yamadaในปี ค.ศ.1965 Hisanoka และ Nakamuraในปี ค.ศ.1966 ในประเทศญี่ปุ่น[1,2,3,4] และยังคงเป็นที่นิยมทำกันมากในประเทศนี้ กล่าวคือประมาณ 1ใน 5 ของกรดมะนาวที่ผลิตได้ทั้งหมดในประเทศญี่ปุ่นจะผลิตโดยใช้วิธีนี้[3] เริ่มต้นจากการนำวัสดุที่เหลือใช้จากการเกษตรจำพวกที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ เช่น กากมันฝรั่งชนิดหวาน กากมันสำปะหลัง ซังข้าวโพด ชานอ้อย รำข้าว ฯลฯ บรรจุในถาดหรือภาชนะที่จะใช้ในการหมัก เติมน้ำจนได้ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 65 ถึง 70[8] ผ่านการอบด้วยไอน้ำเพื่อฆ่าเชื้อ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.5 แล้วจึงเติมสปอร์ของ เชื้อรา Aspergillus niger สายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วว่าสามารถผลิตกรดมะนาวได้ในปริมาณสูงในอาหารที่มีอิออนของโลหะหนักชนิดต่างๆ ปนเปื้อนในปริมาณมาก บ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ. เป็นเวลานาน 5 ถึง 8 วัน ในระยะเริ่มต้นของการหมักนั้น แป้งจะถูกย่อยโดยเอ็นไซม์อะไมเลสที่เชื้อราสร้างขึ้นก่อน หลังจากนั้นจึงจะถึงขั้นการผลิตกรดมะนาวซึ่งค่าความเป็นกรดด่างของอาหารจะลดลงเหลือประมาณ 2.0[4] ขั้นตอนการย่อยแป้งนั้นสามารถแยกทำต่างหากได้ก่อนโดยการเติมเอ็นไซม์อัลฟา-อะไมเลส ก่อนนำมาใช้ผลิตกรด ซึ่งวิธีนี้จะเป็นการย่นระยะเวลาในการหมักได้ เมื่อเสร็จสิ้นการหมักการเก็บเกี่ยวกรดมะนาวจะทำโดยใช้น้ำอุ่นในการสกัด อย่างไรก็ตาม การหมักในสภาพนี้จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ที่สำคัญดังนี้ เช่น ความชื้นเริ่มต้น การถ่ายเทออกซิเจน (ต้องอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของวัตถุดิบ ช่องว่างระหว่างวัตถุดิบ และการส่งถ่ายมวล) การถ่ายเทความร้อน และความชื้นสัมพัทธ์(ประมาณร้อยละ 85-90 เพื่อรักษาระดับความชื้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการตลอดการหมัก) ทั้งนี้เพื่อให้การหมักมีประสิทธิภาพสูงสุด

ตารางที่ 4 การผลิตกรดมะนาวของบริษัทต่างๆ ทั่วโลก[38]

บริษัทผู้ผลิต	วัตถุดิบ	กระบวนการผลิต	ปริมาณการผลิต ต่อปี(เมตริกตัน)
Quimica Maxama Sa (เม็กซิโก)	น้ำตาลทราย	หมักในอาหารเหลว	5,000
Hoechst(เปอร์โตริโก้)	กากน้ำตาล	หมักในอาหารเหลว	10,000
Quimica Industrial (บราซิล)	ไม่เปิดเผย	หมักในอาหารเหลว	3,000
Sucro-Miles Sa (โคลัมเบีย)	น้ำตาลทราย	หมักในอาหารเหลว	2,000
Pfizer(ไอร์แลนด์)	คาร์โบไฮเดรต	หมักในอาหารเหลว	40,000
Liquigas SpA. (อิตาลี)	นอร์มัล-พาราฟฟินส์	หมักในอาหารเหลว	53,000
Boehringer(อังกฤษ)	กากน้ำตาล	หมักในอาหารเหลว	14,000
Julius Fucika Works (เชคโกสโลวาเกีย)	กากน้ำตาล	หมักในอาหารเหลว	3,000
Citurgia Chemicals (อินเดีย)	กากน้ำตาล-จากอ้อย	หมักในอาหารเหลว	3,000
P.T.Semarang Diamond Chemicals (ฟิลิปปินส์)	มันสำปะหลัง	ไม่เปิดเผย	3,000
Showa Chemicals Ltd. (ญี่ปุ่น)	ของเหลือจาก-มันสำปะหลัง	หมักในอาหารเหลว	4,400
Miles Chemicals Ltd. (อิสราเอล)	แป้งสาลี	หมักในอาหารเหลว	4,500

4.2 การหมักบนผิวอาหารเหลว (Liquid surface culture surface หรือ Shallow pan process)

เป็นกระบวนการผลิตกรดมะนาวที่นิยมใช้ในการผลิตกรดมะนาวกันอย่างมากตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ใช้เงินลงทุนต่ำและใช้เทคโนโลยีที่ง่ายๆไม่ยุ่งยากซับซ้อน การหมักเริ่มต้นจากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ[1,2,8] เช่น ซูโครส และกากน้ำตาล ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบรรจุใส่ภาชนะก้นแบน เช่น ถาดซึ่งทำด้วยอลูมิเนียมที่มีความบริสุทธิ์สูง หรือทำจากเหล็กกล้าไร้สนิมเพื่อลดปัญหาการกัดกร่อนจากกรด และการปะปนของอิออนของโลหะหนักที่มีผลต่อการหมัก ถาดแต่ละถาดจะถูกจัดเรียงในตู้หมัก(fermentation chamber) ที่ปราศจากเชื้อ[4,8] ทำการฆ่าเชื้อโดยใช้ฟอร์มาดีไฮด์เจือจางและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และสามารถควบคุมปัจจัยที่สำคัญในการหมัก เช่น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และการหมุนเวียนของอากาศบริสุทธิ์ เป็นต้น การหมักเริ่มต้นเมื่อถ่ายสปอร์ของเชื้อ A.niger ให้กระจายทั่วอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างทั่วถึง ควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 28°-30° ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 40-60 วิธีนี้สปอร์จะงอกภายในเวลา 24 ชั่วโมงโดยจะสังเกตเห็นเส้นใยสีขาวย่นปกคลุมผิวของน้ำหมัก[3,4] ในเวลา 8-12 วัน หลังจากปลูกเชื้อลงไปความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นจะลดลงจากร้อยละ 20-25 เหลือร้อยละ 1-3 เมื่อการหมักสิ้นสุดลงจะทำการถ่ายน้ำหมักออกมา ส่วนเส้นใยของเชื้อราที่เหลืออาจนำกลับไปใช้ในการหมักได้อีกโดยเติมอาหารลงไปใหม่ด้วยเทคนิคที่เฉพาะจะได้เส้นใยลอยที่ผิวเหมือนเดิม วิธีนี้จะช่วยลดเวลาการผลิตลงได้ การหมักแบบนี้จะได้ผลผลิต 80-85 กรัมของกรดมะนาวต่อ 100 กรัมของน้ำตาลเริ่มต้น[3]

4.3 การหมักในอาหารเหลว(Submerged culture process)

เป็นกระบวนการหมักที่พัฒนาขึ้นมาหลังกระบวนการหมักบนผิวอาหารเหลว และกระบวนการหมักแบบโคจิ แต่ในปัจจุบันปริมาณการผลิตกรดมะนาวมากกว่าร้อยละ 80 ของปริมาณทั้งหมดผลิตได้จากวิธีนี้โดยใช้วัตถุดิบชนิดต่างๆ ซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีอื่นๆ คือ อัตราการผลิตกรดมะนาวจะสูงกว่ากระบวนการอื่น เนื่องจากสภาวะต่างๆ ในระหว่างการหมักสามารถควบคุมได้โดยใช้อุปกรณ์ควบคุมที่ทันสมัย และใช้เทคโนโลยีชั้นสูงดังนั้นการใช้แรงงานคนจึงน้อยแต่ต้องใช้บุคคลากรที่มีความสามารถ และความเชี่ยวชาญสูงในการ

018239

ควบคุมและดูแลอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้การผลิต[40] การหมักเริ่มต้นหลังจากถ่ายสปอร์ของเชื้อรา หรือยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในถังหมักทรงกระบอกขนาดใหญ่ที่สร้างขึ้นที่เรียกว่า ปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) หรือถังหมัก (fermentor)ซึ่งถูกสร้างด้วยวัสดุที่ทนต่อการกัดกร่อนของกรดที่เกิดขึ้น ทำการควบคุมการให้อากาศ (aeration)และการกวน(agitation)ให้เหมาะสม พร้อมทั้งควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25° - 30° ซ. กระบวนการหมักระบบนี้สามารถทำให้ระยะเวลาในการหมักลดลงได้ประมาณ 3-5 วัน ซึ่งกระบวนการผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์ด้วยยีสต์นั้นก็ใช้วิธีนี้เช่นกัน แต่เนื่องจากมีการลงทุนทำกันจนถึงขั้นสามารถผลิตเป็นอุตสาหกรรมได้แล้ว ทำให้วิธีการและขั้นตอนส่วนใหญ่ถูกปกปิด แต่อย่างไรก็ตามหลักการใหญ่ๆ[2] พอจะสรุปได้ดังนี้คือถังหมักที่ใช้ในการผลิตจะเป็นแบบที่เรียกว่า ถังหมักแบบหอสูง(tower fermentors) หรือ เป็นถังหมักแบบกวน(stirred tank fermentors) และจากการที่ยีสต์ต้องมีการออกซิไดซ์นอร์มัลพาราฟฟินส์ในขณะที่มีการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาว ความร้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมีดังกล่าวย่อมมีมากกว่าการหมักที่มีสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน[1,2] ดังนั้นระบบทำความเย็นในถังหมักจึงสำคัญอย่างยิ่ง ตัวอย่างที่น่าสนใจของการผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์ด้วยยีสต์นั้นคือ โรงงาน Liquichimica ที่ตั้งอยู่ทางตอนเหนือของประเทศอิตาลี เป็นโรงงานที่ผลิตกรดมะนาวโดยใช้เทคโนโลยีของ บริษัท Takeda Chemicals Industries โดยเลือกใช้เชื้อที่กลายพันธุ์(mutant)จากสายพันธุ์Candida lipolytica ที่มีกิจกรรมของเอ็นไซม์ อะโคนิเทสต่ำ การหมักจะใช้กระบวน ที่เรียกว่าการหมักแบบครั้งคราว (batch process) โดยมีการกวน และการให้อากาศในถังหมักขนาด 400 ลูกบาศก์เมตร แต่ละรอบจะใช้เวลาในการหมักนาน 72 ชั่วโมง ซึ่งการเปลี่ยนสารไฮโดรคาร์บอนเป็นกรดมะนาวคิดเป็นน้ำหนักร้อยละ 130[2] กระบวนการดังกล่าวจะแบ่งออกเป็น 3 ขั้นด้วยกันคือ ขั้นการเจริญเติบโตของยีสต์ ขั้นการเปลี่ยนสารไฮโดรคาร์บอนเป็นกรดมะนาว และขั้นสุดท้ายจะเป็นการใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์อย่างช้าๆจนหมด ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวนั้น ต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติมสารบางชนิดลงไป เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น ท้ายสุดจะเป็นการกำจัดเซลล์ยีสต์ออกโดยการปั่นแยกออกจากน้ำหมัก

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว

กระบวนการผลิตกรดมะนาวจะประสบผลสำเร็จหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการ กล่าวคือ สายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการผลิต และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตของสายพันธุ์นั้นๆ[2,8] ซึ่งแตกต่างกันออกไปดังแสดงใน ตารางที่ 5 การผลิตกรดมะนาวมีปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้คือ

5.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว โดยเฉพาะเชื้อรา และยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีผู้สนใจและมีการศึกษาค้นคว้ากันอย่างมาก กระทั่งสามารถพัฒนาขึ้นจนถึงระดับอุตสาหกรรม ซึ่งเชื้อราและยีสต์ต่างก็มีข้อดีและเสียแตกต่างกันไป แต่ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่จะใช้ในการผลิตก็ยังอาศัยหลักการเดียวกันคือ มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวสูง และจีนส์ที่ควบคุมการผลิตกรดมะนาวคงทนไม่เกิดการกลายพันธุ์ไปจากเดิม ให้ผลผลิตสม่ำเสมอ แยกกรดจากน้ำหมักได้ง่าย ให้กรดชนิดอื่นที่ไม่ต้องการในปริมาณน้อย ทนต่อโลหะหนักที่มีผลต่อการผลิตได้สูง โดยเฉพาะยีสต์ต้องเป็นสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอ็นไซม์อะโคนิเทสต่ำ และใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น[2,8]

5.2 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

5.2.1 สารแหล่งคาร์บอน

นอร์มัล พาราฟฟินส์หรือที่เรียกทั่วๆ ไปว่านอร์มัล อัลเคนส์จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ ที่ประกอบไปด้วยธาตุเพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ คาร์บอน และไฮโดรเจน ดังนั้นจึงจัดเป็น สารไฮโดรคาร์บอนซึ่งได้จากการกลั่นแยกจากน้ำมันปิโตรเลียม[30] การผลิตกรดมะนาวจากยีสต์โดยใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นสารแหล่งคาร์บอนนั้นนิยมใช้ช่วงคาร์บอนอยู่ระหว่าง 10-20 อะตอม ซึ่งนอร์มัลพาราฟฟินส์ที่มีช่วงคาร์บอนต่ำกว่า 10 อะตอม แล้วจะไม่เหมาะกับการนำไปใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอนเนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีของตัวมันเองคือเป็นตัวทำละลาย(solvents)ที่ดี[27] มีจุดเดือดต่ำมากทำให้ระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง จากการศึกษาของ Furukawa พบว่านอร์มัล พาราฟฟินส์ที่เหมาะสมที่สุดคือ $C_{14}H_{30}$ ถึง $C_{16}H_{34}$ โดยให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด โดยใช้ความเข้มข้นคิดเป็นน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 3 ถึง 10 [1]

ตารางที่ 5 การผลิตกรดมะนาวโดยกระบวนการหมักในอาหารเหลวด้วยยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์ของยีสต์	สภาวะการหมักที่เหมาะสม
Candida oleophila C-73[24,25]	-อุณหภูมิ 25°-28° ซ. ให้อากาศ 0.7 vvm. กวน 600 rpm. ระยะเวลาหมักนาน 4 วัน ผลผลิตกรดมะนาว 128 กรัม/ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย นอร์มัล พาราฟฟินส์ 100 กรัม NH_4NO_3 2.0 กรัม KH_2PO_4 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม $MnSO_4.{}_4H_2O$ 0.25 กรัม $CaCO_3$ 100 กรัมคอร์นสตรีปลิเคอร์ 0.5 กรัม
Candida lipolytica L-36[18]	-อุณหภูมิ 28° ซ. ให้อากาศโดยการเขย่าแบบวงกลม 200 rpm. ระยะเวลาหมักนาน 5 วัน ผลผลิตกรดมะนาว 69.8 กรัม/ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตรประกอบด้วย นอร์มัล พาราฟฟินส์ 60 กรัม NH_4Cl 2.0 กรัม KH_2PO_4 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม $MnSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัม $CaCO_3$ 40 กรัม
Candida lipolytica S-22[20,21]	-อุณหภูมิ 28° ซ. ให้อากาศโดยการเขย่าแบบวงกลม 200 rpm. ระยะเวลาหมักนาน 3 วัน ผลผลิตกรดมะนาว 110 กรัม/ลิตร อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย นอร์มัล พาราฟฟินส์ 80 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 4.0 กรัม KH_2PO_4 0.25 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.5กรัม $ZnSO_4.7H_2O$ 0.001 กรัม $CuSO_4.5H_2O$ 0.0001 กรัม $FeSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม ไทอะมีน 0.00005 กรัม $CaCO_3$ 1.0 กรัม
Candida zeylanoid KY-5802[27]	-อุณหภูมิ 30° ซ. ให้อากาศ 1.0 vvm. กวน 800 rpm. ระยะเวลาหมักนาน 6 วัน ผลผลิตกรดมะนาว 80 กรัม/ลิตร อาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย นอร์มัล พาราฟฟินส์ 100 กรัม NH_4NO_3 4.0 กรัม KH_2PO_4 1.0 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม $FeSO_4.7H_2O$ 0.02 กรัม $MnSO_4.4\text{-}6H_2O$ 0.01 กรัม $ZnSO_4.7H_2O$ 0.005 กรัม $CuSO_4.5H_2O$ 0.005 กรัม ไทอะมีน 0.01 กรัม $CaCO_3$ 60 กรัม

5.2.2 สารแหล่งไนโตรเจน

สารแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น โดยทั่วไปจะใช้ในรูปที่เป็นทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่การผลิตกรดมะนาวส่วนมากจะใช้ในรูปของอนินทรีย์ไนโตรเจนมากกว่าการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน[1] เนื่องจากการใช้สารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนจะมีส่วนประกอบที่ซับซ้อน ทำให้ยากต่อการควบคุมองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนมักนิยมใช้ในรูปของเกลือแอมโมเนียม หรือเกลือไนเตรต ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต[27,29] แอมโมเนียมคลอไรด์[24,28] แอมโมเนียมซัลเฟต[40] เป็นต้น อย่างไรก็ตามชนิดของแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ จะส่งผลกระทบต่อยีสต์ด้วยเช่น ยีสต์บางสายพันธุ์ไม่สามารถใช้ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของเกลือไนเตรตได้หรือใช้ได้ไม่ดีเท่ากับเกลือของแอมโมเนียม[29] เช่นเดียวกับปริมาณของไนโตรเจนที่ใช้ มีรายงานว่าในการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ต้องมีการจำกัดปริมาณ[1,8] โดยจะต้องมีปริมาณของไนโตรเจนเพียงพอต่อขั้นการเจริญเติบโตของยีสต์เท่านั้น แต่ไม่เหลือไปถึงขั้นการผลิตกรดมะนาว ซึ่งปริมาณของไนโตรเจนที่เหมาะสมมักอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.5-1.0 กรัม ต่อ 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้[1,8,24]

5.2.3 ฟอสเฟต

นอกจากคาร์บอนและไนโตรเจนแล้ว ฟอสเฟตเป็นธาตุหลักชนิดที่สามที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของยีสต์ มีรายงานว่าสารที่เป็นแหล่งอนินทรีย์ฟอสเฟตนั้นเหมาะสมต่อการผลิตกรด และต้องมีอยู่ในปริมาณที่จำกัด โดยผลผลิตของกรดมะนาวจะสูงขึ้นเมื่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและฟอสฟอรัสสูง[1,41] ซึ่งกลไกการควบคุมทางชีวเคมีและทางชีวภาพยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อาศัยหลักความจริงที่ว่าฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อเมตาบอลิซึมเพื่อให้ได้พลังงาน ดังนั้นการควบคุมปริมาณของฟอสฟอรัส ย่อมที่จะเป็นการควบคุมการใช้หรือการสูญเสียคาร์บอนด้วย ซึ่งจะทำให้ผลผลิตสูงขึ้นด้วย[1] รูปของอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่นิยมใช้คือโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-1.0 กรัม ต่อ 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ[41]

5.2.4 แร่ธาตุ (trace elements)

เชื้อรา A.niger สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวต้องการแร่ธาตุหลายชนิด ได้แก่ Fe^{++} Cu^{++} Zn^{++} และ Mn^{++} สำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตกรดมะนาว อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะส่งผลกระทบต่อการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวอย่างมาก จนอาจกล่าวได้ว่าถ้าต้องการให้การผลิตกรดมะนาวประสบผลสำเร็จ เราจะต้องสามารถควบคุมความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านี้เสียก่อน[1,2,3,4,8] แต่สำหรับการผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์ด้วยยีสต์นั้น ความต้องการแร่ธาตุชนิดต่างๆนั้นแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ดังแสดงใน ตารางที่ 5 แต่จากรายงานการศึกษาถึงผลของแร่ธาตุต่อการผลิตกรดมะนาวนั้นพบว่า Fe^{++} มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์มากที่สุด[1,2,3,4,8] ในปี ค.ศ.1973 Marchal และคณะ พบว่า ถ้าเติม $FeSO_4.7H_2O$ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 400.0 มิลลิกรัม/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การผลิตกรดมะนาวโดย Saccharomycopsis (Candida) lipolytica ลดลงร้อยละ 30[42] ซึ่งในปีเดียวกันนี้ Tabuchi ได้รายงานถึงผลของเหล็กว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเหล็กสูงๆ นั้น จะเพิ่มกิจกรรมของเอ็นไซม์อะโคนิเตรตไฮดราเทสให้สูงขึ้น มีผลให้กรดมะนาวถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางตัวอื่นมากขึ้นเช่น ไอโซซิเตรต ผลผลิตกรดมะนาวจึงลดลง[43]

5.2.5 ไธอะมีน ไฮโดรคลอไรด์ หรือ วิตะมินบี 1(thiamine hydrochloride)

การผลิตกรดมะนาวโดยใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นสารแหล่งคาร์บอนนั้นนอกจากองค์ประกอบที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อดังที่กล่าวข้างต้นแล้ว ยังพบว่ายีสต์ยังต้องการไธอะมีน ไฮโดรคลอไรด์ จากรายงานในปี ค.ศ.1976 โดย P.Maldonado และคณะ พบว่าความเข้มข้นของไธอะมีน ไฮโดรคลอไรด์ระหว่าง 0.01-200.0 ไมโครกรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ Candida lipolytica ไม่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ แต่จะผลิตกรดอัลฟา คีโตกลูตาริค (alpha ketoglutaric acid)แทน[23] ซึ่งผลของมันต่อระบบทางชีวเคมียังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อาจจะอาศัยหลักความจริงอธิบายได้ว่าการย่อยสลายนอร์มัล พาราฟฟินส์นั้นเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีคาร์บอก

ไซเลชั่น (oxidative decarboxylation) ซึ่งต้องการไธอะมีนไพโร ฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate) เป็นโคเอ็นไซม์[1,8] นอกจากความต้องการวิตะมินบี1 ในรูปของเกลือคลอไรด์แล้ว อาจจะใช้ในรูปของสารประกอบที่ซับซ้อน เช่น สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)[10,31,44] คอร์นสตีป ลิเคอร์(cornsteep liquor)[45] และคอร์นสตีปที่เป็นผง (cornsteep power)[25] เป็นต้น ซึ่งจะใช้ความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.2.6 สารลดแรงตึงผิว(surfactant)

นอร์มัล พาราฟฟินส์ เป็นสารที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำ และเมื่อเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจะลอยอยู่เฉพาะบนผิวหน้าของสารละลาย ซึ่งการหมักนั้นจำเป็นจะต้องกระจายสารแหล่งคาร์บอนให้ทั่วถึง เพื่อเชื้อจุลินทรีย์จะได้นำไปใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตกรดมะนาวได้ต่อไป ฉะนั้นสารลดแรงตึงผิวบางชนิดจึงอาจจะนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยการเติมลงในปริมาณที่เหมาะสมซึ่งขึ้นกับชนิดของสาร และจุลินทรีย์ที่ใช้ ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ได้แก่โพลีออกซี โพไพลีน ไกลคอล ไดอีเธอร์(polyoxypropylene glycol diether)[23] โพลีออกซีเอทธีลีน ซอร์บีแทนโมโนสเตรียเรต(polyoxyethylene sorbitan monostearate)[46] หรือ ทวีน 80[23] เป็นต้น

5.2.7 ความเป็นกรดด่าง(pH)ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวโดยใช้ยีสต์นั้น แตกต่างจากการใช้เชื้อราอย่างเห็นได้ชัดประการหนึ่งคือ ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามปกติเชื้อรา A.niger ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวสามารถทนต่อปริมาณกรดที่สร้างขึ้นมาได้สูง ดังนั้นไม่จำเป็นต้องเติมสารที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้เป็นกลาง (neutralizing agent)ลงไป ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างของอาหารจะลดลงจนถึงประมาณ 1.7-2.0[3,4] แต่ยีสต์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวนั้น มีความทนต่อปริมาณกรดที่สร้างขึ้นมาได้ต่ำกว่าเชื้อรามาก ฉะนั้นจึงจำเป็นจะต้องมีการเติมสารที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรดด่างลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต($CaCO_3$)[24,25,27] โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)[27] โซเดียมคาร์บอเนต(Na_2CO_3)[25] หรือสารละลายแอมโมเนีย (NH_3 solution)[20,21] เป็นต้น การใช้สารชนิดใดก็ตามขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้

และความสะดวก เช่น ถ้าการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวทำในระดับขวดเขย่า การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร จะใช้แคลเซียมคาร์บอเนตใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น โดยใช้ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 6-10(น้ำหนักต่อปริมาตรของอาหาร)[24,25,27] แต่ถ้าการหมักทำในถังหมักที่มีระบบควบคุมการเติมสารลงไปในระหว่างการหมัก จะใช้สารควบคุมความเป็นกรดด่างที่เป็นสารละลายแทน เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมลงไปเพื่อปรับให้ค่าความเป็นกรดด่างคงที่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว คือช่วง 5.0-6.5 [1,8,20,21] ซึ่งถ้าค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5.0 แล้วการสะสมกรดมะนาวจะลดลงแต่จะมีการผลิตและสะสมสารประกอบจำพวกโพลีไฮดรอกซี(polyhydroxy compounds)แทน เช่น อีริทริออล(erythriol) หรืออะราบิตอล (arabitol)[8] เป็นต้น

5.2.8 อุณหภูมิ

อุณหภูมิในระหว่างการหมักมีบทบาทที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต การผลิตและการสะสมกรดมะนาวโดยยีสต์ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวจะอยู่ระหว่าง 25°C ถึง 30°C[27,28,29]

5.2.9 การให้อากาศ

กระบวนการหมักโดยใช้สารไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น การให้อากาศเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ รวมทั้งทำให้น้ำมันที่ลอยอยู่ที่ผิว กลายเป็นน้ำมันหยดเล็กๆกระจายอยู่ทั่วถึงตลอดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในระดับขวดเขย่า การเลี้ยงยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ(aerobic condition)ทำได้โดยการเขย่าภาชนะที่ใช้เลี้ยงเชื้อนั้น จากรายงานต่างๆ ที่รวบรวมได้ พบว่าการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่านั้นใช้การเขย่าทั้งแบบวงกลม(rotary shaker)[20,21] และแบบเป็นเส้นตรง(reciprocal shaker)[27,29]ด้วยความเร็วต่างๆกัน แต่อย่างไรก็ตามมักนิยมใช้การเขย่าแบบวงกลมมากกว่า ซึ่งตามหลักความจริงแล้วการเขย่าแบบวงกลมทำให้อัตราการแลกเปลี่ยนออกซิเจนสูงกว่าการเขย่าแบบเส้นตรง[40] แต่ผลของการให้อากาศต่อการผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์ยังไม่สามารถหาข้อสรุปที่แน่ชัดได้ เนื่องจาก

การใช้ยีสต์ต่างสายพันธุ์กัน เช่น จากการทดลองของ Tabuchi และHara[43] ใช้ยีสต์ Saccharomycopsis lipolytica ในการหมักพบว่าผลผลิตกรดมะนาวจะลดลงเมื่อการให้อากาศลดลง แต่จากการทดลองของ Puklowski และ Rehm [1]ใช้ยีสต์ Saccharomycopsis parapsilosis พบว่าผลผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มขึ้น เมื่อมีการให้อากาศลดลง ซึ่งผลการทดลองที่ได้ตรงข้ามกับของ Tabuchi และHara

6. ประโยชน์ของกรดมะนาว

ได้มีการนำกรดมะนาวไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ[4,38] ปริมาณการผลิตกรดมะนาวของตลาดโลกประมาณ 200 ล้านกิโลกรัมต่อปี โดยเกือบครึ่งหนึ่งจะผลิตในยุโรป ซึ่งจะผลิตทั้งในรูปของแอนไฮดรัสและโมโนไฮเดรต[1,8,38] ประมาณร้อยละ 70ของกรดมะนาวใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่ม (food and beverage industries) ประมาณร้อยละ 12 ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตยา และอีกร้อยละ 18 ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ [4] ซึ่งประโยชน์ของกรดมะนาวในอุตสาหกรรมต่างๆ มีรายละเอียดต่อไปนี้

6.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

กรดมะนาวเป็นกรดที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มกันมาก ทั้งนี้เนื่องจากกรดมะนาวมีความสามารถในการละลายสูง ความเป็นพิษต่ำ และให้รสเปรี้ยวที่ยอมรับได้[1,2,3,4,8,38] ซึ่งจะใช้กรดมะนาวเป็นตัวปรับกรด(acidulant)[38] ในอาหารกระป๋องหรือน้ำขวด เป็นตัวช่วยเพิ่มรสชาด ป้องกันการบูดเสียในเครื่องดื่มและน้ำหวาน ป้องกันการเกิดออกซิไดซ์ของกรดแอสคอบิค (ascobic acid) หรืออิริธอร์บิค(erythorbic acid)ในผลไม้แช่แข็ง และใช้เป็นตัวควบคุมความเป็นกรดด่างในขนมหวานจำพวกเยลลี่ เจลาตินโดยใช้เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรดเพื่อให้เกิดวุ้นขึ้นมากที่สุด และช่วยเพิ่มรสชาด ใช้เป็นสารกันบูดและช่วยยืดอายุผลิตภัณฑ์จำพวกเนยแข็งและเนยเหลว ใช้เป็นสารป้องกันการเหม็นหืนในอาหารที่มีไขมัน ป้องกันการเปลี่ยนสีของเนื้อสัตว์จำพวกปลา และกุ้งที่มีไขมัน โดยการจุ่มลงในสารละลายผสมระหว่างกรดมะนาวกับกรดแอสคอบิค ใช้เป็นตัวป้องกันการตกผลึกของน้ำผึ้ง ป้องกันการเปลี่ยนสีของหัวหอม ซึ่งตัวปรับกรดที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มมีมากมายหลายชนิดด้วยกัน

แต่อย่างไรก็ตามร้อยละ 55-65 ของปริมาณทั้งหมดใช้กรดมะนาว[38] นอกจากนั้นก็มีการใช้กรดฟอสฟอริค (phosphoric acid)ประมาณร้อยละ 20-25 และกรดมาลิค(malic acid)ร้อยละ 5 ส่วนที่เหลือจะเป็นการใช้กรดประเภทอื่นๆ เช่น กรดอะดิปิค(adipic acid) กรดแลคติค(lactic acid) กรดฟูมาริค(fumaric acid) และทาร์ตาริค (tartaric) เป็นต้น

6.2 อุตสาหกรรมทางด้านยา

กรดมะนาวที่ใช้ในการทำยามักจะอยู่ในรูปเกลือของกรดมะนาว ได้แก่ ยาลดกรดในกระเพาะอาหาร มีส่วนผสมของกรดมะนาวกับไบคาร์บอเนต ซึ่งทำให้เกิดฟองฟู่ในน้ำดื่ม[1,2,4,8,38] เฟอร์ริคซิเตรต(ferric citrate)ใช้เป็นแหล่งของธาตุเหล็กสำหรับคนเป็นโรคโลหิตจาง หรือ โซเดียมซิเตรตที่ใช้เติมลงในเลือดที่เจาะออกจากร่างกาย เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด เป็นต้น

6.3 อุตสาหกรรมทางด้านอื่นๆ

อุตสาหกรรมสำคัญๆ ที่ใช้กรดมะนาวนอกเหนือจากที่กล่าวข้างต้น ได้แก่

6.3.1 อุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก

ในระหว่างปี ค.ศ.1971-1972 อเมริกามีการออกกฎหมายควบคุมการใช้ฟอสเฟตเป็นส่วนผสมในผงซักฟอก[38] ทำให้มีการหันมาใช้โซเดียมซิเตรตแทนเนื่องมาจากเป็นสารที่ไม่ช่วยเสริมการเจริญเติบโตของวัชชพืชในน้ำ เช่น สาหร่ายบางชนิด เป็นต้น ไม่เป็นพิษต่อปลา และมีวงจรในห่วงโซ่อาหารสั้นกว่าฟอสเฟต นอกจากนั้นแล้วยังอาจใช้แทนแคลเซียม หรือโซเดียมคาร์บอเนตเพื่อลดการเกิดคราบของปูนเกาะติดเครื่องซักผ้าหรือผ้าที่ซัก

6.3.2 อุตสาหกรรมการผลิตพลาสติก[38]

จะใช้กรดมะนาวในรูปของไตรเอทธิล(triethyl) อะซิติลไตรเอทธิล(acetyl triethyl) ไตรบิวทิล(tributyl) หรืออะซิติล ไตรบิวทิล ซิเตรต ในการทำพลาสติกจำพวกสารประกอบโพลีไวนิล คลอไรด์(polyvinyl chloride) และทำฟิมส์เซลลูโลสิก(cellulosic films) นอกจากนั้นยังใช้ทำพลาสติกที่ใช้ห่อหุ้มอาหารโดยผ่านการตรวจรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา(FAD)แล้วว่าปลอดภัย

6.3.3 ระบบการกำจัดกาซซัลเฟอร์ไดออกไซด์[38]

ในระบบการกำจัดกาซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในเหมืองที่ถลุงแร่โลหะและโรงงานที่มีการใช้ถ่านหินเป็นแหล่งผลิตพลังงาน จะใช้สารละลายผสมของโซเดียมซิเตรต กรดมะนาว และโซเดียมไบโอซัลเฟต เป็นตัวดูดซับกาซที่เกิดขึ้น

นอกจากนั้น ยังใช้ในการชะล้างสนิมและน้ำมันดินออกจากโลหะ ใช้ทำความสะอาดหม้อน้ำของโรงงานอุตสาหกรรมโดยจะจับกับอิออนของโลหะบางชนิด เช่น นิเกิล เหล็ก และทองแดง เกิดเป็นสารที่ละลายน้ำได้ และป้องกันการเกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำของออกไซด์ หรือไฮดรอกไซด์ ส่วนในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง[4,38] จะใช้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมความเป็นกรดด่างในครีมนวดผม น้ำยาดัดผม น้ำยาทำความสะอาดใบหน้า และโลชั่นแอสตริงเจ้นท์ (astringent lotion) เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. <u>การวิเคราะห์กรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน</u>[47]

การวิเคราะห์กรดมะนาวนั้นสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิเคราะห์โดยใช้เอ็นไซม์ซิเตรตไลเอส(citrate lyase) มาเลตดีไฮโดรจีเนส(malate dehydrogenase) และ แลคเตรต ดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) ตามวิธีของ Hans Mollering[48] โดยอาศัยหลักการที่ว่าเอ็นไซม์ซิเตรตไลเอสจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดซิตริกเป็นออกซาโลอะซิเตรตและอะซิเตรต จากนั้นออกซาโลอะซิเตรตจะถูกเปลี่ยนเป็น มาเลต และ NAD^+ โดยเอ็นไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส ในขณะเดียวกันนี้ออกซาโลอะซิเตรตบางส่วนจะเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกไซเลชั่น เกิดเป็นไพรูเวตขึ้นด้วย เพราะฉะนั้นจำเป็นจะต้องมีการใช้เอ็นไซม์แลคเตรตดีไฮโดรจีเนส ในการเร่งปฏิกิยาการเปลี่ยนไพรูเวตเป็นแลคเตรต และ NAD^+ ซึ่งการหาปริมาณกรดมะนาวจะใช้วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ NAD^+ ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าว ที่ค่าความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

วิเคราะห์โดยใช้วิธีเปเปอร์โครมาโตรกราฟฟี [6] ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Nordmann[49]และ Suvachittanont[50] วิเคราะห์โดยใช้กาซโครมาโตรกราฟฟีตามวิธีของ W.R.Harvey et al.[51]ซึ่งจะต้องมีการเปลี่ยนกรดที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่างเป็นสารประกอบจำพวกเอสเทอร์(ester) ก่อนการฉีดเข้าเครื่องโดยใช้คอลัมน์เฉพาะ (คอลัมน์ทองแดงขนาด 4 ฟุต X 1/4 นิ้ว บรรจุด้วยสารคาร์โบแวกซ์ 20 M ร้อยละ 3.5 และโพลีฟีนิลอีเธอร์ร้อยละ 1.5 เคลือบบนโครโมซอบจีขนาด 60-80 เมช) วิเคราะห์โดยใช้ไฮเปอร์ฟอร์มแมนส์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีของ Samy H.Ashoor และ M.J.Knox[52] โดยใช้คอลัมน์เฉพาะคือ Aminex HPX-87H และวิเคราะห์โดยใช้วิธีไพริดีน-อะซิติกแอนไฮไดรด์ (Pyridine-Acetic Anhydride)ตามวิธีของ Marier J.R. และ Boulet M.[53]ซึ่งวิธีดังกล่าวทั้งหมดข้างต้นมีข้อเสียต่างๆ กัน เช่น การวิเคราะห์ด้วยเอ็นไซม์นั้น ถึงแม้ว่าจะมีความจำเพาะต่อกรดมะนาวสูงก็ตามแต่ราคาค่าวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่างมีราคาสูงมาก จึงไม่เหมาะต่องานวิจัยที่มีตัวอย่างจำนวนมาก ส่วนวิธีอื่นๆ นั้นปริมาณของกรดมะนาวที่วิเคราะห์ได้จะมีปริมาณของกรดไอโซซิตริกรวมอยู่ด้วยซึ่งนับว่าเป็นข้อเสียที่สำคัญที่สุด แต่การวิเคราะห์กรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณที่มีการทำกันอย่างกว้างขวางเนื่องจาก

เป็นวิธีที่มีการพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ.1895 โดย Stahre จากนั้นก็มีการพัฒนาวิธีการขึ้นเรื่อยๆ จนมีความจำเพาะและความไวต่อกรดมะนาวมากยิ่งขึ้น หลักการที่สำคัญของวิธีการนี้ที่สามารถบอกปริมาณของกรดมะนาวได้เพียงอย่างเดียวเท่านั้น คือความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาวกับกรดชนิดอื่นๆรวมทั้งกรดไอโซซิตริกที่เป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครบ มีผลให้สภาวะที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นแตกต่างกันด้วย โดยที่การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดมะนาว ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีที่จับกับอะตอมของคาร์บอนเป็นแบบแอลกอฮอลชนิดตติยะภูมิ(tertiary alcohol) จะต้องใช้สารจำพวกที่เป็นตัวออกซิไดซ์อย่างแรง(strong oxidizing agent) ในสารละลายกรดซัลฟูริก เช่น สารละลายผสมของโบรไมด์-โบรเมต-แวนนาเดรต (bromide-bromate-vanadate solution)[54] น้ำโบรมีน(bromine water)และแอมโมเนียมแวนนาเดรต(sodium vanadate)[55] หรือโปตัสเซียมโบรไมด์และโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต[47] เป็นต้น เกิดเป็นกรดอะซีโตนไดคาร์บอกไซลิก(acetonedicarboxylic acid) แล้วจึงเกิดปฏิกิริยาการเติมโบรมีน(bromination) เกิดเป็นเพนตาโบรโมอะซีโตน จากนั้นจึงวิเคราะห์หาปริมาณของเพนตาโบรโมอะซีโตนที่เกิดขึ้น ซึ่งมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ การหาปริมาณของโบรไมด์ทั้งหมดที่เกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชั่นในสารละลายตัวอย่างนั้น ด้วยการติเตรต วิธีนี้จะไม่มีความจำเพาะต่อเพนตาโบรโมอะซีโตนที่เกิดขึ้น โดยจะให้ผลบวกต่อโบรโมอะซิโตนตัวอื่นด้วย ต่อมาในปี ค.ศ.1947 Breusch & Talus[56] ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเพนตาโบรโมอะซีโตนให้มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น โดยการใช้สารประกอบของซัลไฟด์ ได้แก่ โซเดียมซัลไฟด์ หรือ สารละลายผสมระหว่างไทโอยูเรีย [$H_2N(=S)NH_2$]กับ โบแรกซ์ เป็นต้น ในการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ให้สีเหลืองเมื่อจับกับเพนตาโบรโมอะซีโตน ซึ่งจากการทดลองยังพบอีกว่าสารละลายผสมระหว่างไทโอยูเรียกับโบแรกซ์ จะให้สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงที่มากกว่าการใช้โซเดียมซัลไฟด์ถึงร้อยละ 10-15 ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์กรดมะนาวโดยวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมเนื่องมาจากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น

8. มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

กรดมะนาวเป็นกรดที่นิยมแพร่หลายในอุตสาหกรรมหลายชนิดดังกล่าวแล้วในข้อ6 ซึ่งความต้องการกรดชนิดนี้มีปริมาณสูงขึ้นทุกปีทั้งตลาดในประเทศและต่างประเทศ แต่ในประเทศไทยมีโรงงานผลิตกรดมะนาวเพียงแห่งเดียวเท่านั้น คือ บริษัทอุตสาหกรรมผลิตกรดมะนาว จำกัด ซึ่งกระบวนการผลิตที่ใช้เป็นแบบการหมักในสภาพอาหารแข็ง มีวัตถุดิบที่สำคัญคือ กากมันสำปะหลัง และจุลินทรีย์ที่ใช้คือเชื้อรา Aspergillus niger ซึ่งปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ยังไม่พอเพียงต่อความต้องการของตลาดในประเทศ ทำให้มูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวสูงกว่ามูลค่าการส่งออกอย่างมาก ดังแสดงในตารางที่ 6 ฉะนั้นการเพิ่มปริมาณการผลิตนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งทำได้โดยการพัฒนาทั้งกระบวนการผลิตและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

ดังที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่า เชื้อรา A.niger ที่นิยมใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวมาตั้งแต่ช่วงศตวรรษที่ 18 นั้นยังคงประสบกับปัญหาต่างๆอยู่หลายประการ ได้แก่ เชื้อราที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวนั้น มักจะมีจีนส์ที่ควบคุมเอ็นไซม์การผลิตกรดที่ไม่เสถียร ซึ่งเป็นผลทำให้ผลผลิตกรดมะนาวลดลงและใช้ระยะเวลาในการหมักยาวนาน[1] นอกจากนั้นแล้ว เชื้อรา Aspergillus niger ส่วนใหญ่จะใช้สารแหล่งคาร์บอนจำพวกที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ[1,2,3,4,8] ซึ่งสารจำพวกนี้มักจะได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น กากน้ำตาล กากมันสำปะหลัง ชานอ้อย เป็นต้นโดยที่วัตถุดิบเหล่านี้มีองค์ประกอบภายในที่ซับซ้อน แตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ สภาพภูมิอากาศ และการเก็บรักษา โดยเฉพาะแร่ธาตุ 4 ชนิดคือ Zn Cu Mn และ Fe มีผลให้ยากต่อการควบคุมการผลิตในแต่ละช่วงผลผลิตที่ได้จึงต่ำกว่าที่ควรจะเป็น[37] ดังนั้นการหันมาศึกษาวัตถุดิบประเภทอื่นรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักนอกเหนือจาก เชื้อรา A.niger เช่น การผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัลพาราฟฟินส์ด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลวด้วยยีสต์ จึงน่าสนใจอย่างยิ่งเนื่องจากอาจจะใช้เป็นแนวทางในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

ตารางที่ 6 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าและส่งออกของกรดมะนาวในประเทศไทย*

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

หมายเหตุ * ข้อมูลจากธนาคารกรุงเทพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. ขั้นตอนการวิจัย

9.1 คัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถเจริญและผลิตกรดได้โดยใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอนบนอาหารแข็ง

9.2 นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดได้จากข้อ 9.1 มาคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดในอาหารเหลวที่มีนอร์มัล พาราฟฟินส์ เป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับขวดเขย่า

9.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดได้จากข้อ 9.2 ในอาหารเหลวที่มีนอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะต่างๆกัน

9.4 หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว ในระดับขวดเขย่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย