

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

กรดมะนาว (citric acid) หรือกรด 2-ไฮดรอกซี -1,2,3 - โพรเพนไตรคาร์บอกซิลิก เป็นกรดอินทรีย์ที่สำคัญ พบทั่วไปในพืชและสัตว์ พบมากในผลไม้หลายชนิด เช่น สับปะรด ลูกแพร์ ลูกพีช ผลมะเดื่อ โดยเฉพาะในผลไม้ตระกูลส้ม (citrus fruits) เป็นต้น Scheele สามารถสกัดแยกและตกผลึกกรดมะนาวได้เป็นครั้งแรกจากน้ำมะนาวในปี ค.ศ. 1784 (อ้างถึงใน Kubicek and Rohr , 1986) การผลิตกรดมะนาวเป็นการค้าในระยะแรก ๆ นั้นจะผลิตจากน้ำผลไม้ โดยการตกตะกอนสารละลายของกรดมะนาวในน้ำผลไม้ในรูปของเกลือแคลเซียมซิเตรตเรียกกรดมะนาวที่ผลิตโดยวิธีนี้ว่า กรดมะนาวธรรมชาติ (natural citric acid) ในการผลิตกรดมะนาวจากน้ำผลไม้ได้ผลผลิตต่ำ คือต้องใช้ผลไม้ 30 - 40 ตัน จึงจะได้กรดมะนาว 1 ตัน (อ้างถึงใน Rohr and Kubicek , 1980) ซึ่งในขณะที่ความต้องการกรดมะนาวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้การผลิตกรดมะนาวธรรมชาติไม่เพียงพอต่อความต้องการและมีราคาแพง ดังนั้นจึงทำให้มีผู้พยายามคิดค้นการผลิตกรดมะนาวโดยวิธีการอื่น ๆ เช่นในปี ค.ศ. 1880 Grimoux และ Adams ได้ค้นพบการสังเคราะห์กรดมะนาวจากกลีเซอรอล แต่เนื่องจากวัตถุดิบมีราคาแพง ต้องใช้ปฏิกิริยาเคมีหลายขั้นตอน ใช้สารที่เป็นอันตรายและให้ผลผลิตไม่คุ้มค่า จึงไม่เหมาะสมที่ใช้ผลิตเพื่อเป็นการค้า (อ้างถึงใน Matthey , 1992 ; Milsom and Meers , 1985) ต่อมาในปี ค.ศ. 1893 Wehmer ค้นพบการผลิตกรดมะนาวโดยจุลินทรีย์เป็นครั้งแรก โดยพบว่าเชื้อรา 2 ชนิดคือ *Mucor* และ *Citromyces* (ปัจจุบันคือ *Penicillium*) สามารถผลิตกรดมะนาวจากกระบวนการหมัก (fermentation citric acid) ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบ (อ้างถึงใน Marison , 1988) แต่ยังไม่สามารถผลิตกรดมะนาวเป็นการค้าได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1917 Currie ได้รายงานการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ทำการหมักในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ ซึ่งช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ ชนิดอื่น ๆ ได้ ดังนั้นจึงมีการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อดังกล่าวในระดับอุตสาหกรรม (อ้างถึงใน Prescott and Dunn , 1959 ;

Kubicek and Rohr , 1986) โดยโรงงานแห่งแรกที่ใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ถูกก่อตั้งในประเทศเบลเยียม ในปี ค.ศ. 1919 หลังจากนั้น มีการก่อตั้งโรงงานอีกหลายแห่งในยุโรป ใช้วิธีการหมักบนผิวอาหารเหลว (Surface culture method) โดยใช้น้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ และต่อมาได้พัฒนามาเป็นกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว (Submerged culture process) ในระดับอุตสาหกรรมโดย Shu และ Johnson ในปี ค.ศ. 1948 (อ้างถึงใน Kubicek และ Rohr , 1986) การผลิตกรดมะนาวโดยจุลินทรีย์ นอกจากเชื้อราแล้วยังพบว่าแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดก็สามารถผลิตกรดมะนาวได้เช่นกัน (Grewal and Kalra , 1995) สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์เริ่มต้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1932 โดย Wieland และ Sanderhoff ซึ่งเป็นการผลิตกรดมะนาวในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตและ นอร์มัล - อัลเคน (อ้างถึงใน Matthey , 1992 ; Milsom and Meers ,1985) สำหรับแบคทีเรียยังไม่ได้รับความสนใจที่จะนำมาใช้ผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากให้ผลผลิตต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ รา และยีสต์ (Marison , 1988) ปัจจุบันมีการผลิตกรดมะนาวจากกระบวนการหมักออกมาจำหน่ายประมาณ 400,000 ตันต่อปี ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* และบางส่วนผลิตโดยยีสต์ *Yarrowia lipolytica* (Grewal and Kalra, 1995; Matthey, 1992)

1.2 การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

ยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตกรดมะนาวได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ *Candida sp.* , *Debaromyces sp.* , *Endomyces sp.* , *Hansenula sp.* , *Kloeckera sp.* , *Nocardia sp.* , *Pichia sp.* , *Rhodotorula sp.* , *Saccharomyces sp.* , *Sporobolomyces sp.* , *Torulopsis sp.* , *Trichosporon sp.* และ *Zygosaccharomyces sp.* โดยเฉพาะสกุล *Candida* (syn. *Saccharomycopsis* , *Yarrowia*) เป็นสกุลที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง (Marison , 1988) เช่น *Candida guilliermodii* (Asenjo,Szuhay and Chiu, 1982) *Candida lipolytica* , (Tabuchi and Igoshi, 1978) *Candida utilis* (Cassio and Leao , 1991) และ *Candida oleophila* (Iizuka et al. 1971) เป็นต้น ปัจจุบันการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ได้รับความสนใจมากขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากยีสต์มีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราได้แก่ ยีสต์สามารถใช้สารแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดทำให้มีโอกาสเลือกสับสเตรทที่เหมาะสมที่สุด ยีสต์มีการเจริญเติบโตเร็วทำให้ใช้เวลาในการหมักสั้นกว่า การเพาะเลี้ยงยีสต์ทำได้ง่ายกว่า และสามารถพัฒนาการผลิตเป็นแบบกระบวนการต่อเนื่องได้ในการผลิตกรดมะนาวในสภาพอาหารเหลว ยีสต์มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวจึงไม่มีปัญหาการจึกขาดของเส้นใยโดยการกวนใน

ขณะหมักเช่นเดียวกับรา ดังนั้นยีสต์จึงให้ผลผลิตสูงกว่ารา (Marison , 1988) แต่การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์มีข้อเสียที่สำคัญคือ มักพบปัญหาการปนเปื้อนของกรดไอโซซิตรริก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ ตลอดจนหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้กรดมะนาวปริมาณมากและมีกรดไอโซซิตรริกที่ต่ำลง

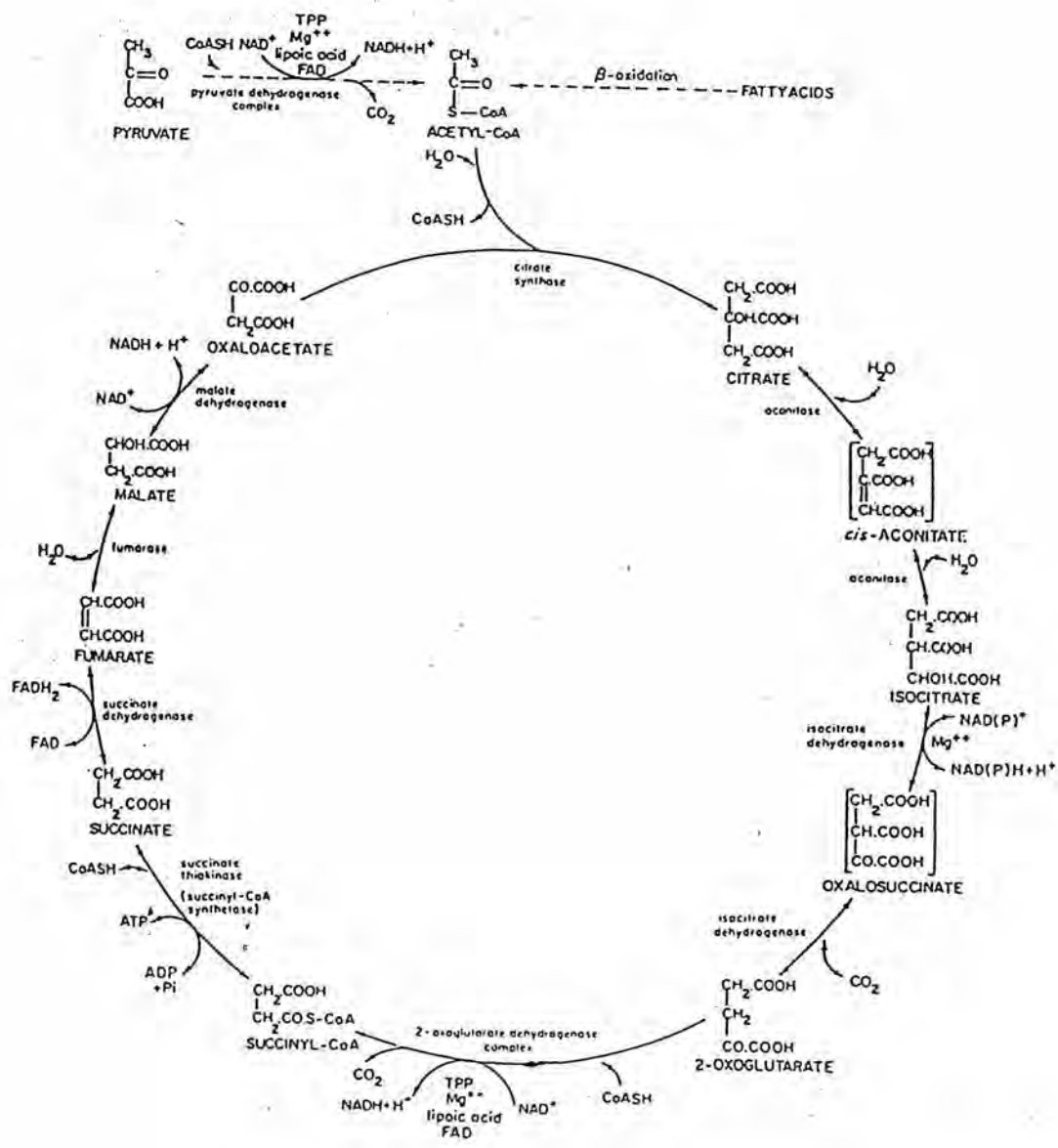
กระบวนการหมักสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้ยีสต์ เป็นกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในประเทศอุตสาหกรรม เนื่องจากให้ผลผลิตสูง ใช้แรงงานต่ำ อีกทั้งใช้พื้นที่น้อยและสามารถควบคุมภาวะต่าง ๆ ในระหว่างการหมักได้ดี โดยใช้อุปกรณ์ที่ทันสมัยและใช้เทคโนโลยีการผลิตขั้นสูง ดังหมักที่ใช้มีหลายแบบได้แก่ ดังหมักแบบหอสูง (Tower fermentor) ดังหมักแบบถังกวน (Stirred tank fermentor) (Rohr and Kubicek , 1980) และดังหมักแบบแอร์ลิฟท์ (Air - lift fermentor) (Mattey , 1992) ซึ่งวัสดุที่ใช้ทำดังหมักต้องเป็นเหล็กกล้าทนการกัดกร่อนของกรดได้ดี ในระหว่างการหมักจะต้องควบคุมปัจจัยต่างๆให้เหมาะสมเช่น ในเรื่องของอุณหภูมิ การกวน การให้อากาศ ค่าความเป็นกรด - ด่าง และสารกำจัดฟองเป็นต้น (Abou - Zeid and Ashy , 1984) ในรายงานการผลิตกรดมะนาวโดยใช้ยีสต์ ส่วนใหญ่ใช้การหมักแบบแบทช์ (Batch process) เนื่องจากสามารถป้องกันการปนเปื้อนได้ง่าย กระบวนการหมักแบบอื่น ๆ ได้มีผู้รายงานไว้เช่นกันคือ กระบวนการหมักแบบแบ่งเติมสารอาหารบางอย่าง (Fed - batch fermentation) (Rane and Sims , 1995) กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) (Aiba and Matsuoka , 1979 ; Enzminger and Asenjo , 1986 ; Klasson , Clausen and Gaddy , 1989) นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์ โดยใช้คาร์ราจีแนน และ อัลจิเนต เป็นต้น (Kautola .et al. , 1991 ; Rymowicz et al. , 1993)

1.3 ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

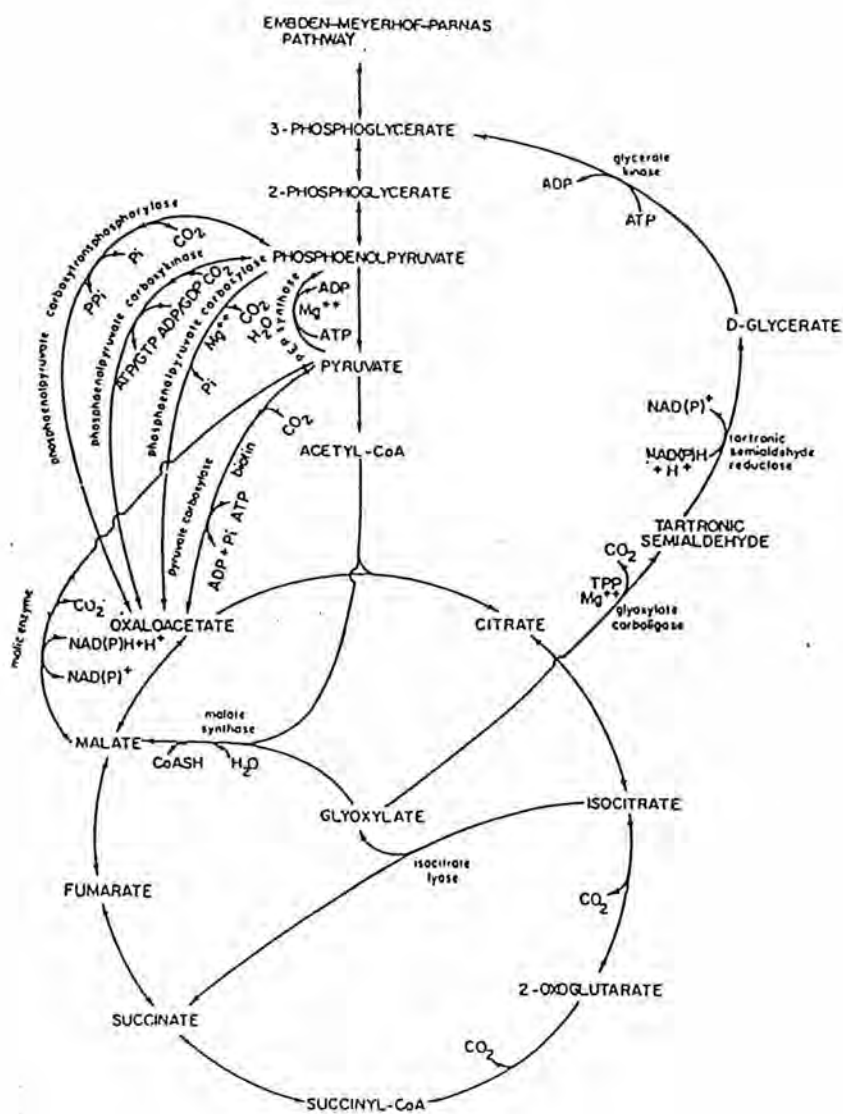
กรดมะนาวเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle หรือ Tricarboxylic acid cycle หรือ Citric acid cycle) ซึ่งเกิดในไมโทคอนเดรีย ในภาวะปกติจะถูกหลั่งออกมาออกเซลล์ในปริมาณน้อย แต่เมื่อเกิดความไม่สมดุลของ เมตาบอลิซึม หรือเกิดความบกพร่องของจีนส์ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์บางชนิดในวิถีดังกล่าวจะทำให้มีการผลิตกรดมะนาวในปริมาณสูง (Goldberg , Peleg and Roken , 1991) การผลิตและการสะสมกรดมะนาวจะถูกควบคุมโดยเอนไซม์ 2 ชนิด โดยชนิดหนึ่งจะอยู่ในระดับต่ำ ในขณะที่เอนไซม์ชนิดแรกมีกิจกรรมในระดับสูง (Ermakova et al. , 1986) ซึ่งนำไปเกิดการรวมตัวของอะซีทิลโคเอ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน

2 อะตอม (C_2) จับตัวกับออกซาโลอะซิเตต ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 4 อะตอม (C_4) ได้จาก ไพรูเวท หรือจากฟอสโฟอินอลไพรูเวทหรือจากวัฏจักรเครปส์เองเกิดเป็นกรดมะนาวซึ่งมีคาร์บอน 6 อะตอม (C_6) และเมื่อกรดมะนาวสะสมในปริมาณมากขึ้น จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ อะโคนิเตส และ ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส เพื่อเปลี่ยนแปลงกรดมะนาวเป็นสารตัวกลาง ตัวอื่น ๆ ในวัฏจักร ต่อไป (Kubicek and Rohr , 1986) ยีสต์จะเริ่มผลิตกรดมะนาวในระยะการเจริญแบบคง ที่ภายใต้ภาวะที่มีไนโตรเจนปริมาณจำกัด ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประจุพลังงาน (Energy charge) ภายในเซลล์ โดยอัตราส่วนของ ATP ต่อ AMP จะเพิ่มขึ้น ซึ่ง ATP ที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส (NAD : IDH) ทำให้มีการผลิตกรดมะนาวในปริมาณมาก (Sokolov et al. , 1995) ดังนั้นถ้าต้องการทำให้ได้กรดมะนาวมาก ๆ จึงต้องหาทางชะลอการทำงานของวัฏจักร ไ่ว์ที่การผลิตกรดมะนาวโดยลดกิจกรรม ของเอนไซม์ทั้งสอง สำหรับเอนไซม์อะโคนิเตสทำได้โดยให้มี Fe^{2+} ในความเข้มข้นต่ำ ๆ หรือใช้สารยับยั้ง เช่น ฟลูออโรอะซิเตต (Akiyama et al. ,1973 ; Cartledge , 1987 ; Tani , Sakai and Chou , 1990) ซึ่งยับยั้งเอนไซม์แบบแข่งขัน (Competitive inhibition) และสำหรับเอนไซม์ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนสนั้น จะลดกิจกรรมได้โดยเติมสารยับยั้ง เช่น โฟแทสซีมเฟอร์โรไซยาไนด์ (Marison , 1988)

การผลิตกรดมะนาวโดยการหมักนั้น นอกจากอาศัยวัฏจักรเครปส์แล้ว จุลินทรีย์ยังต้องมีวิถี เมตาบอลิซึมอื่น ๆ เพื่อเปลี่ยนสับสเตรทเป็นออกซาโลอะซิเตต และ อะซิทิลโคเอ็นไซม์เอ เช่น วิถี ไกลโคไลซิส (Glycolysis) ซึ่งเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวทเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ ดังรูปที่ 1-1 วัฏจักร ไกลออกซิเลต (Glyoxylate cycle) ซึ่งจะช่วยสร้างสารตัวกลางบางชนิด เพิ่มให้กับวัฏจักรเครปส์ เช่น มาเลต ซัคซิเนต เป็นต้น และปฏิกิริยาอะแนปเลอร์โรติกซิควเอนซ์ (Anaplerotic sequences reaction) เพื่อเพิ่มออกซาโลอะซิเตต อันเป็นสารตัวกลางที่สำคัญของวัฏจักรเครปส์ (Marison , 1988) ซึ่งรูปแสดงความสัมพันธ์ของวัฏจักรเครปส์ วัฏจักรไกลออกซิเลตและปฏิกิริยาทดแทนอะนา พลโรติกแสดงดังรูปที่ 1-2



รูปที่ 1-1 วงจรเครปส์หรือวัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิก
ที่มา Singleton and Sainsbury, 1988



รูปที่ 1-2 ความสัมพันธ์ของวัฏจักรเครปส์ วัฏจักรไกลออกซิเลตและปฏิกิริยาทดแทนอะนาพลิโรติก
ที่มา : Singleton and Sainsbury, 1988

1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้นจะประสบความสำเร็จหรือไม่ ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการคือสายพันธุ์ยีสต์ และภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสายพันธุ์ และวิธีการที่ใช้ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาปัจจัยทั้ง 2 ประการนี้ควบคู่กันไป

1.4.1 สายพันธุ์ของยีสต์

ปัจจุบันพบว่า ยีสต์หลายสายพันธุ์โดยเฉพาะในกลุ่ม *Candida sp.* สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดี การผลิตกรดมะนาวควรมีหลักดังนี้คือ มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดมะนาวและจีนส์ที่ควบคุมการผลิตกรดมะนาวมีความเสถียรให้ผลผลิตสม่ำเสมอ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ให้กรดชนิดอื่นที่ไม่ต้องการในปริมาณน้อย ทนต่อโลหะหนักที่มีผลต่อการผลิตได้สูง มีกิจกรรมของเอนไซม์อะโคนิเตสต่ำ และใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น

1.4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

1.4.2.1 สารแหล่งคาร์บอน

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ดังมีรายงานการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์จากสารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กลูโคส (Ermakova et al. ,1986 ; Rane and Sims , 1993) แอลกอฮอล์ กลีเซอรอล กรดไขมัน นอร์มัล - พาราฟฟิน (Ikeno et al. , 1975) ฟรุทโทส กากน้ำตาล แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วด้วยเอนไซม์ (Shah et al., 1993) เซลลูโลสที่ผ่านการย่อยแล้ว (Asenjo et al., 1982 ; Maddox et al., 1985) สารไฮโดรคาร์บอน (Gledhill , Hill and Hodson , 1973) โดยที่ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวนั้น ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้ นอกจากนี้ควรเป็นสารที่หาได้ สม่ำเสมอ และราคาถูกเพื่อให้สามารถขยายไปสู่ระดับอุตสาหกรรมได้

1.4.2.2 สารแหล่งไนโตรเจน

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้นจำเป็นต้องควบคุมปริมาณสารแหล่งไนโตรเจนเพียงพอต่อการเจริญเท่านั้น เนื่องจากยีสต์จะสะสมกรดมะนาวหลังจากที่แหล่งไนโตรเจนในอาหารถูกใช้หมดแล้ว (Mckay , Maddox and Brooks , 1994) สำหรับชนิดของสารแหล่งไนโตรเจน พบว่ายีสต์สามารถใช้ได้ทั้งในรูปของอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่

สารสกัดจากยีสต์ เปปโติน น้ำแช่ข้าวโพด (Cornsteep liquor) ส่วนอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต โซเดียมไนเตรต เป็นต้น ชนิดของสารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ ซึ่งอาจเลือกใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือใช้ควบคู่กันก็ได้ (Abou - Zeid and Ashy , 1984)

1.4.2.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นสารที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดถึงกลไกการควบคุมทางชีวเคมีและทางชีวภาพ แต่อาศัยหลักความจริงที่ว่า ฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อเมตาบอลิซึม เพื่อให้ได้พลังงาน และยังเป็นองค์ประกอบของส่วนสำคัญต่าง ๆ ในเซลล์เช่น กรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ และฟอสโฟลิปิด เป็นต้น ดังนั้นการจำกัดปริมาณฟอสเฟต ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ และการไม่แสดงออกของจิ้นส์ ทำให้เกิดการสะสมของกรดมะนาว (Kubicek and Rohr , 1986) โดยรูปของฟอสเฟตที่นิยมใช้คือ โฟแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

1.4.2.4 แร่ธาตุ

แร่ธาตุหลายชนิดมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ ได้แก่ แมกนีเซียม แมงกานีส เหล็ก ทองแดง สังกะสี ตะกั่ว เป็นต้น Shimizu และคณะ (1970) พบว่า แมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟต เป็นแร่ธาตุ ที่จำเป็นต่อการผลิตกรดมะนาว (อ้างถึงใน Abou -Zeid and Ashy , 1984) และแมกนีเซียมยังเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิดภายในเซลล์ที่สำคัญคือ เอนไซม์จำพวกโคเนส (Marison , 1988) จากรายงานของ Furukawa และคณะ (1977) พบว่า การเติมเหล็กซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เชื้อ *Candida sp.* ผลิตกรดมะนาวได้น้อยลงแต่ผลิตกรดไอโซซิทริกมากขึ้น แต่การเติมทองแดงซัลเฟตให้มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้ปริมาณกรดมะนาวเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มปริมาณทองแดงซัลเฟตจะทำให้การผลิตกรดไอโซซิทริกลดลง Fired (1972) ได้รายงานว่า การเลี้ยงเชื้อ *Candida sp.* ในอาหารที่มีตะกั่วปริมาณ 0.5 -1.5 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้กรดมะนาวสูงกว่าอาหารที่ไม่มีการเติมตะกั่ว ส่วนเหล็กไอออนจะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเตสทำให้กรดมะนาวถูกเปลี่ยนเป็นกรดไอโซซิทริก

1.4.2.5 สารเสริมอื่น ๆ

นอกจากสารต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นยังมีการเติมสารบางชนิดซึ่งเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญ และการผลิตกรดมะนาวของยีสต์ เช่น ไทอะมีน ซึ่งให้อยู่ในรูปของไทอะมีนไฮโดรคลอไรด์ กรดนิโคตินิก และไมโคติน (Kubicek and Rohr , 1986) หรือเติมสารประกอบอินทรีย์ เช่น สารสกัดจากยีสต์ และน้ำแช่ข้าวโพด เป็นต้น (Abou - Zeid and Ashy , 1984)

1.4.2.6 ค่าความเป็นกรด - ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้น พบว่าเมื่อมีการสะสมกรดมะนาวระหว่าง การหมักจำเป็นต้องเติมสารที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ไปแต่สโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างที่ลดลงที่ซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดมะนาว (Moresi, 1994) โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อจะอยู่ในช่วง 4.5-6.5 (Kubicek and Rohr,1986) ในการเลือกใช้สารโดยอ้อมขึ้นอยู่กับความเหมาะสม สำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่านิยมใช้แคลเซียมคาร์บอเนต โดยการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น (Kubicek and Rohr , 1986) ถ้าค่าความเป็นกรด - ด่างสูงเกินไปยีสต์จะผลิตสารพวก โพลีออล อีทรีออล และแมนนิทอล แทนการผลิตกรดมะนาว (อ้างถึงใน Matthey , 1992)

1.4.2.7 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาวนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้ โดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 25 -30 องศาเซลเซียส (Marison , 1988) Furukawa และคณะ (1977) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Candida citrica* MT - 1001 พบว่าที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง เนื่องจากยีสต์นำสืบสเตรทไปใช้ในการเจริญเติบโตมาก และใช้สร้างกรดอินทรีย์อื่น ๆ แทนกรดมะนาว เช่น กรดไอโซซิตรีก เป็นต้น

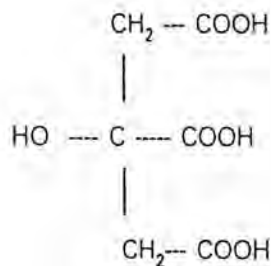
1.4.2.8 การให้อากาศและการกวน

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์เป็นกระบวนการหมักในภาวะที่ต้องการอากาศ ดังนั้นในระหว่างการหมักโดยเฉพาะในช่วงที่เชื้อมีการเจริญจำเป็นต้องให้อากาศอย่างเพียงพอ ซึ่งการถ่ายเทออกซิเจนในถังหมักขึ้นกับองค์ประกอบหลายอย่างเช่น อัตราการให้อากาศ และ

อัตราการกวน ต้องใช้ควบคู่กันอย่างเหมาะสม (Iizuka et al., 1971) จากรายงานของ Rane และ Sims (1994) รายงานว่าการเพิ่มค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Candida lipolytica* Y 1095 สูงขึ้น สำหรับการเลี้ยงยีสต์ในระดับขวดเชย่า จะใช้วิธีการเชย่าภาชนะแบบวงกลมมากกว่าเส้นตรง ถึงแม้ว่า การเชย่าแบบเส้นตรงจะมีอัตราการแลกเปลี่ยนออกซิเจนสูงกว่าแบบวงกลมแต่การเชย่าแบบเส้นตรงจะเกิดการกระเด็นของสัปดาห์ไปตามข้างผนังขวดมากกว่าการเชย่าแบบวงกลม (เวรดี เลิศไตรรัตน์, 2535)

1.5 คุณสมบัติของกรดมะนาว

กรดมะนาวเป็นกรดอินทรีย์มีชื่อทางเคมีว่า กรด 2-ไฮดรอกซี-1,2,3-โพเพนไตรคาร์บอกซิลิก ซึ่งใน 1 โมเลกุล ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม มีหมู่คาร์บอกซิล 3 หมู่และไฮดรอกซิล 1 หมู่ มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 1-3



รูปที่ 1-3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว

กรดมะนาวที่อยู่ในรูปปราศจากน้ำ (Anhydrous citric acid) มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ น้ำหนักโมเลกุล 192.13 ได้จากการตกผลึกสารละลายเข้มข้นของกรดมะนาวในขณะที่ยังร้อน (อุณหภูมิสูงกว่า 36.6 องศาเซลเซียส) มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 153 องศาเซลเซียสมีความหนาแน่นเท่ากับ 1.665 ส่วนกรดมะนาวชนิดที่มีน้ำอยู่ 1 โมเลกุล (Citric acid monohydrate) มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ น้ำหนักโมเลกุล 210.14 ได้จากการตกผลึกสารละลายที่เย็น (อุณหภูมิต่ำกว่า 36.6 องศาเซลเซียส) มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีความหนาแน่นเท่ากับ 1.542 กรดมะนาวมีค่า pK ที่ 25 องศาเซลเซียสดังนี้ $\text{pKa}_1 = 3.128$, $\text{pKa}_2 = 4.761$ และ $\text{pKa}_3 = 6.396$ ลักษณะทั่วไปเป็นผลึกสีขาวมีรสเปรี้ยว มีความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายได้ง่าย ละลายได้ดี

ในน้ำ โดยอุณหภูมิยิ่งสูงความสามารถในการละลายน้ำจะดียิ่งขึ้น (Bouchard and Merritt ,1979 ; Kubicek and Rohr,1986) สำหรับมาตรฐานของกรดมะนาวที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมนั้น ต้องมีคุณลักษณะทางเคมีตามพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรมซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 1-1

1.6 มาตรฐานของกรดมะนาว

ตารางที่ 1-1 คุณลักษณะทางเคมีตามมาตรฐานกรดมะนาว

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด	
		กรดซิตริกโมโนไฮเดรต	กรดซิตริกอโนไฮดริล
1	ความบริสุทธิ์ $C_6H_8O_7$, จำนวนในสภาพแห้ง 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	สารละลายตัวอย่าง ต้องไม่ขุ่นกว่า สารละลายมาตรฐานสอบเทียบ	
9	แคลเซียม มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	200	200
10	เหล็ก มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
11	คลอไรด์ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
12	สารที่สลายให้คาร์บอนได้ง่าย (readily carbonizable substance)	สีของสารละลายตัวอย่างต้องไม่เข้มกว่า สีของสารละลายสีมาตรฐาน	

ที่มา : พระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (กรดมะนาว) พ.ศ. 2535

1.7 ประโยชน์ของกรดมะนาว

ปัจจุบันทั่วโลกมีความต้องการกรดมะนาวอย่างมากและยังต้องการเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ประมาณร้อยละ 2 - 3 ต่อปี (Goldberg et al., 1991) เนื่องจากกรดมะนาวมีความสามารถในการละลายสูง ความเป็นพิษต่ำ มีรสเปรี้ยวเป็นที่ยอมรับ และมีคุณสมบัติในการจับไอออนของโลหะหนักและการเป็นบัฟเฟอร์ ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้มาก (Bouchard and Merritt , 1979 ; Matthey , 1992) ประเทศที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตกรดมะนาวคือ สหรัฐอเมริกา ซึ่งผลิตได้ประมาณ 180 ล้านกิโลกรัมต่อปี จากกรดมะนาวที่ผลิตได้ทั้งหมด จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และ เครื่องดื่มประมาณร้อยละ 70 ใช้ในอุตสาหกรรมเภสัชกรรมประมาณร้อยละ 12 และอีกประมาณร้อยละ 18 ถูกใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ (Marison , 1988) ซึ่งรายละเอียดของการใช้ประโยชน์จากกรดมะนาวมีดังนี้

1.7.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ใช้กรดมะนาวเป็นสารให้ความเปรี้ยวและเพิ่มรสชาติในการทำน้ำผลไม้ อาหารกระป๋อง น้ำขวด เจลลี่ ขนมหวานจำพวกแยม ป้องกันการบูดเสียในเครื่องดื่ม เนยแข็งและเนยเหลว ป้องกันการขึ้นและการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในไวน์ ป้องกันการตกผลึกของน้ำผึ้ง ช่วยเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำขวด ซึ่งสารปรับกรดในอุตสาหกรรมอาหารมีมากมายหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่ใช้กรดมะนาว คือประมาณร้อยละ 73 รองลงมาเป็นกรดฟอสฟอริกประมาณร้อยละ 15 ส่วนที่เหลือเป็นกรดอื่น ๆ เช่น กรดมาลิก กรดฟูมาริก กรดแลคติก และกรดทาร์ทาริก เป็นต้น (Goldberg et al., 1991)

1.7.2 อุตสาหกรรมทางเภสัชกรรม

ใช้เป็นยาลดกรดในกระเพาะอาหารโดยผสมกับไบคาร์บอเนตและคาร์บอเนต ซึ่งทำให้เกิดฟองฟูในน้ำดื่ม ใช้กรดมะนาวและโซเดียมซิทเรต ในการเตรียมสารละลายสำหรับการป้องกันการแข็งตัวของเลือด และช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเตรียมวิตามิน เป็นต้น (Bouchard and Merritt , 1979)

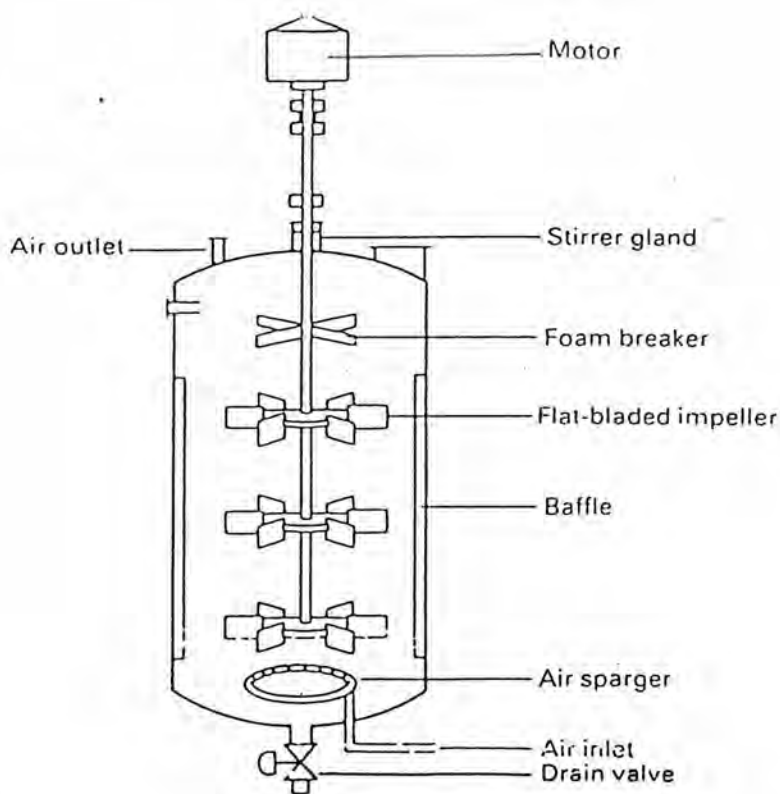
1.7.3 อุตสาหกรรมด้านอื่น ๆ

ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกมีการใช้เกลือไตรโซเดียมซีเตรตแทนสารเตตระโพแทสเซียมไพโรฟอสเฟต เนื่องจากย่อยสลายง่าย ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของวัชพืชน้ำ และไม่เห็นพิษต่อสัตว์น้ำ ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางค์ จะใช้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่าง ในครีมนวดผม น้ำยาดัดผม น้ำยาทำความสะอาดใบหน้าและโลชั่น ในอุตสาหกรรมโลหะ ใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมในน้ำยาขัดโลหะ น้ำยาล้างสนิม นอกจากนี้ยังใช้ป้องกันการเกิดเมือก และตะกรันในอุปกรณ์บำบัดน้ำเสียแบบออสโมซิสผันกลับ (Reverse osmosis) อีกด้วย (Bouchard and Merritt , 1979)

1.8 การขยายส่วนการผลิต (Scale - up)

เนื่องจากปัจจุบันความต้องการใช้กรดมะนาวนั้นมีมากขึ้น ทำให้ต้องมีการเพิ่มผลผลิตซึ่งสามารถทำได้โดย การขยายส่วนกำลังการผลิตที่ได้จากกระบวนการหมัก ซึ่งการขยายส่วนกำลังการผลิตนั้น ต้องใช้ข้อมูลที่ได้จากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ หรือจากโรงประลอง ใช้เพื่อออกแบบโรงงานขึ้นผลิตซึ่งต้องสามารถให้ผลผลิตใกล้เคียงกับระดับห้องปฏิบัติการ ในการขยายส่วนการผลิตจากระดับห้องปฏิบัติการจนมีขนาดใหญ่ขึ้นพบว่าเกิดปัญหาหลายอย่าง ซึ่งปัญหาหนึ่งที่สำคัญคือ ผลผลิตที่ได้ในระดับที่มีการขยายส่วน มักไม่ดีเท่ากับในระดับห้องปฏิบัติการ (Crueger and Crueger, 1984) ซึ่งสาเหตุเกิดจากความแตกต่างในด้านต่าง ๆ ได้แก่ เทคนิคการให้อากาศ และการกวน การทำให้ปลอดเชื้อ การเตรียมหัวเชื้อ การกำจัดฟอง และวัตถุดิบที่ใช้ (Elander , 1989)

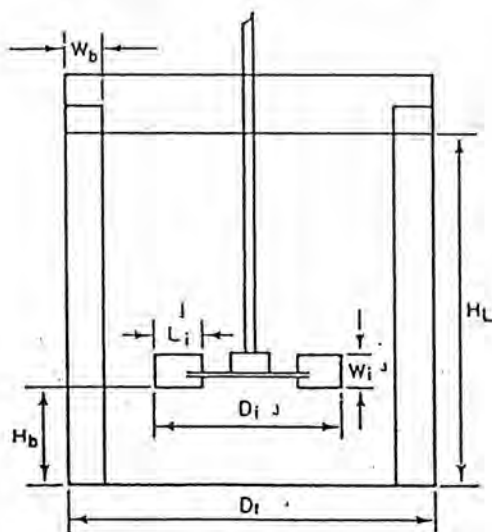
สำหรับในการขยายส่วนการผลิต ได้มีหลักเกณฑ์ที่ต้องใช้พิจารณาในการขยายส่วน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องเลือกหลักเกณฑ์ที่ใช้ให้เหมาะสมกับชนิดของเครื่องหมัก ในการหมักที่ใช้ถังหมักที่มีรูปร่างทางเรขาคณิตเหมือนกัน แต่มีขนาดต่างกันนั้น การที่จะทำให้ค่าตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตให้คงที่ทั้งหมดนั้นเป็นไปได้ยาก (Wang et al ., 1979) ดังนั้นการขยายส่วนอาจไม่จำเป็นต้องคำนึงถึงรูปร่างทางเรขาคณิตที่เหมือนกัน ซึ่งจะทำให้ผู้ออกแบบสามารถออกแบบได้อย่างยืดหยุ่น (Charles . 1985) โดยส่วนประกอบต่าง ๆ ของถังหมักมีลักษณะดังรูปที่ 1-4 และ สัดส่วนทางเรขาคณิตของถังหมักมาตรฐานนั้นได้แสดงดังรูปที่ 1-5



รูปที่ 1-4 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของถังหมัก (Scragg.A.H. 1991)

สัดส่วนทางเรขาคณิตของถังหมักมาตรฐาน

(Kristiansen and Chamberlain , 1983)



Geometric ratio for standard fermenter

$\frac{D_i}{D_t}$	$\frac{H_L}{D_t}$	$\frac{L_i}{D_i}$	$\frac{W_i}{D_i}$	$\frac{H_b}{D_i}$	Baffles N_b	$\frac{W_b}{D_t}$
0.33	1.0	0.25	0.2	1.0	4	0.1

รูปที่ 1-5 สัดส่วนทางเรขาคณิตของถังหมักมาตรฐาน

1.8.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการขยายส่วนการผลิตนั้นพบว่า มี 3 ปัจจัย ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1-2 ซึ่งทั้ง 3 ปัจจัยนั้นได้แก่

1.8.1.1 ปัจจัยทางฟิสิกส์ ได้แก่ อุณหภูมิ แรงเฉียร์ (shear) เป็นต้น

1.8.1.2 ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรด - ด่าง ความสามารถในการละลายของอากาศ เป็นต้น

1.8.1.3 ปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ ความคงตัวของสายพันธุ์จุลินทรีย์ ปริมาณเซลล์ เป็นต้น

ตารางที่ 1-2 ปัจจัยที่มีผลต่อการขยายส่วน (Dewitt ,Jackon and Paulus , 1989)

Parameter	Mechanical control mechanism	Biological control mechanism
Physical		
Temperature	Cooling or heating system	Heat of metabolism
Shear	Tank, Impeller design	Rheology
Interphase mass transfer	rpm, agitation	Rheology
Chemical		
pH	Acid or base addition	Uptake rates
Dissolved gasses	Head pressure, transfer rates via rpm	Uptake rates
Other nutrients	Initial medium Feed systems Volume control Sterilization methods	Uptake rates
Product concentrations	Harvest methods	Productivity rates
Biological		
Cell mass	Environmental control via the above	Growth rates
Strain stability	Inoculum methods	Reversion, selection

จากตารางที่ 1-2 ปัจจัยที่มีผลต่อการขยายส่วนนั้นมี 3 ปัจจัย โดยสามารถทำการควบคุมปัจจัยได้ 2 กลไก คือ

- ก. การควบคุมโดยกลไกทางกล (Mechanical control mechanism)
- ข. การควบคุมโดยกลไกทางชีวภาพ (Biological control mechanism)

1.8.3 เกณฑ์กายภาพที่นิยมใช้กำหนดการขยายส่วนของเครื่องหมักแบบถังกวนได้แก่ (Wang , et al., 1979)

- ค่าเรโนลด์นัมเบอร์ (Reynolds number , N_{Re})
- ความเร็วรอบของปลายใบพัด (πnDi)
- อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (Pg / V)
- สัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน (K_{La})
- เวลาที่ใช้ในการกวน

1.8.3.1 ค่าเรโนลด์นัมเบอร์ (Reynolds number , N_{Re}) เป็นค่าที่แสดงความรุนแรงในการกวน สามารถคำนวณได้จากสมการ (Aiba , Humphrey and Mills ,1973)

$$\text{Reynolds number} \quad , \quad N_{Re} = \rho n Di^2 / \mu \quad \text{-----} \quad 1$$

เมื่อ

Di = เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด (cm)

n = ความเร็วรอบของการกวน (sec^{-1})

ρ = ความหนาแน่นของน้ำหมัก (g/cm^3)

μ = ความหนืดของน้ำหมัก ($\text{g/cm} \cdot \text{sec}$)

สำหรับการขยายส่วนโดยกำหนดให้ค่า Reynolds number คงที่ในการผลิตที่มีขนาดแตกต่างกันจะแสดงได้ดังสมการ

$$\text{Reynolds number} \quad \propto \quad n Di^2 \quad \text{-----} \quad 2$$

$$n_1 D_{i_1}^2 = n_2 D_{i_2}^2$$

1.8.3.2 ความเร็วรอบปลายใบพัด ($\pi n D_i$)

เนื่องจากเครื่องหมักแบบดังกวนที่มีการผสมดี จะเกิดแรงเฉือนขึ้นภายใน ซึ่งแรงเฉือนนี้มีผลต่อการละลายของออกซิเจนการกระจายของสารอาหารและเซลล์ ซึ่งแรงเฉือนนั้นจะเกิดที่บริเวณปลายของใบพัด ซึ่งความเร็วที่เกิดขึ้นที่ปลายใบพัด แสดงดังสมการ (Pace , 1985)

$$\text{Tip speed} \propto n D_i \quad \text{-----} \quad 3$$

ดังนั้นความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อภาวะการหมักเหมือนกันในการผลิตที่มีขนาดแตกต่างกันจะได้ว่า

$$n_1 D_{i_1} = n_2 D_{i_2} \quad \text{-----} \quad 4$$

เมื่อ

$$n = \text{ความเร็วรอบของการกวน (sec}^{-1}\text{)}$$

$$D_i = \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด (cm)}$$

1.8.3.3 อัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P_g / V)

เนื่องจากอัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P_g / V) มีความสัมพันธ์กับค่า power number N_p ซึ่งเป็นค่าที่ถูกกำหนดขึ้นจากตัวแปรของการเปลี่ยนแปลงขนาดที่มีความสัมพันธ์ กับ กำลังของมอเตอร์ ที่ต้องใช้ในถังหมักแบบดังกวน ซึ่งเราสามารถคำนวณได้จาก (Aiba , et al. , 1973)

$$\begin{aligned} \text{Power number} &= N_p = \frac{P_{g_c} / n D_i \times 1 / D_i^3}{\rho n^2 D_i} \\ &= P_{g_c} / n^3 D_i^5 \rho \quad \text{-----} \quad 5 \end{aligned}$$

เมื่อ

$$P = \text{กำลังของมอเตอร์ (kgm / sec)}$$

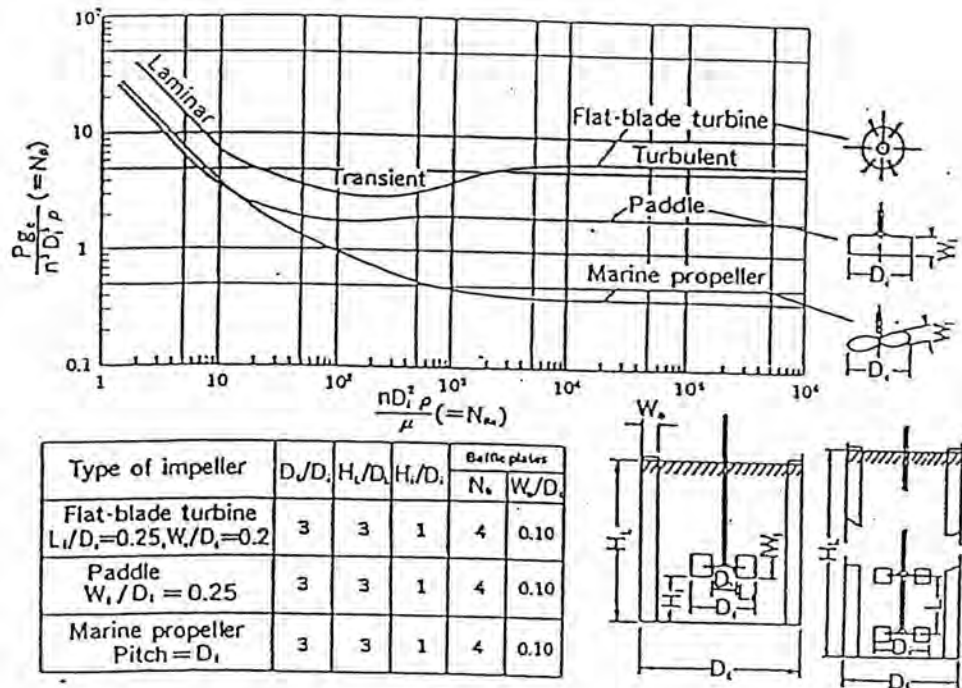
$$g_c = \text{conversion factor (kgm / kg sec}^2\text{)}$$

$$n = \text{ความเร็วรอบของการกวน (sec}^{-1}\text{)}$$

D_i = เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด (cm)

ρ = ความหนาแน่นของน้ำหนัก (g/cm^3)

และเนื่องจาก power number (N_p) มีความสัมพันธ์กับค่า Reynolds number (N_{Re}) จากสภาพการไหลในลักษณะต่าง ๆ ดังรูปที่ 1-6



รูปที่ 1-6 ความสัมพันธ์ของ N_p และ N_{Re} (Aiba et al, 1973)

จากสภาพการไหลลักษณะต่าง ๆ จะได้ความสัมพันธ์ของ N_p และ N_{Re} ดังนี้คือ (Miura, 1976)

1. เมื่อการไหลมีลักษณะแบบราบเรียบ (laminar flow) ซึ่งค่า N_{Re} มีค่า < 10 มีความชัน = - 1 จึงได้ความสัมพันธ์ว่า

$$N_p = K_1 (N_{Re})^{-1}$$

2. เมื่อการไหลมีลักษณะแบบปั่นป่วน (turbulent flow) ซึ่งค่า N_{Re} มีค่า $> 10^4$ มีความชัน = 0 จะทำให้ค่า N_p ได้ความสัมพันธ์ว่า

$$N_p = K_1 \quad \text{_____} \quad 7$$

สำหรับการขยายส่วนที่มีลักษณะทางเรขาคณิตเหมือนกัน โดยการกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรของน้ำหมักคงที่ โดยที่ถังหมักมาตรฐาน ซึ่งได้ออกแบบให้มีการไหลเป็นแบบปั่นป่วน (turbulent flow) และมีการใช้ใบพัดแบบ flat - blade turbine สามารถแสดงได้ดังสมการคือ

$$\begin{aligned} N_p &= K_1 \\ Pgc / n^3 Di^5 \rho &= K_1 \\ Pgc &= K_1 n^3 Di^5 \rho \end{aligned} \quad \text{_____} \quad 8$$

ในการขยายส่วนโดยกำหนด ให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักคงที่นั้น จะได้ว่า

$$Pgc / V = K_1 n^3 Di^5 \rho / V \quad \text{_____} \quad 9$$

โดยที่ปริมาตรของถังหมักมาตรฐานนั้นมีความสัมพันธ์เป็น

$$V \propto Di^3$$

ทำให้

$$\begin{aligned} Pgc / V &= K_1 n^3 Di^5 \rho / D^3 \\ Pgc / V &= K_1 n^3 Di^2 \rho \end{aligned} \quad \text{_____} \quad 10$$

ดังนั้นความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อภาวะการหมักเหมือนกัน ในการผลิตที่มีความแตกต่างกัน จะได้ว่า

$$n_1^3 Di_1^2 = n_2^3 Di_2^2 \quad \text{-----} \quad 11$$

$$n_2 = n_1 (Di_1 / Di_2)^{2/3} \quad \text{-----} \quad 12$$

1.8.3.4 สัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน ($K_L a$)

สำหรับการหมักโดยจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ ปัญหาที่สำคัญคือ การละลายของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงซึ่งเป็นปัจจัยที่ต้องควบคุมเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์มีความต้องการอากาศเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งมีความต้องการอากาศหรือ ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงนั้น แสดงได้โดยอาศัยความสัมพันธ์ของการถ่ายเทออกซิเจน (oxygen transfer rate = OTR)

$$OTR = K_L a (C^* - C) \quad \text{-----} \quad 13$$

เมื่อ

OTR = อัตราการถ่ายเทออกซิเจน

$K_L a$ = สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (hr^{-1})

C^* = ความเข้มข้นอิ่มตัวของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลว (mmol / l)

C = ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเหลว (mmol / l)

และเนื่องจากรูปแบบและขนาดของถังหมักมีความสัมพันธ์กับการกำหนดค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนซึ่งมีความสัมพันธ์ดังนี้ (Pace , 1985)

$$K_L a = f (Pg / V)^2 (Vs)^3 (B / 6)^{0.8} (J / Di)^{0.3} \quad \text{-----} \quad 14$$

เมื่อ

Pg = กำลังที่ใช้ในการกวน (hp)

Vs = ความเร็วของอากาศ (cm/sec)

Di = เส้นผ่านศูนย์กลางของใบกวน (cm)

B = จำนวนใบพัด

J = ความกว้างของครีบ (baffle) (cm)

V = ปริมาตรในถังหมัก (cm)

สำหรับการขยายส่วน การกำหนดให้ลักษณะทางเรขาคณิตของถังหมักเหมือนกันจะได้ความสัมพันธ์ใหม่เป็น (Scragg.A.H. 1991)

$$K_L a = K (Pg / V)^\alpha (Vs)^\beta \quad \text{-----} 15$$

โดยที่

K = ค่าคงที่

α = ค่าคงที่

β = ค่าคงที่

จากสมการที่ 15 ในกรณีที่ไม่สามารถวัดอัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักได้โดยตรงนั้น สามารถที่จะใช้ค่าความเร็วรอบของการกวนแทนได้ เนื่องจากอัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักนั้นเปลี่ยนแปลงตามความเร็วรอบของการกวน ดังนั้นจะได้สมการใหม่เป็น

$$K_L a = K (n)^\alpha (Vs)^\beta \quad \text{-----} 16$$

เมื่อ

n = ความเร็วรอบของการกวน (sec⁻¹)

1.8.3.5 เวลาที่ใช้ในการกวนผสม

ในการผลิตที่มีการเพิ่มขนาดมากขึ้น หรือมีการขยายส่วนการผลิตขึ้น พบว่าปัญหาที่มักเกิดขึ้นคือ ในถังหมักที่มีขนาดใหญ่ที่ซึ่งมีปริมาตรมากกว่า 5,000 ลิตร จะเกิดการกวนผสมไม่ดีเท่ากับถังหมักที่มีขนาดเล็กที่ซึ่งมีปริมาตรน้อยกว่า 500 ลิตร ทำให้ในถังหมักขนาดใหญ่มีลักษณะของมวลสารไม่เป็นเนื้อเดียวกัน Wang และคณะ (1979) ได้ใช้ dimensional analysis

techniques พิจารณาค่าเวลาที่ใช้ในการกวนผสมสำหรับถังหมักที่มีลักษณะทางเรขาคณิตเหมือนกัน โดยกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักมีค่าคงที่ ได้ความสัมพันธ์ดังนี้

$$t_{m1} / t_{m2} = (D_{i1} / D_{i2})^{11/18} \quad \text{-----} \quad 17$$

เมื่อ

t_m = เวลาที่ใช้ในการกวนผสม (hr)

D_i = เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด (cm)

สำหรับเวลาที่ใช้ในการกวนผสม หาโดยดูเวลาที่ทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ มีการผสมกันจนเป็นเนื้อเดียวกันซึ่งสามารถวัดโดยติดตามเวลาที่เกิดการกระจายตัวของ Tracer ซึ่ง ตัว Tracer ได้แก่สารละลายที่เป็นกรด - เบส จากสมการเมื่อขยายขนาดของถังหมักเพิ่มขึ้น เวลาที่ใช้ในการกวนจะเพิ่มขึ้น

1.9 มุลเหตุจูงใจในการทำการวิจัย

เนื่องจากในปัจจุบันมีการนำกรดมะนาวมาใช้ประโยชน์อย่างมากมายในทางอุตสาหกรรม และในปัจจุบันมีแนวโน้มความต้องการกรดมะนาวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้ประเทศไทยต้องนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 1-3 อีกทั้งประเทศไทยมีแหล่งวัตถุดิบมากมายที่สามารถใช้ผลิตกรดมะนาวได้ ดังนั้นทางสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้เห็นความสำคัญในส่วนนี้ จึงได้ดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตกรดมะนาวอย่างต่อเนื่อง อันได้แก่ การคัดเลือกสายพันธุ์และการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลการผลิต การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตในระดับขวดเขย่า และถังหมักขนาด 5 ลิตร

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษานาเกณฑ์และตัวแปรที่มีผลต่อการขยายส่วน รวมถึงเก็บข้อมูลพื้นฐานทางจุลนพลศาสตร์ ในระดับถังหมักขนาด 30 และ 300 ลิตร เพื่อใช้เป็นแนวทางการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ตารางที่ 1-3 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2531 -2540

ปี พ.ศ.	ปริมาณ (กิโลกรัม)	มูลค่า (บาท)
2531	777,111	26,127,593
2532	1,1460,893	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	2,222,539	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

ที่มา : กรมศุลกากร

1.10 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาเกณฑ์การขยายส่วนของเครื่องหมักแบบถังกวน
2. ศึกษาพารามิเตอร์ที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วน
3. ให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการขยายส่วนของการผลิตกรดมะนาวในเชิงจุลนพลศาสตร์ของกระบวนการในถังหมัก

1.11 ขั้นตอนการวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลจากรายงาน เอกสาร และ สிทธิบัตร
2. วิเคราะห์หาพารามิเตอร์ที่เป็นปัจจัยสำคัญ สำหรับการขยายส่วนในการผลิตกรดมะนาวจากรายงานเอกสารและสิทธิบัตร
3. กำหนดเกณฑ์ในการขยายส่วนสำหรับการผลิตกรดมะนาว
4. ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ ของการผลิตกรดมะนาว
5. ศึกษาหาผลของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนขนาด 30 และ 300 ลิตร