บทที่1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

กรดมะนาว (Citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งซึ่งพบในผลไม้หรือเมล็ดของผักหลายชนิด โดยเฉพาะผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะนาว พืชตระกูลส้ม สับปะรด แพร์ พีช จะมีปริมาณกรดมะนาวสูง ในปี ค.ศ. 1784 Karl Wilhelm Scheele สามารถแยกกรดมะนาวจากน้ำมะนาวได้สำเร็จเป็นครั้งแรก โดยการผ่านน้ำมะนาวไปบนแคลเซียมคาร์บอเนตจนเกิดเป็นตะกอนแคลเซียมซิเตรท จากนั้นจึงแยกกรดมะนาวออกมาโดยใช้กรดซัลฟิวริก ซึ่งวิธีการตกตะกอนแคลเซียมซิเตรทและแยกกรดมะนาวออกจากแคลเซียมซิเตรทดังกล่าวยังใช้ในการทำให้กรดมะนาวบริสุทธิ์จนถึงปัจจุบันนี้ (อ้างถึงใน Grewal and Kalra, 1995) ในระยะแรกของการผลิตกรดมะนาวเพื่อการค้านั้น ผลิตได้จากการตกตะกอนสารละลายกรดมะนาวในน้ำผลไม้ในรูปของเกลือแคลเซียมซิเตรท เรียกกรดมะนาวที่ผลิตได้นี้ว่า กรดมะนาวธรรมชาติ (natural citric acid) ซึ่งวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการผลิตต่ำมาก โดยต้องใช้ผลมะนาวปริมาณมากถึง 30 -40 ตัน จะได้กรดมะนาวเพียงแค่ 1 ตันเท่านั้น (อ้างถึงใน Rohr and Kubicek, 1980) เนื่องจากวิธีการผลิตกรดมะนาวโดยวิธีดังกล่าวข้างต้นไม่เพียงพอต่อความต้องการในอุตสาหกรรมอาหาร จึงมีผู้พยายามคิดค้นกระบวนการผลิตกรดมะนาวแบบต่าง ๆ ขึ้น เช่น การสังเคราะห์ทางเคมีจากกลีเซอรอลโดยการค้นพบของ Grimoux และ Adams (1880) แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสม เนื่องจากวัตถุดิบมีราคาแพง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีหลายขั้นตอนและใช้สารที่มีอันตรายทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน (อ้างถึงใน Mattey, 1992) ต่อมาในปี ค.ศ. 1893 Wehmer สามารถผลิตกรดมะนาวโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Mucor* และ *Penicillium* โดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (อ้างถึงใน Marison, 1988) ต่อมาในปี ค.ศ. 1917 Currie รายงานถึงวิธีการและภาวะในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* สำเร็จเป็นครั้งแรก ซึ่งวิธีดังกล่าวให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงและน้ำหมักที่ได้มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ ทำให้ลดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น (อ้างถึงใน Kubicek and Rohr, 1986) ซึ่งการค้นพบเหล่านี้กระตุ้นให้เกิดความสนใจในการศึกษาถึงการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ต่อมาในปีค.ศ. 1919 ได้มีการก่อตั้งโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกรดมะนาวขึ้นเป็นแห่งแรกที่ประเทศเบลเยี่ยมโดยใช้เชื้อรา

Aspergillus niger ในการผลิต หลังจากนั้นได้มีการก่อตั้งโรงงานอีกหลายแห่งทั้งในสหรัฐอเมริกาและยุโรปโดยกระบวนการหมักบนผิวหน้าอาหาร (surface culture) โดยใช้น้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบเรียกกรดมะนาวที่ได้นี้ว่ากรดมะนาวจากการหมัก (fermentation citric acid) ภายหลังสงครามโลกครั้งที่สองได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตเป็นการหมักในอาหารเหลว (submerged cuture) จากวัตถุดิบที่เป็นกลูโคสไซรัปหรือกากน้ำตาล (อ้างถึงใน Rohr and Kubicek, 1980; Mattey, 1992)

การผลิตกรดมะนาวนอกจากจะใช้เชื้อราแล้วยังพบว่า ยีสต์และแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus licheniformis* *Arthrobacter paraffinens* *Corynebacterium* spp. (อ้างถึงใน Grewal and Kalra, 1995) สามารถผลิตกรดมะนาวได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1932 Wieland และ Sanderhoff ได้รายงานการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์เป็นครั้งแรกซึ่งใช้อะซิเตทเป็นวัตถุดิบในการผลิต (อ้างถึงใน Cartledge, 1987) สำหรับแบคทีเรียนั้นให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำกว่ายีสต์และรา จึงไม่ได้รับความสนใจในการผลิตระดับอุตสาหกรรม (Marison, 1988) ปัจจุบันการผลิตกรดมะนาวเพื่อการค้าเป็นส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* และบางส่วนผลิตจากเชื้อ *Yarrowia lipolytica* (Mattey, 1992)

1.2 การผลิตกรดมะนาวโดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์

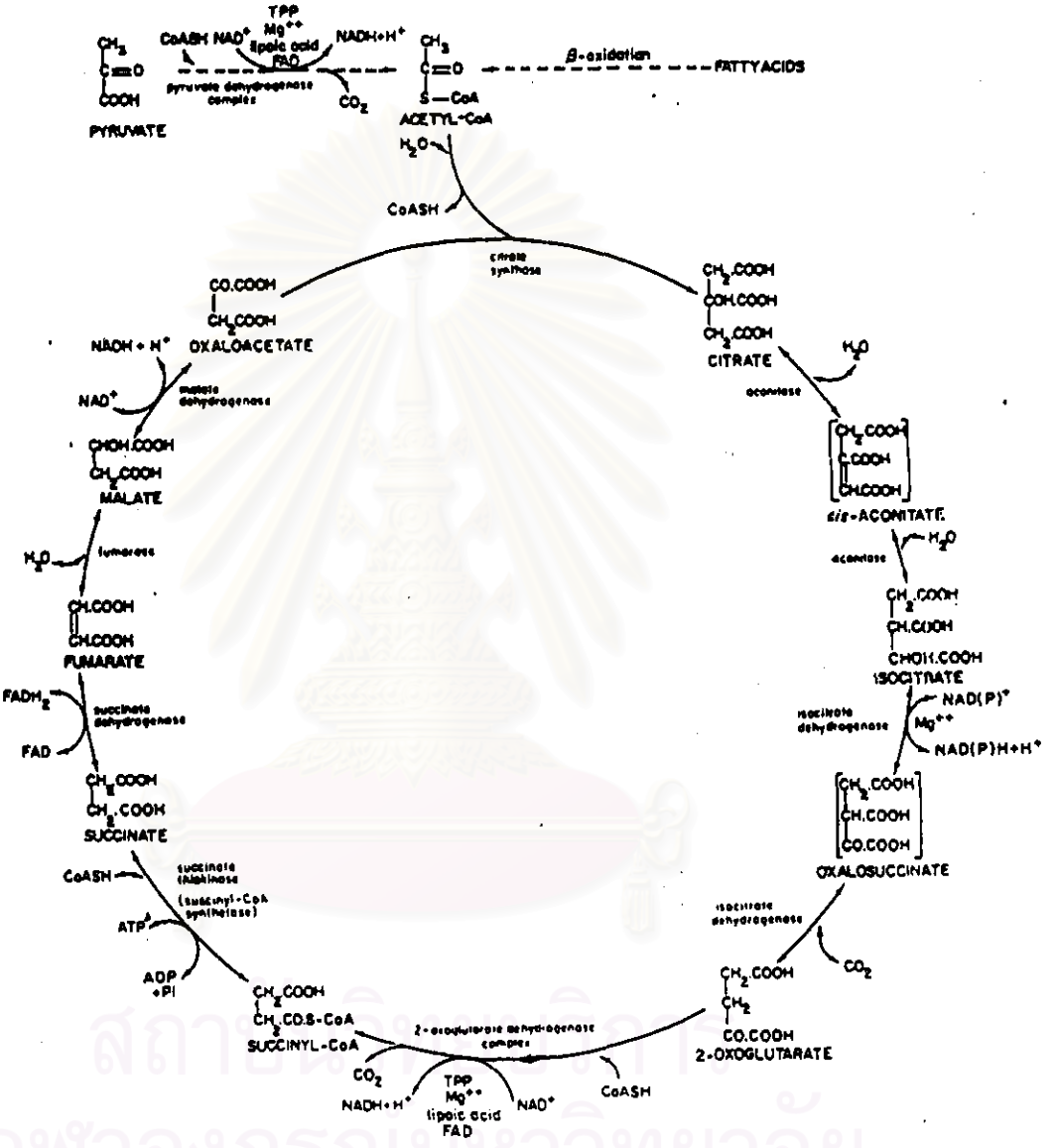
การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์เป็นกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการผลิตระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากให้ผลผลิตสูง สามารถปรับปรุงและควบคุมกระบวนการผลิตได้ง่าย ใช้เนื้อที่และแรงงานน้อยกว่าการหมักในสภาพอาหารแข็ง โดยใช้อุปกรณ์และเทคโนโลยีที่ทันสมัย มีการออกแบบถังหมักหลายรูปแบบ ได้แก่ ถังหมักแบบหอสูง (tower fermentor) ถังหมักแบบกวน (stirred tank fermentor) และถังหมักแบบแอร์ลิฟต์ (air-lift fermentor) (Mattey, 1992) ซึ่งวัสดุที่ใช้ในการทำถังหมักและอุปกรณ์ต่าง ๆ ต้องเป็นวัสดุที่ทนกรดได้ดี ในระหว่างการหมักจะต้องมีการควบคุมภาวะต่าง ๆให้เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ การกวน การให้อากาศ ค่าความเป็นกรด-ด่างต้องไม่ต่ำเกินไป สามารถควบคุมโดยการเติมสารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต (Milsom and Meers, 1985)

ยีสต์หลายสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้สูง เช่น *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)

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ส่วนใหญ่ใช้การหมักแบบแบตช์ เนื่องจากควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ในการหมักได้ง่าย มีรายงานการหมักแบบอื่น ๆ ได้แก่ การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) (Aiba and Matsuoka, 1979; Klasson Clausen and Gaddy, 1989) การผลิตกรดมะนาวด้วยวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์โดยใช้คาร์ราจีแนนและอัลจิเนตโดยการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบแอร์ลิฟต์ด้วยเชื้อ *Yarrowia lipolytica* (Rymowicz et al., 1994) ข้อดีของการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ ได้แก่ ยีสต์สามารถทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นสูงของน้ำตาลได้ มีความไวต่อโลหะและอิออนต่าง ๆน้อยกว่าเชื้อราจึงสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด มีศักยภาพในการผลิตสูงด้วยการหมักแบบต่อเนื่อง และให้อัตราการผลิตกรดมะนาวสูงกว่าเชื้อรา (Grewal and kaira, 1995)

1.3 ชีวเคมีการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

กรดมะนาวเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวัฏจักรเครปส์ (Krebs'cycle หรือ tricarboxylic acid cycle หรือ citric acid cycle) ดังแสดงในรูปที่ 1-1 ซึ่งเกิดในไมโตครอนเดรีย สำหรับกลไกการผลิตกรดมะนาวจากน้ำตาลกลูโคสนั้น น้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวทโดยวิถีไกลโคลิซิส และไพรูเวทที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นอะเซทิลโคเอนไซม์เอเพื่อเข้าสู่วิถีการผลิตกรดมะนาวโดยอะเซทิลโคเอนไซม์เอจะรวมตัวกับออกซาโลอะซิเดทโดยอาศัยเอนไซม์ซิเตรทซินเทสได้กรดมะนาวเกิดขึ้น ในระหว่างการสะสมกรดมะนาวออกซาโลอะซิเดทถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาการสร้างทดแทน (anaplerotic reaction) ซึ่งเกิดจากไพรูเวทรวมกับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอาศัยไพรูเวทคาร์บอกซิเลส (Milsom and Meers, 1985) การสะสมกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้น เนื่องจากมีความผิดปกติของวัฏจักรเครปส์โดยมีเอนไซม์สำคัญ ได้แก่ อะโคนิเทส และไอโซซิเดรทดีไฮโดรจีเนส ซึ่งในช่วงที่มีการผลิตกรดมะนาวเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะมีกิจกรรมต่ำลง ในขณะที่ซิเตรทซินเทสจะมีกิจกรรมสูงขึ้น



รูปที่ 1-1 วัฏจักรเครปส์หรือวัฏจักรกรดมะนาว

ที่มา Singleton and Sainbury ,1988

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์เป็นการหมักในสภาพอาหารเหลว ซึ่งมีปัจจัยหลัก 2 ประการ คือ สายพันธุ์ยีสต์ และภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

1.4.1 สายพันธุ์ของยีสต์

ยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง โดยเฉพาะในกลุ่มของ *Candida* sp. สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดี การคัดเลือกสายพันธุ์ของยีสต์ที่จะนำมาใช้ในการผลิตต้องคำนึงถึงสิ่งต่างๆเหล่านี้ ได้แก่ ต้องมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดมะนาว ซึ่งในขณะเดียวกันต้องผลิตกรดไอโซซิตริกได้ต่ำ ให้ผลผลิตกรดมะนาวในปริมาณคงที่สม่ำเสมอ ทนกรดได้ดี ใช้เวลาในการหมักสั้น และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด (Grewal and Kalra, 1995; Marison, 1988)

1.4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

1.4.2.1 แหล่งคาร์บอน

ยีสต์หลายชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ได้แก่ กลูโคส อัลเคน กากน้ำตาล (Rane and Sims, 1993) ไฮโดรคาร์บอน กรดไขมัน เอทานอล พาราฟฟินส์ (Ikeno et al., 1975) การเลือกใช้สารใดเป็นแหล่งคาร์บอนต้องคำนึงถึงความเหมาะสมในการผลิต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ และควรเป็นสารที่มีราคาถูก มีปริมาณมาก สามารถนำมาใช้ได้ตลอดเวลา

1.4.2.2 แหล่งไนโตรเจน

การผลิตกรดมะนาวจะเกิดขึ้นเฉพาะในภาวะที่ไนโตรเจนมีปริมาณจำกัดเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามไนโตรเจนเป็นสิ่งสำคัญต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ปริมาณและชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ยีสต์สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้ทั้งรูปสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ (Good et al, 1985; Kubicek and Rohr, 1986) สารอินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน ส่วนสารอนินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตท โซเดียมไนเตรท และยูเรีย (Abou-Zeid and Ashy, 1984; Ilzuka et al., 1971)

1.4.2.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นธาตุที่สำคัญต่อการหมักเมทาบอไลต์ทุติยภูมิ การควบคุมปริมาณฟอสเฟตที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตกรดมะนาว โดยฟอสเฟต

ความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง แต่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบของส่วนสำคัญต่าง ๆ ในเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ และฟอสโฟลิปิด อีกทั้งฟอสฟอรัสยังเป็นปัจจัยที่จำเป็นในกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ ดังนั้นการควบคุมปริมาณฟอสเฟตให้เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการผลิตและการสะสมกรดมะนาวอย่างมาก (Kubicek and Rohr, 1986) ฟอสเฟตที่นิยมใช้อยู่ในรูปโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

1.4.2.4 แร่ธาตุ

แร่ธาตุหลายชนิดมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ โดยพบว่าแร่ธาตุหลายชนิดได้แก่ แมงกานีส แมกนีเซียม ทองแดง สังกะสี เป็นต้น มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวอย่างมาก แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟตเป็นสารจำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาว (Iizuka et al., 1971) แมกนีเซียมเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์จำพวกไคเนส (Marison, 1988) Furukawa และคณะ (1977) พบว่าไอออนทองแดงเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเทส ส่วนไอออนเหล็กเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเทสซึ่งจะเปลี่ยนกรดมะนาวเป็นกรดไอโซซิตริก นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสังกะสีซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และทองแดงซัลเฟต มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของยีสต์ *Candida* sp. ดังนั้นการเลือกใช้สารใดเป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องคำนึงถึงชนิดและปริมาณของแร่ธาตุต่าง ๆ ซึ่งส่งผลต่อการผลิตกรดมะนาวด้วย

1.4.2.5 สารเสริมอื่น ๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้น จำเป็นต้องมีการเติมสารบางชนิด เช่น ไทอะมีนในรูปของไทอะมีนคลอไรด์ กรดนิโคตินิก และไบโอติน เป็นต้น (Kubicek and Rohr, 1986) หรืออาจใช้ในรูปของสารประกอบ เช่น สารสกัดจากยีสต์ และน้ำแช่ข้าวโพด (Iizuka et al., 1971)

1.4.2.6 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากยีสต์สามารถทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างในช่วงจำกัด ซึ่งจะอยู่ในช่วงประมาณ 4.5-6.5 แตกต่างจากเชื้อราที่สามารถทนต่อค่าเป็นกรด-ด่างต่ำ ๆ ได้ถึงประมาณ 2 (Mattey, 1992) ดังนั้นการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อราจึงไม่จำเป็นต้องเติมสารเพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็นกลาง แต่สำหรับยีสต์นั้นด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงจำเป็นต้องเติมสารที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น (Kubicek and Rohr, 1986) การจะเลือกใช้สารชนิดใดนั้นขึ้นกับความเหมาะสม มีรายงานว่าการใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์และสาร

ประกอบของโซเดียมทำให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำกว่าที่ควร เนื่องจากโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จะทำให้กรดมะนาวสลายตัวเกิดเป็นกรดออกซาลิกและกรดอะซิติก (Bouchard and Merritt, 1979)

1.4.2.7 อุณหภูมิ

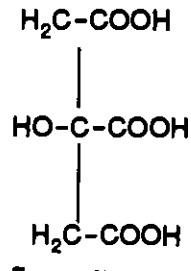
โดยทั่วไป อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์จะอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส อาจแตกต่างกันบ้างตามสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิต

1.4.2.8 การให้อากาศ

การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์เป็นการหมักแบบต้องการอากาศ ดังนั้นในระหว่างการหมัก โดยเฉพาะช่วงที่มีการเจริญของเชื้อ จำเป็นต้องให้อากาศอย่างเพียงพอ Rane และ Sims (1994) พบว่า เมื่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายเพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราการผลิตกรดมะนาวสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และการถ่ายเทของออกซิเจนในถังหมักขึ้นกับองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความดัน อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก Okoshi และคณะ (1987) พบว่า การสะสมของกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida tropicalis* เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของออกซิเจนจนเมื่อออกซิเจนบริสุทธิ์สูงกว่า 60 ppm ภายใต้ความดันสัมบูรณ์เท่ากับ 2.0 บรรยากาศจะทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง

1.5 คุณสมบัติของกรดมะนาว

กรดมะนาวหรือกรด 2-ไฮดรอกซี-1, 2, 3-โพรเพนคาร์บอกซิลิก สูตรทางเคมีคือ $C_6H_8O_7$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 192.13 ส่วนสูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1-2 กรดมะนาวมีค่า pK ที่ 25 องศาเซลเซียส ดังนี้ pKa_1 3.128 , pKa_2 4.761 และ pKa_3 6.396 (Bouchard and Merritt, 1979) ลักษณะทั่วไปเป็นผลึกสีขาว มีรสเปรี้ยว มีความเป็นพิษต่ำ ความสามารถในการละลายในน้ำได้สูงขึ้นกับอุณหภูมิ และย่อยสลายได้ง่าย กรดมะนาวส่วนใหญ่ผลิตในรูปของกรดมะนาวแอนไฮดรัส กรดมะนาวโมโนไฮเดรต เกลือและเอสเทอร์ของกรดมะนาว (Marison, 1988) คุณลักษณะของกรดมะนาวที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆและที่ผลิตออกจำหน่ายจะต้องได้มาตรฐานตามพระราชบัญญัติมาตรฐานอุตสาหกรรม ดังแสดงในตารางที่1-1



รูปที่ 1-2 โครงสร้างของกรดมะนาว

1.6 มาตรฐานของกรดมะนาว

ตารางที่ 1-1 คุณลักษณะทางเคมีตามมาตรฐานของกรดมะนาว

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด	
		กรดซิตริกโมโนไฮเดรต	กรดซิตริกอันไฮดรัส
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	สารละลายตัวอย่างต้องไม่ขุ่นกว่าสารละลายมาตรฐานสอบเทียบ	
9	แคลเซียม มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	200	200
10	เหล็ก มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
11	คลอไรด์ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
12	สารที่สลายให้คาร์บอนได้ง่าย (readily carbonizable substance)	สีของสารละลายตัวอย่างต้องไม่เข้มกว่าสีของสารละลายสีมาตรฐาน	

ที่มา พระราชบัญญัติมาตรฐานอุตสาหกรรม (กรดซิตริก) พ.ศ. 2535

1.7 ประโยชน์ของกรดมะนาว

ปัจจุบันความต้องการกรดมะนาวสูงขึ้นมากและมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ประมาณร้อยละ 2-3 ต่อปี (Goldberg, Peleg and Rokem, 1991) จากคุณสมบัติของกรดมะนาวซึ่งมีความสามารถในการละลายสูง มีความเป็นพิษต่ำ มีรสเปรี้ยว ช่วยส่งเสริมกลิ่นรสของอาหารให้ดีขึ้น และยังช่วยรักษาคุณภาพของอาหารได้ จึงมีการใช้กรดมะนาวในอุตสาหกรรมหลายประเภท ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ร้อยละ 70 ใช้ในอุตสาหกรรมเภสัชกรรม ร้อยละ 12 และอุตสาหกรรมอื่นๆ อีกประมาณร้อยละ 18 (Marison, 1988) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1.7.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ใช้กรดมะนาวช่วยส่งเสริมกลิ่นรสในการผลิตผลิตภัณฑ์ประเภท น้ำผลไม้ ลูกกวาด เจลลี่ เป็นต้น ป้องกันการบูดเสียในเครื่องดื่ม เป็นสารป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในน้ำมันและไขมัน และยังป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในอาหารแช่แข็ง (Goldberg, Peleg, and Rokem, 1991)

1.7.2 อุตสาหกรรมทางเภสัชกรรม

ใช้กรดมะนาวในยาลดกรดในกระเพาะอาหารโดยใช้ผสมกับไบคาร์บอเนต ซึ่งทำให้เกิดฟองฟู่ในน้ำดื่ม กรดมะนาวและโซเดียมซิเตรตใช้ในการเตรียมสารละลายเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดในการถ่ายเลือด และช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในการเตรียมวิตามิน เป็นต้น (Bouchard and Merritt, 1979)

1.7.3 อุตสาหกรรมอื่น ๆ

ได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก เริ่มสนใจใช้โซเดียมซิเตรตแทนฟอสเฟตในการผลิตผงซักฟอกเนื่องจากย่อยสลายได้ง่ายกว่าฟอสเฟต และเป็นสารที่ไม่ช่วยเสริมการเจริญเติบโตของวัชพืชในน้ำ อีกทั้งไม่เป็นพิษต่อปลา อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางจะใช้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในครีมนวดผม น้ำยาดัดผม น้ำยาทำความสะอาดใบหน้าและโลชั่น ในอุตสาหกรรมโลหะใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมในน้ำยาขัดโลหะน้ำยาล้างสนิม นอกจากนี้ยังใช้กรดมะนาวในระบบการกำจัดกาซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในเหมืองถลุงแร่โลหะและโรงงานที่มีการใช้ถ่านหินเป็นแหล่งพลังงาน โดยใช้สารละลายผสมของโซเดียมซิเตรต กรดมะนาว และโซเดียมไทโอซัลเฟต เป็นตัวดูดซับกาซที่เกิดขึ้น เป็นต้น (Bouchard and Merritt, 1979)

1.8 การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจอย่างหนึ่งของประเทศไทย และยังเป็นพืชที่ปลูกได้ดีในเกือบทุกพื้นที่ เกษตรกรจึงนิยมปลูกมันสำปะหลัง ดังนั้นประเทศไทยจึงเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังรายใหญ่ และได้มีการแปรรูปมันสำปะหลังเป็นแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังนั้นจะใช้หัวมันสำปะหลังประมาณ 4.4 ล้านตัน (CIAT, 1992) ซึ่งจะได้กากมันสำปะหลังถึง 8.8 แสนตัน โดยน้ำหนักเปียกต่อปี และในกากมันสำปะหลังมีแป้งเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 56 โดยน้ำหนักแห้ง (Grace, 1977) แต่มีโปรตีนอยู่ในปริมาณต่ำมากจึงมีการขายในราคาถูกเพื่อนำไปใช้ผสมในอาหารสัตว์ จากการที่กากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตทำให้มีการศึกษาและวิจัยที่จะนำกาก

มันสำปะหลังมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยการวิจัยส่วนใหญ่ใช้เทคโนโลยีทางการหมักโดยจุลินทรีย์

จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒน์ (2525) ศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Aspergillus niger* An_{12} จากวัสดุที่ประกอบด้วยกากมันสำปะหลัง ผสมรำข้าวเจ้า

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

สาวิตร ตระกูลน่าเลื่อมใส (2530) ผลิตอาหารปลาโดยเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas gelatinasa* ผสมกับเชื้อ *Rhodopseudomonas spheroides* p47 เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.9 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

ในปัจจุบันมีการนำกรดมะนาวไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆมากมาย และแนวโน้มของความต้องการมีสูงขึ้นเรื่อย ๆประเทศไทยต้องนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศในปริมาณสูง (ตารางที่ 1-2) ซึ่งทำให้ประเทศไทยเสียดุลการค้าต่างประเทศทั้ง ๆที่ประเทศไทยมีแหล่งวัตถุดิบราคาถูกที่สามารถใช้ในการผลิตกรดมะนาวมากมาย วัตถุดิบที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ กากน้ำตาล แป้งมันสำปะหลัง นอกจากนี้กากมันสำปะหลังซึ่งมีแป้งเป็นองค์ประกอบอยู่ถึงร้อยละ 56 โดยน้ำหนักแห้งจึงมีความเป็นไปได้สูงในการที่จะแปรรูปกากมันสำปะหลังไปเป็นสารละลายน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวซึ่งอาจจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตและยังเป็นการใช้เศษวัสดุทางการเกษตรให้ได้ประโยชน์คุ้มค่า

ปัจจุบันยังไม่มีการนำสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์และเนื่องจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมีสารเจือปนอันเกิดจากสารเจือปนที่มีอยู่ในกากมันเองและเกิดจากกระบวนการแปรรูป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของสารเจือปนต่าง ๆ ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่คาดว่าจะมีผลต่อการผลิตกรดมะนาว

1.10 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิตกรดมะนาวจากเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

2. ศึกษาอิทธิพลของสารเจือปนในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

3. ศึกษาการเจริญและการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าเมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

4. ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังโดยวิธีที่เหมาะสมที่สุดเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 1-2 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวของประเทศไทยระหว่างปี 2531-2539

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

ที่มา กรมศุลกากร