หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

1.1 บทนำ

กรดมะนาว (citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้กันมาก จากสถิติในปี ค.ศ. 1992 พบว่าทั่วโลกมีความต้องการกรดมะนาวประมาณปีละ 400,000 ตัน (Mattey, 1992) กรดมะนาวที่ใช้อยู่ในรูปกรดมะนาว monohydrate และ anhydrous ประมาณร้อยละ 60-75 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มเนื่องจากกรดมะนาวมีรสเปรี้ยวช่วยส่งเสริมรสอาหารให้ดีขึ้นและยังช่วยรักษาคุณภาพของอาหาร ประมาณร้อยละ 10 ของกรดมะนาวใช้ในอุตสาหกรรมยา โดยใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดความคงตัว (stabilizer) และใช้เป็นสารรักษาเลือดไม่ให้แข็งตัว (blood preservative) ส่วนที่เหลืออีกประมาณร้อยละ 15-30 ใช้เป็นสารกำจัดฟอง (antifoaming agent) และ softener ในอุตสาหกรรมเคมีและอุตสาหกรรมเส้นใย นอกจากนี้ยังใช้ sodium citrate ทดแทน polyphosphate ในการผลิตผงซักฟอก (Crueger,1987)

ในประเทศไทยได้มีการใช้กรดมะนาวอย่างกว้างขวาง ทั้งในอุตสาหกรรมอาหารเครื่องดื่มและในอุตสาหกรรมยา ซึ่งส่วนใหญ่สั่งเข้ามาจากต่างประเทศในรูป citric acid monohydrate, anhydrous และ calcium citrate จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2522 เริ่มมีการผลิตกรดมะนาวภายในประเทศโดยวิธีการหมักบนอาหารแข็ง (solid substrate fermentation) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบและหมักด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และไม่สลับซับซ้อนแต่ผลผลิตต่ำและปริมาณผลผลิตที่ได้ไม่คงที่แปรเปลี่ยนไปตามสภาวะแวดล้อม ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ในขณะที่การหมักในอาหารเหลวให้ผลผลิตสูง สามารถควบคุมสภาวะที่เหมาะสมในการหมักให้คงที่ได้ซึ่งเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิต จึงมีความเหมาะสมมากกว่าการหมักบนอาหารแข็งเพื่อการผลิตกรดมะนาวในอนาคต (ฉัตร ชำชอง, 2528 อ้างใน นิมล กิจขันธ์, 2532)

กระบวนการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมนั้น ขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์มีความสำคัญมาก เพราะประสิทธิภาพการแยกที่ดีจะทำให้ได้กรดมะนาวมาก ช่วยลดต้นทุนการผลิตและยิ่งทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นเท่าใด ก็สามารถนำไปใช้ได้กว้างขวางมากขึ้น โดยเฉพาะในทางการแพทย์ กรดมะนาวที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต้องควบคุมความบริสุทธิ์ปริมาณสารปนเปื้อน (impurity) เช่น เกลือออกซาเลต เกลือซัลเฟต และโลหะหนักจำพวก เหล็ก สารหนู เป็นต้น จะต้องไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนดเอาไว้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกรดมะนาว (มาตรฐานอุตสาหกรรมกรดซิตริก [มอก.], 2526) เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยการตรวจเชิงคุณภาพกรดมะนาวให้อยู่ในมาตรฐานของกระทรวงอุตสาหกรรม ก่อนจำหน่ายในท้องตลาด

1.2 ประวัติความเป็นมา

กรดมะนาวเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งในวัฏจักรเครบ (Kreb cycle) ในธรรมชาติพบในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะนาวและพืชตระกูลส้ม Scheele (Prescott and Dunn, 1959) สามารถแยกกรดมะนาวออกจากน้ำมะนาวได้สำเร็จเป็นครั้งแรกในปีค.ศ.1784 โดยการผ่านน้ำมะนาวร้อนๆไปบนแคลเซี่ยมคาร์บอเนตเพื่อทำให้เกิดตะกอนแคลเซี่ยมซิเตรท จากนั้นจึงแยกกรดมะนาวออกโดยใช้กรดซัลฟูริก วิธีการแยกกรดมะนาวโดยการตกตะกอนแคลเซี่ยมซิเตรท ยังใช้กันอยู่จนถึงปัจจุบัน

ในปีค.ศ.1839 Wehmer เป็นผู้ค้นพบว่ากรดมะนาวสามารถผลิตได้โดยเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Mucor sp.* และ *Penicillium sp.* โดยมีน้ำตาลทรายเป็นวัตถุดิบ ซึ่ง Currie และคณะ (Milson and Meer, 1985) ได้อธิบายถึงวิธีการผลิตกรดมะนาวโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ได้สำเร็จเป็นครั้งแรกในปีค.ศ. 1917 ต่อมา Doelger และ Prescott ปีค.ศ. 1934 (Kubicek and Rohr, 1982) พบว่าการผลิตกรดมะนาวจากน้ำตาลทรายโดยเชื้อรา *A. niger* เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งการค้นพบดังกล่าวทำให้เกิดความสนใจศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยการหมักด้วยเชื้อรา *A. niger* ทำให้นักวิทยาศาสตร์หันมาสนใจพัฒนาการผลิตกรดมะนาว โดยกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน

1.2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมะนาว

มีจุลินทรีย์หลายชนิดเช่นเชื้อรา และ ยีสต์บางชนิดสามารถผลิตกรดมะนาวได้ เช่น เชื้อรา *A. niger* , *A. wentii* , *A. clavatus* , *A. luchensis*, *Penicillium luteum* , *P. citrinum*, *P. janthiellum* , *P. resticum* , *Mucor piriformis* , แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และยีสต์ *Candida lipolytica* , *C. oleophila* , *C. guilliormondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* และ *C. subtropicalis* (Kubicek, 1982) เป็นต้น เท่าที่มีรายงานมา *A. niger* และ *A. wentii* สามารถผลิตกรดมะนาวได้ในปริมาณสูง เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่ม *Penicillium sp.*

1.2.2 การหมักกรดมะนาว

สามารถผลิตกรดมะนาวได้ทั้งวิธีการหมักบนผิวหน้าอาหาร (surface fermentation) และการหมักในอาหารเหลว (submerged fermentation)

1.2.2.1 การหมักแบบบนผิวหน้าอาหารแบ่งเป็น 2 วิธี คือ

1.2.2.1.1 การหมักบนอาหารแข็ง

วัตถุดิบที่เป็นแหล่งอาหารแข็ง ได้แก่ รำข้าวสาลี (wheat bran) กากมันฝรั่ง รำข้าว หรือเยื่อจากการผลิตแป้งมันเทศ สายพันธุ์รา *A. niger* ที่ใช้ต้องไม่ไว (sensitive)ต่อโลหะ

หนัก เนื่องจากวัตถุดิบที่นำมาใช้ไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดสารปนเปื้อนออกก่อน วิธีการหมักต้องปรับพีเอชของวัตถุดิบประมาณ 4-5 จึงใส่สปอร์ *A. niger* ผสมกับวัตถุดิบให้เข้ากัน นำมาแผ่บนถาด ให้มีความหนาประมาณ 3-5 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 °ซ. เป็นเวลา 5-8 วัน ทำการสกัดกรดมะนาวด้วยน้ำร้อนและแยกกรดมะนาว ให้บริสุทธิ์ (Kubicek, 1986)

1.2.2.1.2 การหมักบนอาหารเหลว

เป็นกระบวนการหมักที่ใช้กันมานาน ข้อดีคือ ต้นทุนการลงทุนต่ำ ใช้เทคโนโลยีง่ายๆ แต่มีข้อเสียคือใช้แรงงานมาก การควบคุมสภาวะการผลิตให้คงที่ทำได้ยาก วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักมักใช้กากน้ำตาล (molasses) ที่ปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมประมาณ 150 กิโลกรัมต่อตัน ปรับพีเอชเริ่มต้นก่อนทำการหมักให้อยู่ในช่วง 5-7 จึงใส่ลงในถาด ซึ่งถูกเรียงไว้บนชั้นในห้องบ่มที่ปราศจากเชื้อ ถาดหรือภาชนะจะต้องเป็นวัสดุที่ทนทานต่อการกัดกร่อนของกรด การหมักเริ่มจากการถ่ายสปอร์ของเชื้อ *A. niger* ให้กระจายบนผิวหน้าอย่างทั่วถึง บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 40-60 เป็นเวลาประมาณ 8-12 วัน จนกระทั่งสายใยของเชื้อราเจริญปกคลุมผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าพีเอชลดลงเหลือ 1.5-2.0 จึงแยกเส้นใยราออกโดยการกรองน้ำหมักไปสกัดกรดมะนาว ผลผลิตจากการผลิตแบบนี้ได้กรดมะนาวประมาณ 75 กรัมต่อกลูโคส 100 กรัม (Kubicek, 1986 ; Shu, 1948)

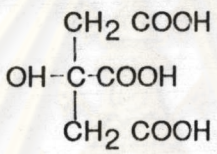
1.2.2.2 การหมักกรดมะนาวในอาหารเหลว

การหมักกรดมะนาวในอาหารเหลว ได้มีการศึกษาและพัฒนามาในเวลาเดียวกับการหมักบนผิวอาหารเหลว แต่ยังไม่นำมาใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1950 จึงเริ่มมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจนถึงปัจจุบัน ปริมาณกรดมะนาวทั่วโลกมากกว่าร้อยละ 80 ได้มาจากวิธีหมักในอาหารเหลว ข้อดีของการหมักแบบนี้คือ ใช้แรงงานต่ำ ผลผลิตกรดมะนาวสูง สามารถควบคุมการหมักให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมได้เป็นอย่างดี แต่ต้องใช้ค่าใช้จ่ายด้านพลังงานสูง และใช้บุคคลากรที่มีความสามารถในการควบคุม หลักสำคัญในการหมักคือ จุลินทรีย์จะเจริญและผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลว นิยมเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมัก (fermentor) หรือในปฏิกรชีวภาพ (bioreactor) ที่สร้างด้วยวัสดุพิเศษที่ทนการกัดกร่อนของกรดที่ผิวด้านในของถังหมัก หากมีอิออนของโลหะหนักหลุดออกมาปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็จะทำให้สูญเสียสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาว (Kubicek,1986) อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 14-20 (Prescott and Dunn, 1959) กากน้ำตาล แป้งมันฝรั่ง น้ำตาลได้จากการย่อย (hydrolyse starch) เป็นต้น โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะผ่านการฆ่าเชื้อก่อนเติมหัวเชื้อ *A. niger* หรือ ยีสต์ ใช้อุณหภูมิในการหมัก 30 °ซ. มีการให้อากาศ 0.5-1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที (vvm) เป็นเวลา 6-15 วัน ขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ วัตถุดิบที่ใช้ ความเข้มข้นของน้ำตาล และ

ประสิทธิภาพของระบบที่ใช้หมักก่อนที่จะผ่านกระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ (Shu and Johnson,1948)

1.3 สมบัติทางเคมีของกรดมะนาว

กรดมะนาวมีชื่อทางเคมีว่า กรด 2 ไฮดรอกซี -1, 2, 3- โพรเพนไตรคาร์บอกซิลิก (2 hydroxy -1, 2, 3- propane tricarboxylic acid มีสูตรโมเลกุลคือ $C_3H_4OH(COOH)_3$ และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่1 น้ำหนักโมเลกุล 192.12 ประกอบด้วย C 37.51% , H 4.20% และ O 58.29 % ผลึกกรดมะนาวมีสีขาว จุดหลอมเหลวของกรดมะนาว anhydrous เท่ากับ 153 °ซ. (Matha,1983 ; Robert, 1988-1989) ลักษณะผลึกเป็น monoclinic helohedral ค่าความหนาแน่น 1.665 ที่อุณหภูมิ 25 ° ซ.



รูปที่ 1 โครงสร้างของกรดมะนาว

ค่าการแตกตัวของกรดมะนาวเมื่อเป็นสารละลาย ค่า pK1 = 3.128, pK2 = 4.761 และ pK3 = 6.396

ผลึกกรดมะนาว monohydrate ลักษณะผลึกเป็น orthorombic ตกผลึกจากสารละลายกรดมะนาวอิ่มตัวที่อุณหภูมิต่ำ ความหนาแน่นเท่ากับ 1.542 ผลึกกรดมะนาวสูญเสียน้ำในผลึกเมื่ออบที่อุณหภูมิ 40-50° ซ. ผลึกอ่อนตัวที่อุณหภูมิ 75 °ซ. มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 135-152 °ซ. ค่า LD_{50} ของกรดมะนาวในหนู 975 มิลลิกรัม / กิโลกรัม และสมบัติอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

1.4 การแยกและการตกผลึกกรดมะนาว

ขั้นตอนการแยกกรดมะนาวเริ่มจากกระบวนการแยกจุลินทรีย์ออกจากน้ำหมักใช้วิธีกรองแยกหรือเหวี่ยงแยกเส้นใยราในกรณีที่ใช้ราหมัก และการเหวี่ยงแยกเซลล์เมื่อใช้ยีสต์หมัก (Lizuka et al., 1971) สารปนเปื้อนในน้ำหมักขึ้นกับวัตถุดิบเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักกรดมะนาว ได้แก่ คาร์โบไฮเดรท โปรตีน เกลือ กรดอะมิโน โลหะหนัก และกรดอินทรีย์อื่นๆ เป็นต้น วิธีการแยกกรดมะนาวโดยทั่วๆไปมี 3 วิธี ดังต่อไปนี้ (Mattey,1992)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 สมบัติของกรดมะนาว (Isarael and Richard, 1991)

สมบัติกรดมะนาว	กรดมะนาวแอนไฮดรัส	กรดมะนาวโมโนไฮเดรท
สูตรโมเลกุล (formula)	$C_6H_8O_7$	$C_6H_8O_7 . H_2O$
น้ำหนักโมเลกุล ดาลตัน (molecular mass)	192.2	210.15
ความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity)	1.665	1.542
จุดหลอมเหลว (°ซ.) (melting point)	153	135-152
สารละลาย 1 นอร์มัล	พีเอช 2	พีเอช 1.95
ความสามารถในการละลาย ที่อุณหภูมิ 25° ซ. (ก/ 100 มล.)		
น้ำ	162	209
เอทธานอล	59	90
อีเทอร์	0.75	1.6

1.4.1 การสกัดแยกกรดมะนาว (Solvent Extraction)

การแยกกรดมะนาวด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือไม่มีของเหลือทิ้งจากกระบวนการแยก เช่น แคลเซียมซัลเฟต (ยิบซั่ม) ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนการแยกกรดมะนาวโดยการตกตะกอน แต่ก็มีข้อเสีย คือ สารเคมีที่ใช้สกัดมีราคาแพงและน้ำหมักที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบไม่เหมาะสม เพราะการแยกด้วยวิธีนี้จะมีสารปนเปื้อนอื่นๆจากน้ำหมักมาก ขั้นตอนการสกัดกรดมะนาวด้วยตัวทำละลายสามารถจำแนกได้ดังต่อไปนี้ (Lockwood, 1979 ; Benial et al., 1981) คือ

1.4.1.1 การสกัดกรดมะนาวด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ต้องมีคุณสมบัติละลายน้ำได้น้อยหรือไม่ละลายเลย ได้แก่ สารจำพวกอะลิฟาติกอัลกอฮอล์ (aliphatic alcohol) คีโตน (ketone) และอีเทอร์ (ether) เป็นต้น ขีดจำกัดของตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้คือใช้ได้ดีกับน้ำหมักกรดมะนาวเข้มข้นสูงเท่านั้น

1.4.1.2 การสกัดกรดมะนาวด้วยตัวทำละลายเอมีน

ตัวทำละลายเอมีน (amine) มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ สามารถสกัดกรดมะนาวจากน้ำหมักความเข้มข้นต่ำได้ เมื่อแยกกรดมะนาวออกจากตัวสกัดแล้วส่วนเอมีนต้องนำไปกลั่นลำดับส่วน เพื่อแยกให้บริสุทธิ์ก่อนนำกลับไปใช้สกัดอีก

1.4.1.3 การสกัดกรดมะนาวด้วยเกลือเอมีน

การสกัดด้วยเกลือเอมีน (amine salt) เพื่อแยกกรดอินทรีย์ในน้ำหรือน้ำหมักด้วยเกลือเอมีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆแตกต่างจาก 1.4.1.2 ซึ่งเป็นเอมีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เกลือเอมีนอาจจะประกอบด้วยเอมีน 1 หมู่ 2 หมู่ หรือ 3 หมู่ เกาะรวมอยู่กับหมู่คาร์บอนอะตอมจำนวน 20 คาร์บอนอะตอมขึ้นไป หรือเป็นส่วนผสมของหมู่เอมีน 2 หมู่หรือมากกว่า 2 หมู่ เป็นเกลือเอมีนสายยาว

ปฏิกิริยาการสกัดกรดมะนาวด้วยตัวทำละลายเกลือเอมีนขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ ความเข้มข้นของกรดมะนาวในน้ำหรือในน้ำหมัก เกลือเอมีนมีความจำเพาะสูง สามารถสกัดกรดมะนาวที่ความเข้มข้นต่ำๆได้ โดยสามารถสกัดกรดมะนาวได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-20 (น้ำหนักกรดมะนาวต่อปริมาตร) อุณหภูมิก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการสกัดกรดมะนาว โดยอุณหภูมิที่ใช้สกัดต้องไม่ต่ำกว่า 20 ^{o}ซ

หลังจากสกัดแยกกรดมะนาวจากน้ำหรือน้ำหมักให้อยู่ในตัวสกัดเอมีนแล้ว ต้องสกัดแยกกรดมะนาวออกจากตัวทำละลายเอมีนอีกครั้ง (back-extraction)ด้วยน้ำ อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนสกัดกลับ ต้องใช้อุณหภูมิสูงคือไม่ต่ำกว่า 80 ^{o}ซ. เพื่อแยกกรดมะนาวให้อยู่ในน้ำ สารละลายกรดมะนาวจะถูกทำให้เข้มข้น และตกผลึกกรดมะนาวในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

การสกัดกรดมะนาวจากน้ำหมักโดยวิธีนี้ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการแยกกรดมะนาวสูงสามารถสกัดซ้ำได้หลายครั้ง เกลือของเอมีนที่นิยมใช้เป็นตัวสกัด ได้แก่

1. Trilaurylamine กับ Oleic acid ใน hydrocarbon solvent
2. Trilaurylamine กับ Diethylhexyl phospholic acid ใน hydrocarbon solvent
3. Trilaurylamine กับ 2- bromohexanoic acid ใน hydrocarbon solvent
4. Trilaurylamine กับ Aliphatic substituted cyclopentyl carboxylic acid ใน hydrocarbon solvent
5. Trilaurylamine กับ xylene

ประสิทธิภาพการสกัดกรดมะนาวจากน้ำหรือน้ำหมักขึ้นกับคุณสมบัติเฉพาะของสารเคมีที่ใช้เป็นตัวสกัด สภาวะที่ใช้สกัด และจำนวนขั้นตอนที่ใช้ในการสกัดเพื่อให้สูญเสียกรดมะนาวน้อยที่สุด ในปัจจุบันวิธีการสกัดกรดมะนาวด้วยเกลือเอมีนมีความเหมาะสมมากกว่าการสกัดจากวิธีในข้อ 1.4.1.1 และ 1.4.1.2 (Beniel et al., 1982)

1.4.2 การใช้เรซินแยกกรดมะนาวจากน้ำหมัก

กระบวนการแยกกรดมะนาวใช้หลักการจับกรดมะนาวจากน้ำหมักด้วยเรซิน ซึ่งเป็นสารโพลิเมอร์ (polymer) ต่อกันเป็นสายยาว (copolymers) เชื่อมกันด้วยพันธะ styrene-poly(vinyl)benzene (Meitzner et al., 1980a, 1980b, 1983) ซึ่งมีสมบัติไม่แตกตัวในสารละลาย(nonionogenic) ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และไม่ละลายน้ำ (water insoluble) ตัวอย่างเรซิน ที่ใช้จับ (adsorbent) ได้แก่ Amberite จากบริษัท Rohm และ Hoas เช่น Amberite adsorbents XAD-1, XAD-2 , XAD-4 XAD-7 และ XAD-8 เป็นต้น Amberite เหล่านี้มีสมบัติทางฟิสิกส์แตกต่างกันคือ เปอร์เซนต์ปริมาตรของช่องว่าง (porosity volume percent) ความหนาแน่นของโครงสร้าง (skeletal density) ขนาดของเม็ดเรซิน (mesh sizes) และ พื้นที่ผิวโดยเฉลี่ย พื้นที่ผิวของเรซินอยู่ในช่วง 10-2,000 ตารางเมตรต่อกรัม แต่ที่นิยมใช้คือ 100-1,000 ตารางเมตรต่อกรัม ตัวอย่างสมบัติเรซิน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สมบัติของเรซิน Amberite Absorbance (Kulprathipanja and Hoffman,1988)

chemical nature	สมบัติของ Amberlite Polymeric Adsorbents				
	XAD-1 polystyrene	XAD-2 polystyrene	XAD-4 polystyrene	XAD-7 acrylic ester	XAD-8 acrylic ester
Porosity volume %	37	42	51	55	52
True Wet Density (g/cc)	1.02	1.02	1.02	1.05	1.09
Surface Area (m^2/g)	100	100	100	100	100
Average Pore Diameter (Ang.)	200	90	50	90	225
Skeletal Density (g/cc)	1.07	1.07	1.08	1.24	1.23
Nominal Mesh Size	20-50	20-50	20-50	20-50	25-50
Dipole Moment of Functional Groups	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรดมะนาวเมื่ออยู่ในรูปสารละลายทั้งในสภาพเสถียรไม่แตกตัว (nonionized) หรือแตกตัวให้ citrate anion (H_2CA^{-1}, HCA^{-2} และ CA^{-3}) และ hydrogen ion (H^+) ขึ้นกับค่าพีเอชของกรดมะนาว ซึ่งมีค่าคงที่ของการแตกตัวในสารละลายคือ pKa_1, pKa_2 และ pKa_3 ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เท่ากับ 3.13, 4.74 และ 5.40 ตามลำดับ (Kulprathipanja and Hoffman, 1988)

$$H_3CA \xrightarrow{pKa_1 = 3.13} H_2CA^{-1} + H^+ \xrightarrow{pKa_2 = 4.74} HCA^{-2} + 2H^+ \xrightarrow{pKa_3 = 5.40} CA^{-3} + 3H^+ \quad \text{---- สมการที่ 1}$$

สมการที่ 1 แสดงการแตกตัวของกรดมะนาวในสารละลาย

จากสมการสมดุลย์ของการแตกตัวกรดมะนาวในสารละลายเปลี่ยนตามความเข้มข้นของกรดมะนาว เมื่อพีเอชของสารละลายกรดมะนาวมีค่าต่ำ กรดมะนาวจะอยู่ในรูปไม่แตกตัว คือ H_3CA เป็นส่วนใหญ่ ทำให้กรดมะนาวที่อยู่ในรูป reducing คือ citrate anion ลดลงด้วย

การผ่านน้ำหมักกรดมะนาว (feed mixture) ผ่านเรซินในคอลัมน์เพื่อแยกกรดมะนาว (extract component) ออกจากสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ (raffinate component) โดยใช้เรซินที่เป็นเบสอ่อน (anionic exchange resin) เมื่อผ่านน้ำหมักในคอลัมน์ เรซินจะจับกรดมะนาวไว้ โดยสารปนเปื้อนในน้ำหมักจะไหลผ่านคอลัมน์ออกไป หลังจากนั้นจึงชะกรดมะนาวออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำหรือกรดซัลฟูริกเจือจาง ความเข้มข้นกรด ซัลฟูริกที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.01 - 0.1 นอร์มัล กรดอื่นๆ ที่ใช้ไล่แทนที่กรดมะนาว (desorbent material) ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก กรดฟอสฟอริก และกรดไนตริก แต่ประสิทธิภาพการสกัดกรดมะนาวต่ำกว่ากรดซัลฟูริก จากรายงานการแยกกรดมะนาวให้บริสุทธิ์โดยวิธีจับด้วยเรซิน ต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของเรซิน เรซินที่เหมาะสมควรมีความจำเพาะจับกรดมะนาวได้แม่นยำ และจับได้ดีกว่าสารปนเปื้อนในน้ำหมัก โดยพิจารณาได้จากค่าคงที่จำเพาะในการจับกรดมะนาว นอกจากความจำเพาะของเรซินในการจับกรดมะนาวควรมีความจำเพาะสูง และมีความจุในการจับกรดมะนาวสูงต่อปริมาตรแล้ว อัตราการไหลผ่านเรซินในคอลัมน์ต้องทำได้รวดเร็ว เพื่อที่จะสามารถนำเรซินกลับไปใช้ได้อีก ช่วยลดปริมาณเรซินและประหยัดต้นทุน ในกระบวนการแยกกรดมะนาว

นอกจากนี้มีผู้รายงานการใช้เรซินแยกกรดมะนาว โดยควบคุมอุณหภูมิและความดันให้คงที่ตามต้องการ (Warren et al., 1969) โดยมีอุปกรณ์และเตรียมเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ประสิทธิภาพการแยกต่อกับคอลัมน์ เช่น refractometer polarimers และ chromatographs เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการแยกกรดมะนาวอย่างต่อเนื่อง ในรายงานของ Derosset

(Canata et al., 1976) ได้พัฒนาการใช้วาวล์ควบคุมการไหลของตัวชะไล่กรดมะนาวในน้ำหมักในสภาวะที่เหมาะสม ทำให้ประสิทธิภาพการแยกได้ดีขึ้น

1.4.3 การแยกกรดมะนาวจากน้ำหมักโดยการตกตะกอน

วิธีการแยกสารละลายกรดมะนาวในน้ำหมักออกจากสารปนเปื้อนอื่นๆ สามารถตกตะกอนแยกได้เป็นสารประกอบของเกลืออัลคาไลน์เอิร์ทจากน้ำหมักที่มีสารปนเปื้อนมาก ได้แก่ น้ำหมักจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เป็นกากน้ำตาล เป็นต้น ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการตกผลึกกรดมะนาวจากน้ำหมักโดยตรงได้เลย ต้องมีขั้นตอนการแยกและตกผลึกกรดมะนาวให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอน (Mattey, 1992) สามารถอธิบายได้ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 การแยกเซลล์ลินทรีย์ออกจากน้ำหมัก

ขั้นตอนนี้ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ใช้หมักกรดมะนาว น้ำหมักที่ได้จากการหมักเชื้อรา การแยกสายใยราสามารถกรองออกจากน้ำหมักหรือเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) แต่ถ้าเป็นน้ำหมักที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์และแบคทีเรีย ต้องใช้วิธีเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก

ขั้นตอนที่ 2 การตกตะกอนแยกกรดมะนาวจากน้ำหมัก

สารที่ใช้ตกตะกอน ได้แก่ แคลเซียมออกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และแคลเซียมคาร์บอเนต หลังจากตกตะกอนกรดมะนาวด้วยสารละลายด่างในสภาวะที่เหมาะสมแล้ว กรองแยกกรดมะนาวในรูปของเกลืออัลคาไลน์เอิร์ทจากน้ำหมัก ขณะกรองต้องล้างสารปนเปื้อนที่จับตะกอนออกด้วยน้ำจนกระทั่งตะกอนสะอาด ปฏิกิริยาการเกิดตะกอนเกลืออัลคาไลน์เอิร์ทสามารถอธิบายได้ดังสมการที่ 2

$$2H_3(C_6H_5O_7) + 3\,CaO \longrightarrow Ca_3(C_6H_5O_7)_2 + 3H_2O$$

กรดมะนาวในน้ำหมัก ด่างแคลเซียมออกไซด์ ตะกอนไตรแคลเซียมซิเตรท

--- สมการที่ 2

สมการที่ 2 แสดงปฏิกิริยาการตกตะกอนกรดมะนาวด้วยแคลเซียมออกไซด์

ขั้นตอนที่ 3 การละลายตะกอนกรดมะนาว

หลังจากล้างตะกอนเกลือของกรดมะนาวด้วยน้ำ สารปนเปื้อนอื่นๆในน้ำหมัก เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโนและกรดอินทรีย์ในน้ำหมัก ส่วนใหญ่จะถูกแยกออกไป สารเคมีอนินทรีย์ที่ใช้ละลายตะกอนเพื่อให้ได้สารละลายกรดมะนาว ได้แก่ กรดซัลฟูริก

กรดไฮโดรคลอริก กรดฟอสฟอริก กรดฟลูโอซิลิสิก และกรดไนตริก เป็นต้น ตัวอย่างปฏิกิริยาการละลายตะกอนเกลืออัลคาร์ไลน์เอิร์ทด้วยกรดซัลฟูริก แสดงไว้ในสมการที่ 3

$$Ca_3(C_6H_5O_7) + 3H_2SO_4 \longrightarrow 2H_3(C_6H_5O_7) + 3CaSO_4$$ --- สมการที่ 3

ไตรแคลเซียมซิเตรท กรดซัลฟูริก กรดมะนาว เกลือแคลเซียมซัลเฟต

สมการที่ 3 แสดงปฏิกิริยาการละลายตะกอนเกลือไตรแคลเซียมซิเตรทด้วยกรดซัลฟูริก

จากสมการที่ 3 เมื่อละลายตะกอนกรดมะนาวดังกล่าวด้วยกรดซัลฟูริก อิออนของแคลเซียมจะรวมตัวกับอิออนซัลเฟตเป็นเกลือแคลเซียมซัลเฟต ซึ่งมีสมบัติละลายน้ำได้น้อย จึงสามารถแยกออกจากสารละลายกรดมะนาวได้โดยการกรอง สภาวะที่เหมาะสมในการละลายตะกอนไตรแคลเซียมซิเตรทด้วยกรดซัลฟูริกขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการละลาย ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก และเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาการละลายตะกอนเพื่อให้ได้สารละลายกรดมะนาวที่สมบูรณ์ การเพิ่มอุณหภูมิทำให้ปฏิกิริยาการละลายตะกอนเร็วขึ้น แต่ถ้าหากอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้กรดมะนาวบางส่วนไม่เสถียรและเสียสภาพได้ (Edwin, 1960)

ขั้นตอนที่ 4 การฟอกสีสารละลายตะกอนกรดมะนาว

การฟอกสีเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญ เพื่อทำให้กรดมะนาวมีความบริสุทธิ์มากขึ้นสมบัติบางอย่าง เช่น สี กลิ่นและรสดีขึ้น กรดมะนาวมีความเสถียรมากขึ้น

เดิมการฟอกสีใช้ถ่านกระดูก (bone char) ต่อมาได้พัฒนามาใช้ถ่านกัมมันต์ (activated carbon) ชนิดเม็ด (granular activated carbon) และชนิดผง (powder activated carbon) การฟอกสีเกิดจากแรงกระทำช่วยกันระหว่างอะตอมหรือโมเลกุลของสารปนเปื้อนที่ต้องการฟอกสี ยึดจับกับผิวถ่านด้วยพันธะแข็งแรงจนถึงพันธะอ่อนของ Van De Waals โดยประสิทธิภาพของการฟอกสีขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ที่มีอิทธิพลเกี่ยวข้องในการฟอกสีกรดมะนาว ได้แก่ (John, 1974)

1. ชนิดของถ่านที่ใช้ฟอกสี

ในการคัดเลือกถ่านที่ดีต้องพิจารณาลักษณะการนำไปใช้งานที่เหมาะสม ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ดเหมาะสำหรับฟอกสีแบบคอลัมน์ต่อเนื่อง ชนิดผงเหมาะสำหรับฟอกสีแบบครั้งคราว (batch)

2. เวลาในการฟอกสี

ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ด ใช้เวลาในการฟอกสีจนถึงจุดสมดุลย์นานกว่าชนิดผงประสิทธิภาพของการฟอกสีด้วยถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ดจะบอกเป็นอัตราการไหลผ่านคอลัมน์ หากไหลผ่านเร็วแสดงถึงประสิทธิภาพการฟอกสีที่ดี สำหรับการฟอกสีแบบครั้งคราว(batch)ที่ใช้ถ่านกัมมันต์ชนิดผงนั้นเวลาที่ใช้ในการฟอกสีขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการฟอกสี

3. อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการฟอกสีกรดมะนาวเป็นการเร่งปฏิกริยาในการฟอกสีให้เกิดได้เร็วขึ้น ระบบการฟอกสีเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการฟอกสี การฟอกสีในระบบสูญญากาศสามารถใช้อุณหภูมิต่ำได้ แต่ต้นทุนการผลิตจะสูงขึ้น

4. ความเป็นกรด-ด่าง

การฟอกสีกรดมะนาวมีค่าความเป็นกรด - ด่างต่ำ ดังนั้นควรเลือกชนิดของถ่านที่สามารถฟอกสีกรดมะนาวได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะที่เป็นกรด

5. ความเข้มข้นของกรดมะนาว

ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการฟอกสีกรดมะนาวต้องต่ำกว่าจุดอิ่มตัว เนื่องจากที่ความเข้มข้นในระดับอิ่มตัวนั้น การฟอกสีจะทำให้กรดมะนาวจับเกาะกับถ่านทำให้สูญเสียประสิทธิภาพการแยกกรดมะนาว

การฟอกสีกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำงานต้องออกแบบให้มีความเหมาะสม เช่น วัสดุที่ใช้ทำอุปกรณ์เป็นสแตนเลสที่ทนการกัดกร่อน เป็นต้น

ขั้นตอนที่ 5 การแยกสารปนเปื้อนด้วยเรซินแลกเปลี่ยนประจุ

โลหะอัลคาไลน์ อัลคาไลน์เอิร์ทและสารปนเปื้อนที่อยู่ในสารละลายกรดมะนาว สามารถกำจัดออกจากสารละลายกรดมะนาวด้วยเรซินแลกเปลี่ยนอิออน ทั้งแคทอิออน และแอนอิออนเรซิน จากตัวอย่างแคทอิออนที่ใช้ในรูปไฮโดรเจนอิออน (H^+) ได้แก่ Dowex-50 ซึ่งเป็น Strong cation exchange resin สำหรับแอนอิออน ได้แก่ Dowex-2 , Duolite A2 เป็นต้น

หลักการแยกอิออนเจือปน โดยโมเลกุลที่มีประจุจะถูกดูดซับด้วยเรซิน โมเลกุลเหล่านี้อาจจะถูกยึดหรือปล่อยออกมาได้โดยการแลกอิออน การแยกโดยใช้เรซินแยกอาจแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกจับสารปนเปื้อนที่มีอิออน คือ แคลเซียม (Ca^+) โปตัสเซียม (K^+) โซเดียม (Na^+) ด้วยแคทอิออนเรซิน และคาร์บอเนต ($CO_3^=$) ซัลเฟต ($SO_4^=$) ด้วยแอนอิออน เป็นต้น หลังจากนั้นจึงชะอิออนสารปนเปื้อนด้วยกรดหรือเบสทำให้สารเจือปนหลุดออกไปจากคอลัมน์ กลไกแบบง่ายๆ ของโครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนสามารถอธิบายได้ดังสมการที่ 4 และ 5

$X^+ + R^-Y^+ \longrightarrow Y^+ + R^-X^+$ (Cation exchange) ---- สมการที่ 4

$X^- + R^+Y^- \longrightarrow Y^- + R^+X^-$ (Anion exchange) ---- สมการที่ 5

เมื่อค่า X = อิออนของสารเจือปน

Y = อิออนของ mobile phase

R = ตำแหน่งของอิออนบนตัวแลกเปลี่ยนอิออน

ในสมการที่ 4 การแลกเปลี่ยนแคทอิออน สารเจือปน (X^+) จะแย่งที่กับอิออนของ mobile phase (Y^+) ที่ตำแหน่ง R^- บนตัวแลกอิออน สำหรับการแลกเปลี่ยนแบบแอนอิออน (สมการที่ 5) แอนอิออนของสารเจือปน (X^-) จะแย่งที่กับอิออนของ mobile phase (Y^-) ที่ตำแหน่ง R^+ การแยกสารปนเปื้อนดังกล่าวอาศัยความแตกต่างของ ionic strength ของอิออนในสารละลายและของเรซิน (Helferich, 1962 ; Leader, 1962)

สมบัติของเรซิน

โครงสร้างเป็นรูปตาข่ายหรือ matrix เป็นสามมิติที่มีพันธะโควาเลนท์ต่อกับหมู่ที่มีประจุ ถ้าหมู่ที่มาต่อนี้เป็นประจุลบก็ใช้ในการแลกเปลี่ยนอิออนบวก ที่เรียกว่า ตัวแลกเปลี่ยนแคทอิออน โดยหมู่ที่ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนแคทอิออนทั่วๆไปคือ sulfonic group (HSO_3^-) ถ้า HSO_3^- รวมกับ H^+ ก็เรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนอิออนอยู่ใน acid form ซึ่งสามารถแลก H^+ หนึ่งตัวต่อ Na^+ หนึ่งตัว หรือ H^+ สองตัวต่อ Ca^{++} หนึ่งตัว สำหรับ strong cation exchanger resin ที่ใช้ คือ Dowex-50 ก็มีหมู่ HSO_3^- เป็นตัวแลกเปลี่ยนแคทอิออนด้วยเช่นเดียวกัน

สำหรับหมู่ที่มาต่อกับเรซิน โดยพันธะโควาเลนท์ที่มีประจุบวก เรียกว่า ตัวแลกเปลี่ยนแอนอิออน ถ้าเป็น quaternary amino group มาต่อจะเป็นตัวแลกเปลี่ยนชนิด strongly basic anion exchanger ส่วน weakly basic anion exchanger เป็นพวก aromatic หรือพวก aliphatic amino group (Leader, 1962)

ขั้นตอนที่ 6 การตกผลึกกรดมะนาว

การตกผลึกกรดมะนาวเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการแยกกรดมะนาวให้บริสุทธิ์ก่อนทำให้แห้งเพื่อคัดขนาดและบรรจุต่อไป ในขั้นตอนการตกผลึกกรดมะนาวเป็นโมโนไฮเดรทและกรดมะนาวแอนไฮดรัส แตกต่างกันที่กรดมะนาวโมโนไฮเดรทตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำ โดยต่ำกว่า 36.5 $^oซ.$ ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 25-30 $^oซ.$ กรดมะนาวแอนไฮดรัสจะตกผลึกภายใต้สูญญากาศ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 36.5 $^oซ.$ การแยกผลึกออกจากน้ำหมักโดยการเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงน้ำหมักจะถูกย้อนกลับไประเหยน้ำออกทำให้เข้มข้นเพื่อตกผลึกหรือย้อนกลับไปฟอกสีเพื่อแยกสารเจือปนออก (Kubicek and Rohr, 1986)

1.5 เหตุจูงใจในการทำวิจัย

จุดประสงค์หลักของงานวิจัยและพัฒนานี้เพื่อแยกและตกผลึกกรดมะนาวให้บริสุทธิ์ และใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากสภาวะเศรษฐกิจในปัจจุบันได้พัฒนาด้านอุตสาหกรรมเกษตร ต้องอาศัยกรดมะนาวเป็น Food Ingredient และใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีกหลายประเภท

จากรายงานผลวิจัยการแยกและตกผลึกกรดมะนาวจากน้ำหมักของเชื้อรา *A. niger* มีน้อยและไม่มีรายละเอียดในขั้นตอนต่าง ๆเพียงพอที่จะนำไปปฏิบัติในกระบวนการผลิตได้ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนและตกผลึกกรดมะนาวจากน้ำหมัก เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับพัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.6 ขั้นตอนการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตกตะกอนกรดมะนาวจากน้ำหมัก
2. ศึกษาสภาวะการละลายตะกอนกรดมะนาว
3. ศึกษาสภาวะการฟอกสีสารปนเปื้อนในสารละลายกรดมะนาว
4. ประจุปนเปื้อนในสารละลายกรดมะนาวด้วยเรซิน
5. ตกผลึกกรดมะนาวโมโนไฮเดรท
6. ศึกษาสมบัติและความบริสุทธิ์ของกรดมะนาวที่ตกผลึกได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย