การผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโก่โก้

นางสาวชุลีพร หล่ออุดมพันธ์
นางสาวดวงกมล เจริญวงศ์
นายภูเบศร์ ยะอัมพันธ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2541

ว 035
ช554
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....33529
วัน, เดือน, ปี.....13 ส.ค. 2542

สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ต้องไม่ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of Citric acid from Cocoa Pulp Extract

Miss Chuleeporn Lor - udomphun
Miss Duangkamol Charoenwong
Mr. Phubeth Ya - umphan

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of
The Requirement for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut ' s Institute of Technology Ladkrabang
1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโก้โก้
นักศึกษา	นางสาวชุลีพร หล่ออุดมพันธ์
	นางสาวดวงกมล เจริญวงศ์
	นายภูเบศร์ ยะอัมพันธ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
	อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

_____ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

_____ กรรมการ

(อาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล)

_____ กรรมการ

(อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้
นักศึกษา นางสาวชุลีพร หล่ออุดมพันธ์
นางสาวดวงกมล เจริญวงศ์
นายภูเบศร์ ยะอัมพันธ์
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

การผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ โดยคัดเลือกจากจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus niger* TISTR 3089, *Candida tropicalis* TISTR 5023 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 100 พีเอช 6.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถผลิตกรดซิตริกได้ โดย *A. niger* TISTR 3089 สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดในวันที่ 9 คือร้อยละ 20.3 แตกต่างจาก *C. tropicalis* TISTR 5023 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อนำ *A. niger* TISTR 3089 มาเลี้ยงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เพื่อศึกษาหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก พบว่าสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 โดยปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่มีความเหมาะสม ในช่วงวันที่ 6 – 12 จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดซิตริกได้โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดร้อยละ 18.1 ในวันที่ 9 ซึ่งสูงกว่าการผลิตที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Production of Citric acid from Cocoa Pulp Extract
Name	Miss Chuleeporn Lor - udomphun
	Miss Duangkamol Charoenwong
	Mr. Phubeth Ya – umphan
Special Project Advisor	Mrs. Duangjai Ochaikul
	Miss Kulwadee Tongpubesra
Department	Applied Biology
Academic year	1998

Abstract

Production of citric acid from cocoa pulp extract using there microorganisms i.e., *Aspergillus niger* TISTR 3089, *Candida tropicalis* TISTR 5023 and *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 was investigated. *A. niger* TISTR 3089 produced the highest yield of citric acid approximately 20.3 percent on day 9 with significant difference from *C. tropicalis* TISTR 5023 and *S. cerevisiae* TISTR 5088. The optimum conditions for high yield of citric acid production were 25 percent cocoa pulp extract, no addition of nitrogen and incubation temperature at 30 °C. There was not any significant difference of citric acid production between days 6 – 12. The maximum yield is approximately 18.1 percent on day 9, which was higher than citric acid production at 25 ° and 37 °C with significant difference at 95 percent confidence.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตและสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณอาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล และอาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำโครงงานพิเศษ และตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษ ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษตลอดมา และขอขอบคุณเพื่อน ๆ และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษทำให้โครงงานพิเศษสำเร็จสมบูรณ์

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญรูป	ง
สารบัญตาราง	จ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 วัตถุประสงค์	1
1.2 ขอบเขตโครงงานพิเศษ	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	
2.1 โกโก้	3
2.2 วัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริก	6
2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดซิตริก	9
2.4 คุณสมบัติของกรดซิตริก	10
2.5 ชีวเคมีของการผลิตกรดซิตริก	11
2.6 การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม	12
2.7 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก	18
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	22
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย	
4.1 การศึกษาและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	26
4.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	27
4.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือก	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4.4 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือก	29
4.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือก	31
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	34
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก ก อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ	38
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	40
ภาคผนวก ค ตารางวิเคราะห์ทางสถิติ	49
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐาน	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2 – 1 ผลโกโก้	5
2 – 2 โครงสร้างทางเคมีของกรดซิตริก	10
2 – 3 วิถีการสังเคราะห์กรดซิตริกและกรดอิทาโคนิกโดยเชื้อ *Aspergillus niger*	12
2 – 4 แผนภูมิแสดงการผลิตกรดซิตริกโดยการหมักที่ผิวอาหาร	16
2 – 5 การผลิตกรดซิตริกในอาหารเหลว	17
3 – 1 น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	23
3 – 2 เครื่องคั้นน้ำแบบบีบอัด	23
4 – 1 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	28
4 – 2 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ*A. niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยมีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่างกันที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	29
4 – 3 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ*A. niger* TISTR 3089 ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ25 พีเอช 6.5 และมีความเข้มข้นของยีสต์สกัดต่างกัน อุณหภูมิในการผลิต 30 องศาเซลเซียส	32
4 – 4 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ*A. niger* TISTR 3089 ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ25 พีเอช 6.5 และมีความเข้มข้นของเปปโตนต่างกัน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	32
4 – 5 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ*A. niger* TISTR 3089 ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ25 พีเอช 6.5 และมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	33
4 – 6 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ*A. niger* TISTR 3089 ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ25 ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจน พีเอช 6.5 โดยใช้อุณหภูมิต่างกัน	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2 – 1 องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	5
2 – 2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกประเภทต่าง ๆ	7
2 – 3 การผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ *Candida lipolytica* จากวัตถุดิบต่าง ๆ	8
4 – 1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

กรดซิตริก (citric acid) หรือกรดมะนาวเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า 2 – hydroxy – 1, 2, 3 – propanetricarboxylic acid กรดซิตริกจะใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมอาหารและยาจะมีการใช้กรดซิตริกอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นสารที่ละลายในน้ำได้ดีและสามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม มีความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายได้ง่าย ราคาถูก และหาได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดซิตริกในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมอื่น ๆ อีกด้วย แต่การสังเคราะห์กรดซิตริกจากวัตถุดิบต่าง ๆ มีข้อเสียหลายอย่างคือ วัตถุดิบมีราคาแพง หรือวัตถุดิบที่ใช้เป็นอันตราย จึงมีผู้ศึกษาการผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตกรดซิตริกได้ เช่น เชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ รา การผลิตกรดซิตริกจะนิยมใช้เชื้อรา*Aspergillus niger* แต่ในปัจจุบันนั้นก็มีการศึกษาเชื้อยีสต์ซึ่งสามารถผลิตกรดซิตริกในปริมาณสูงเช่นกัน เช่น *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Endomycopsis* sp. เป็นต้น สำหรับวัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริกนั้นมีหลายชนิด เช่น กากน้ำตาล แป้ง หรือน้ำผลไม้

โกโก้เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย ปลูกมากในจังหวัดแถบภาคใต้ จากการศึกษาพบว่าน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ประกอบด้วยน้ำตาลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 – 15 จึงสามารถนำน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มาเป็นวัตถุดิบเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดซิตริกได้ ดังนั้นการใช้น้ำสกัดจากจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มาผลิตกรดซิตริก ถือได้ว่าเป็นการนำเอาวัสดุเหลือใช้มาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกทางหนึ่ง

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงงาน

1.1.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่จะ นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อผลิตกรดซิตริก

1.1.2 เพื่อศึกษาถึงความสามารถของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ และทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

1.1.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด

1.1.4 นำผลจากการศึกษานี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

1.3.2 เป็นการนำวัสดุเหลือใช้มาใช้ให้เกิดประโยชน์

1.3.3 เป็นแนวทางสำหรับงานวิจัยเพื่อพัฒนาการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม

1.3.4 ลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 โกโก้

โกโก้เป็นพืชยืนต้น สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศเขตร้อนและชุ่มชื้น เจริญได้ตั้งแต่ระดับน้ำทะเล จนถึงสูงกว่าระดับน้ำทะเล 2,000 ฟุต ในแหล่งที่มีฝนตกสม่ำเสมอและปริมาณฝนตั้งแต่ 1,500 – 2,000 มิลลิลิตรต่อปี โกโก้เป็นพืชที่ไม่ต้องการแสงแดดมาก ส่วนใหญ่ต้องการร่มเงาจากพืชอื่น ดินที่เหมาะสมต่อการปลูกโกโก้ควรเป็นดินร่วนปนทรายมีอินทรีย์วัตถุมาก ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินระหว่าง 5.5 – 7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 24 – 29 องศาเซลเซียส (สมศักดิ์ วรรณศิริ, 2532)

แหล่งปลูกโกโก้ในประเทศไทยมีปลูกกันมากในแถบจังหวัดภาคใต้ ตั้งแต่ชุมพรไปจนถึงยะลา นอกจากนี้มีปลูกแถบฝั่งทะเลตะวันออกของอ่าวไทย เช่น ชลบุรี จันทบุรี และทางภาคตะวันตก เช่น สมุทรสงคราม สมุทรสาคร กลุ่มประเทศผู้ผลิตที่สำคัญ ได้แก่ ไอเวอรี่โคสท์ กานา บราซิล ไนจีเรีย แคเมอรูน และมาเลเซีย เป็นต้น โกโก้เป็นพืชที่เกษตรกรผู้ปลูกมักจำหน่ายในรูปเมล็ดแห้งเป็นส่วนใหญ่ โดยตลาดที่รับซื้อจะนำเมล็ดโกโก้แห้งส่งโรงงานแปรรูปเป็นโกโก้ผง โกโก้เหลว และช็อกโกแลต โรงงานอุตสาหกรรมจะนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปเป็นส่วนผสมในอาหารต่างๆ เช่น ทำเป็นเครื่องดื่มบำรุงกำลัง ลูกอม ลูกกวาด เพิ่มกลิ่นและรสชาติของอาหารจำพวกคุกกี้ ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์ เช่น น้ำหอม ลิปสติก ใช้ในงานอุตสาหกรรมยาโดยนำไปเคลือบหรือผสมกับตัวยา (ผานิต งานกรณาธิการ และคณะ, 2531) นอกจากนี้เปลือกโกโก้ยังเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ได้อีกด้วย

ต้นที่ปลูกจากเมล็ดจะเริ่มให้ผลเมื่อมีอายุประมาณ 2 – 3 ปี และจะให้ผลผลิตสูงเมื่อมีอายุ 8 – 15 ปี ดอกและผลจะออกที่ลำต้นและกิ่งแก่ ระยะเวลาตั้งแต่ออกดอกจนผลสุกประมาณ 5 – 6 เดือน ผลโกโก้มีลักษณะคล้ายมะละกอ แสดงดังรูปที่ 2 – 1 ภายในผลมีเมล็ด 25 – 50 เมล็ด ขึ้นอยู่พันธุ์โกโก้ (ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร, 2525)

พันธุ์โกโก้ แบ่งออกเป็น 3 สายพันธุ์ (ผาณิต งานกรณาธิการ, 2532, Wood, 1985) คือ

- สายพันธุ์คริออลโล (Criollo) ลักษณะผลมีสีแดงหรือเขียว เมื่อสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือส้ม เปลืองบาง ผิวขรุขระ ก้นแหลม ผลยาว เมล็ดใหญ่มีสีขาวหรือม่วงอ่อน โกโก้สายพันธุ์นี้จะให้กลิ่นรสชาติดี ซึ่งเหมาะสำหรับทำช็อกโกแลต แต่เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่ำและไม่ต้านทานต่อโรคและแมลง จึงไม่ค่อยนิยมปลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สายพันธุ์ฟอราสเตอโร (Forastero) มี 2 กลุ่มที่สำคัญคือ

ก. เวสท์อัฟริกันอะมิโลนาโด (West African Amelonado) ผลสีเขียวยาว เมื่อสุกจะมีสีเหลือง เปลือกหนา ก้นมน เมล็ดแบนกว่าพันธุ์ครีออลโล สีแดงเข้มหรือม่วงเข้ม ต้นที่ปลูกด้วยเมล็ดจากพันธุ์นี้ มักจะไม่กลายพันธุ์ เพราะผสมตัวเองได้ แต่จะไม่ทนทานต่อโรคยอดและกิ่งแห้ง

ข. อัปเปอร์อเมซอน (Upper Amazon) ผลอ่อนมีลักษณะสีเขียว เมื่อสุกมีสีเหลือง ขนาดของผลใกล้เคียงกับพันธุ์เวสท์อัฟริกันอะมิโลนาโด แต่มีขนาดเล็กกว่า เมล็ดมีสีม่วงเข้ม ผลผลิตสูง ต้นแข็งแรงเจริญเติบโตได้ดี ทนทานต่อการรบกวนโรคและแมลงบางชนิด โกโก้พันธุ์นี้เมื่อปลูกจากเมล็ดมักจะให้ผลไม่ตรงตามพันธุ์ เนื่องจากพันธุ์นี้ไม่สามารถผสมตัวเองได้ ต้องอาศัยการผสมข้ามสายพันธุ์

- สายพันธุ์ตรินิตาริโอ (Trinitario) ลักษณะผลค่อนข้างใหญ่ ก้นแหลม เมล็ดมีขนาดใหญ่ แต่ผลผลิตต่ำกว่าพันธุ์เวสท์อัฟริกันอะมิโลนาโด เข้าใจว่าโกโก้พันธุ์นี้เป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ครีออลโลกับพันธ์เวสท์อัฟริกันอะมิโลนาโด นิยมปลูกด้วยต้นที่ติดตาหรือปักชำ

ผลโกโก้จะอยู่บนก้านดอก ซึ่งผลโกโก้เจริญมาจากดอก ผิวของผลโกโก้จะมีลักษณะเป็นตุ่ม ๆ ขรุขระเป็นร่อง ๆ ภายในผลโกโก้ที่เจริญเต็มที่จะประกอบไปด้วยเมล็ดโกโก้ ซึ่งเมล็ดโกโก้จะถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มที่มีลักษณะเป็นเมือก เหนียว มีสีแตกต่างกัน เช่น ขาว ชมพู ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของโกโก้ (Wood และคณะ, 1985) เมื่อนำมาสกัดด้วยวิธีการบีบอัด น้ำสกัดที่ได้มีลักษณะขาว ข้น หนืด ในระหว่างการหมักมีการสูญเสียเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ประมาณร้อยละ 5 – 7 โดยสลายเป็นของเหลวออกไปจากกองหมัก (Adam, 1982) เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีน้ำตาลประมาณร้อยละ 10 – 15 เปกตินร้อยละ 1 และกรดซิตริกร้อยละ 1 (Dittmar,1956) ดังแสดงในตารางที่ 2 – 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 – 1 องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

ชนิด	ไนโตรเจน (ร้อยละ)	โปรตีนไม่บริสุทธิ์ (ร้อยละ)	กลูโคส (ร้อยละ)	ซูโครส (ร้อยละ)	น้ำตาลทั้งหมด (ร้อยละ)	โปรตีน (ร้อยละ)	กรดซิตริก (ร้อยละ)
Comum	0.63	0.10	14.46	0.33	14.79	0.90	1.41
Trinitario	0.69	0.11	15.32	0.58	15.90	0.92	1.52
Maranhao	0.56	0.09	14.70	0.11	14.81	1.19	1.38
Para	0.63	0.10	15.11	0.15	15.26	1.05	1.20
Catongo	0.69	0.11	11.60	0.90	12.50	1.02	0.77

ที่มา : Dittmar (1956)

รูปที่ 2 – 1 ผลโกโก้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริก

วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซิตริก มีหลายชนิด ซึ่งมีทั้งน้ำตาล แป้ง สารประกอบไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ และไขมัน แต่ในการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่วัตถุดิบที่ใช้จะเป็นประเภท น้ำตาลและแป้ง สำหรับแป้งจะใช้ใน 2 รูปแบบ คือ ใช้ในรูป solid state และย่อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคสในการหมักในอาหารเหลว แป้งที่นำมาผลิตกรดซิตริก อาจเป็นแป้งจากธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง แป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลัง รำข้าว แกลบ และมีการผลิตกรดซิตริกจากกากแอบเปิ้ลที่คั้นน้ำแล้ว(apple pomace) สำหรับน้ำตาลอาจจะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ซูโครส มอลโทส หรืออาจใช้กากน้ำตาลทั้งที่มาจากอ้อยและหัวบีท และใช้น้ำผลไม้ เช่น สับปะรด น้ำมะพร้าว และน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (Atsushi และคณะ, 1996, El – Sharkawy และคณะ, 1995, Hang และคณะ, 1989, Somsak และคณะ, 1994) ส่วนวัตถุดิบอื่น ๆ แสดงดังตารางที่ 2 – 2

สำหรับเชื้อยีสต์ *Candida lipolytica* นั้นมีรายงานว่าสามารถใช้วัตถุดิบเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซิตริกได้หลายชนิด โดยได้มีรายงานว่าเชื้อ *C. lipolytica* 281 (ATCC 20346) และสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์นั้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสร้อยละ17.3, เอ็น – พาราฟิน และน้ำมันมะพร้าวร้อยละ 5 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส *C. lipolytica* 281 มีอัตราการผลิตกรดซิตริกและกรดไอโซซิตริกเป็น 2ต่อ 1 เมื่อใช้น้ำมันมะพร้าวและเอ็น – พาราฟิน ถ้าใช้สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ N - 5704 จะมีอัตราการผลิตกรดซิตริกและกรดไอโซซิตริกเป็น 44 ต่อ 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเอ็น – พาราฟิน และถ้าใช้สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ N - 2484 จะมีอัตราการผลิตกรดซิตริกและกรดไอโซซิตริกเป็น 62 ต่อ 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกลูโคส สำหรับผลผลิตของสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ N – 5704 (จิระนันท์, 2533) จากวัตถุดิบอื่น ๆ แสดงดังตารางที่ 2 – 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 – 2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกประเภทต่างๆ

ประเภทวัตถุดิบ	ตัวอย่างวัตถุดิบ	จุลินทรีย์และการหมัก
น้ำตาล	กลูโคส ซูโครส มอลโทส ฟรักโทส แมนโนส กากน้ำตาลจากอ้อยและหัวบีท น้ำผลไม้ เช่น สับปะรด และน้ำมะพร้าวเข้มข้น	ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมอยู่ในช่วงร้อยละ 14 – 22 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้ได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และราที่ผลิตกรดซิตริกได้
แป้ง	แป้งจากธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ฯลฯ มันฝรั่ง มันสำปะหลัง กากมัน รำข้าว แกลบ	ใช้ได้ทั้งในรูปสารละลายแป้งที่ต้องผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ หรือในรูปแป้งดิบ
สารประกอบไฮโดรคาร์บอน	เอ็น – อัลเคน (9 – 20 คาร์บอนอะตอม) เอ็น – พาราฟิน (9 – 30 คาร์บอนอะตอม)	มีการทดลองในฟลาสก์เขย่าที่ญี่ปุ่น หมักยีสต์ *Candida* sp. ให้ผลผลิตสูงถึงร้อยละ 130 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่เป็นกรดไอโซซิตริกครึ่งหนึ่ง
แอลกอฮอล์	เมทานอล เอธานอล บิวทานอล และแอลกอฮอล์ที่มี12–16 คาร์บอน	ใช้ในปริมาณร้อยละ 1 – 2 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการทดลองในยีสต์ *Candida* sp. บางชนิด *Torulopsis xylinus* และ *Pichia farimosa*
ไขมัน	ไขมัน กรดไขมัน และน้ำมันธรรมชาติ	ใช้เลี้ยงเชื้อ *Candida* , *Hansenula* และ *Pichia* sp.

ที่มา : ชัยวัฒน์ (2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 – 3 การผลิตกรดซิตริกโดย*Candida lipolytica* จากวัตถุดิบต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอน	ระยะเวลาในการหมัก (วัน)	กรดซิตริก (ร้อยละ)
Caproic acid	6	0
Caprylic acid	6	0
Capric acid	6	0
Lauric acid	6	32.8
Myristic acid	6	89.2
Palmitic acid	6	96.2
Stearic acid	6	105.0
Arachidic acid	6	0.4
Behimic acid	6	6.6
Oleic acid	6	107.0
Linoleic acid	6	53.2
Linolenic acid	6	0.3
Coconut oil	5	99.6
Palm oil	6	155.0
Palm kernal oil	6	117.0
Olive oil	4	119.0
Soyabean oil	4	115.0
Linseed oil	4	97.2
Rapeseed oil	4	48.8
Glyceral	4	58.8
N – Paraffin	4	161.0

ที่มา : จิระนันท์ (2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดซิตริก

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตและสะสมกรดซิตริกนั้นมีหลายชนิด คือ เชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรีย ซึ่งบางสายพันธุ์สามารถผลิตกรดซิตริกในปริมาณสูงพอที่จะผลิตในระดับอุตสาหกรรม ส่วนอีกหลาย ๆ สายพันธุ์นั้นผลิตกรดซิตริกยังไม่พอเพียงที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรม เชื้อราที่สามารถผลิตกรดซิตริก ได้แก่ *Aspergillus awamori, A. clavatus, A. fenicis, A. flavus, A. foetidus, A. fonsecaeus, A. fumaricus, A. lanosus, A. luchensis, A. niger, A. saitoi, A. phoenicus, A. usumii, A. wentii, Citromyces pfefferianus, Penicillium citrinum, P. citucum, P. janthinellun, P. luteum, P. restrictum, Mucor piriformis, Mucor* sp., *Trichoderma viride, Ustulina vulgaris* นอกนี้ยังมีเชื้อราสายพันธุ์ *Absidia, Ascochyta, Acremonium, Botrytis, Eupenicillium, Fusarium, Sclerotium* และ *Talaromyces* เป็นต้นที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้(จิราภรณ์, 2525, ดุษณี, 2537, Cochrane, 1958)

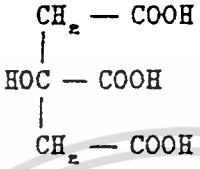
เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดซิตริกจากเอ็น – พาราฟิน และสารอื่น ๆ ที่คล้ายคลึงกันได้ ได้แก่ *Arthrobacter, Brevibacterium* และ *Corynebacterium* สำหรับเชื้อยีสต์ก็สามารถผลิตกรดซิตริกได้เช่นกัน เช่น *Brettanomyces, Candida fibriae, C. guilliermondii, C. intermedia, C. lipolytica, C. oleophila, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. subtropicalis, C. zeykanoides, Endomycopsis, Hansenula, Nematospora, Pichia, Saccharomyces, Sporobolomyces, Torulopsis* และ *Zygosaccharomyces* (ดุษณี, 2537)

ในปัจจุบันการผลิตกรดซิตริกจะใช้เชื้อราเป็นเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักซึ่งมีข้อได้เปรียบหลายประการ คือ สามารถปฏิบัติงานได้ง่าย วัตถุดิบที่เชื้อราสามารถใช้เพื่อผลิตกรดซิตริกมีราคาถูก และกรดซิตริกที่ได้มีปริมาณสูงและมีความคงตัว ส่วนใหญ่จะใช้เชื้อ*A. niger* มีลักษณะสำคัญ คือ อัตราการเจริญและอัตราการผลิตกรดซิตริกมีค่าสูง แยกได้เป็น 2 ช่วง โดยในระหว่างการเจริญจะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นจำนวนมากและมีการผลิตกรดซิตริกออกมาน้อย หลังจากนั้นในช่วงการผลิตกรดซิตริกจะมีการเจริญของเซลล์เพียงเล็กน้อยแต่มีการผลิตกรดซิตริกสูง แต่เชื้อราจะมีการผลิตกรดอื่น ๆ ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการ ทำให้ยากต่อการควบคุม จึงทำให้มีผู้ศึกษาเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Candida* และสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงคือ *Endomycopsis* และ *Saocharomyces* ซึ่งก็สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณมากเช่นกัน (จิระนันท์, 2533, จิราภรณ์, 2525)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 คุณสมบัติของกรดซิตริก

กรดซิตริกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง มีชื่อทางเคมีคือ 2 – hydroxy – 1,2,3 – propanetricarboxylic acid มีสูตรโครงสร้าง ดังรูปที่ 2 – 2



รูปที่ 2 – 2 โครงสร้างทางเคมีของกรดซิตริก
ที่มา : ชัยวัฒน์ (2536)

กรดซิตริกพบในธรรมชาติโดยเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อผลไม้หลายชนิด เช่น ส้ม มะนาว สับปะรด และผลไม้อื่น ๆ เรียกกรดซิตริกประเภทนี้ว่ากรดซิตริกธรรมชาติ(natural citric acid)

ในปี ค.ศ. 1893 Wehmer พบว่าเชื้อราที่ชื่อว่า *Citromyces* (*Penicillium*) สามารถผลิตกรดซิตริกได้ ในปัจจุบันจึงมีการใช้เชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริก แต่จะมีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่จะให้กรดซิตริกในปริมาณมาก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม กรดซิตริกที่ผลิตในทางการค้าจะถูกผลิตออกมาใน 2 รูปแบบคือ ในรูป anhydrous ($C_6H_8O_7$) มีจุดหลอมเหลวที่ 153 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้จากการตกผลึกในสารละลายกรดที่ร้อน และในรูป monohydrate ($C_6H_8O_7 . H_2O$) มีจุดหลอมเหลวที่ 135 – 152 องศาเซลเซียส จะได้จากการตกผลึกสารละลายที่อุณหภูมิต่ำกว่า 36.5 องศาเซลเซียส (ชัยวัฒน์, 2536)

กรดซิตริกถูกใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท โดยร้อยละ 75 ของการผลิตทั้งหมดจะถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม และขนมหวาน เช่น ใช้เป็นส่วนผสมในการทำลูกกวาด ลูกอม ผลไม้เชื่อม แยม ใช้เป็นตัวปรับกรด และใช้เพิ่มกลิ่นรส ร้อยละ 10 ใช้ในอุตสาหกรรมยา โดยใช้คงสภาพกรดในการผลิตยาแอสคอร์บิก (ascorbic) แอสไพริน(aspirin) และแอนตาซีส (antasis) ใช้เป็นสารทำให้เกิดฟองฟู่ผสมกับคาร์บอเนต หรือไบคาร์บอเนต โดยใช้ในการเตรียมยาลดกรด และร้อยละ 15 จะใช้ในอุตสาหกรรมเคมี เส้นใย และอุตสาหกรรมซักล้าง โดยใช้ผสมกับผงซัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟอกในรูปของไตรโซเดียมซิเตรต (trisodium citrate) เพื่อช่วยในการทำความสะอาด (ชัยวัฒน์, 2536, ดุษณี, 2537)

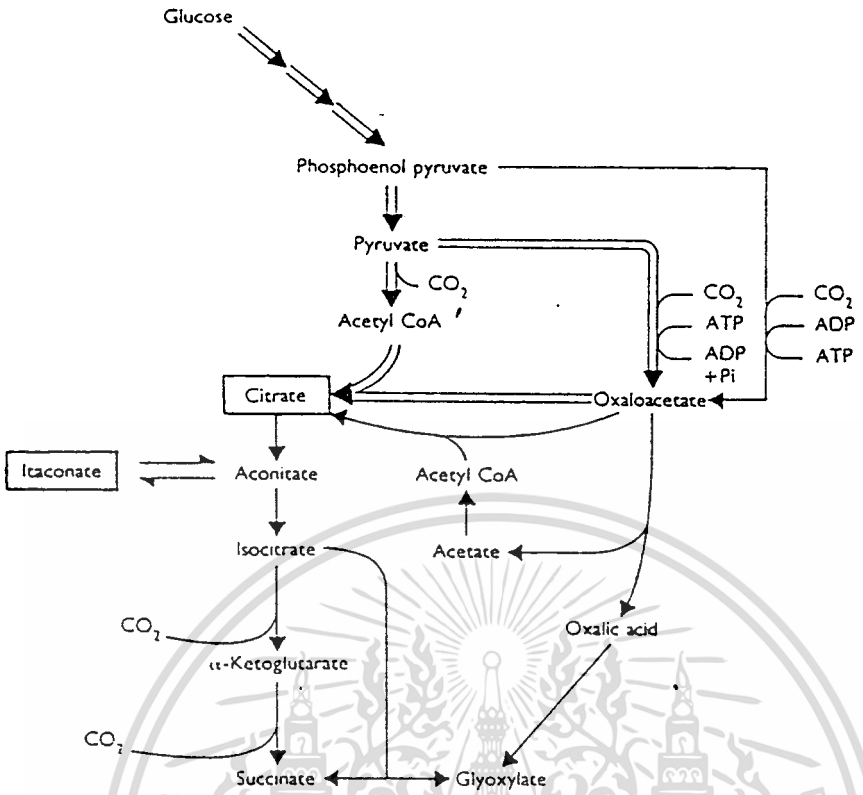
2.5 ชีวเคมีของการผลิตกรดซิตริก

กรดซิตริกจัดเป็น primary metabolic product เกิดได้จากการย่อยสลายน้ำตาลเฮกโซส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจะผ่านกระบวนการ Embden – Meyerhof (EMP) pathway ประมาณร้อยละ 80 และผ่านกระบวนการ Pentose Phosphate cycle อีกร้อยละ 20 จนได้เป็น pyruvate และ acetyl Co A หลังจากนั้นจะมีการรวมตัวกันระหว่าง acetyl Co A กับ oxaloacetate ทำให้เกิดเป็นกรดซิตริกออกมา (ชัยวัฒน์, 2536, ดุษณี, 2537)

การสะสมกรดซิตริกในปริมาณสูงนั้น เนื่องจากความผิดพลาดของการทำงานใน Tricarboxylic acid cycle และ Glyoxylate cycle เอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการหมักกรดซิตริก ได้แก่ aconitase, isocitrate lyase และ citrate synthetase โดยในช่วงของการสะสมกรดซิตริก เอนไซม์ aconitase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน citrate เป็น isocitrate และเอนไซม์ isocitrate lyase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาในช่วงแรกของ Glyoxylate cycle นั้น จะมีกิจกรรมในระดับต่ำ ในขณะที่เอนไซม์ citrate synthetase มีระดับสูงจึงทำให้เกิดการรวมตัวของ acetyl CoA กับ oxaloacetate เกิดเป็นกรดซิตริกขึ้น แต่จากการที่เอนไซม์aconitase และ isocitrate lyase มีกิจกรรมในระดับต่ำนั้น TCA cycle และ Glyoxytate cycle ก็จะถูกยับยั้ง ทำให้ oxaloacetate ไม่เกิดขึ้น ดังนั้น oxaloacetate จึงต้องสร้างจากวิถีอื่น ซึ่งพบว่าoxaloacetate จะถูกสังเคราะห์จากปฏิกิริยาCarboxylation ของ pyruvate ดังรูปที่ 2 – 3 (จิราภรณ์, 2525, Cochrane, 1958)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาอิทธิพลของโลหะบางชนิด เช่น เหล็ก และทองแดง โดยพบว่าธาตุเหล็กเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ aconitase ให้มีกิจกรรมที่สูงขึ้น เพราะเอนไซม์ชนิดนี้ต้องอาศัยเหล็กเป็น Co – factor ซึ่งจะส่งผลให้การสะสมของกรดซิตริกนั้นลดลง แต่ทองแดงจะเป็นปฏิปักษ์ ต่อเหล็ก (antagonist) ดังนั้นจึงสามารถทำให้การสะสมกรดซิตริกเพิ่มขึ้นได้ โดยการเติมทองแดงลงในอาหารที่มีเหล็กอยู่ (ดุษณี, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



<u>รูปที่ 2 – 3</u> วิถีการสังเคราะห์กรดซิตริกและกรดอิทาโคนิก โดยเชื้อ*Aspergillus niger*

ที่มา : Milsom และ Meers (1985)

2.6 <u>การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม</u>

กรรมวิธีการหมักกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมนั้น มีทั้งวิธีที่หมักในสภาพอาหารเหลว (liquid cuture) และในสภาพอาหารแข็ง (solid state)

2.6.1 <u>กระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว</u>

เป็นกระบวนการหมักที่นิยมใช้ในการผลิตกรดซิตริกอย่างมาก กระบวนการหมักในสภาพนี้ พอจะแบ่งออกได้หลายกระบวนการ ดังนี้

2.6.1.1 กระบวนการหมักที่ผิวอาหาร (Surface culture fermentation)

เป็นกรรมวิธีเก่าแก่ที่สุดในการผลิตกรดซิตริกในยุโรปและอเมริกา โดยอาศัยหลักการเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญเติบโตบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลว ดังนั้นจึงต้องให้มีพื้นที่ผิวมากเพื่อเซลล์จะได้สัมผัสอากาศได้มาก จึงนิยมหมักในถาดหรือเรียกว่า Shallow pan process การผลิตกรดซิตริกโดยวิธีนี้จะเป็นการปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไหลเข้าไปในถาดหมักที่วางเรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ อยู่ภายในห้องหมัก (Fermentation chamber) ที่ปราศเชื้อ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถควบคุมปัจจัยที่สำคัญในการหมัก เช่น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และการหมุนเวียนของอากาศบริสุทธิ์ เป็นต้น ถาดที่ใช้จะทำจากอลูมิเนียมอย่างดี หรือเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีคุณภาพดี เพื่อป้องกันการกัดกร่อนหรือปนเปื้อนของเศษโลหะ อาหารที่ใช้ในการหมัก ได้แก่ กากน้ำตาลจากหัวบีท น้ำตาลดิบ ไซรับ หรือกากน้ำตาลบริสุทธิ์ การหมักเริ่มต้นเมื่อถ่ายสปอร์ *Aspergillus niger* ให้กระจายทั่วอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างทั่วถึง ควบคุมให้การหมักดำเนินที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 40 – 60 และควบคุมการหมุนเวียนของอากาศ การหมักจะใช้เวลา 8 – 14 วัน จนกระทั่งเชื้อราเจริญเติบโตและแผ่กระจายปกคลุมให้ทั่วผิวอาหารเลี้ยงเชื้อและทำให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในสภาพที่เป็นกรด ถ้าหากพีเอชในระหว่างการหมักสูงกว่า 3.0 จะเกิดกรดออกซาลิกและกลูโคนิกแทนกรดซิตริก เมื่อการหมักสิ้นสุดลงจึงทำการเก็บเกี่ยวกรดซิตริกออกจากน้ำหมัก ส่วนเส้นใยของเชื้อราที่เหลืออาจนำกลับไปใช้ในการหมักอีกครั้งได้เช่นกัน หรืออาจแยกทิ้งไปก็ได้ (ดุษณี, 2537, วรพจน์, 2533) แสดงดังรูปที่ 2 – 4

2.6.1.2 กระบวนการหมักในอาหารเหลว (Submerged fermentation)

เป็นกรรมวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม กระบวนการหมักวิธีนี้ใช้สำหรับผลิตกรดซิตริกทั่วโลกกว่าร้อยละ 80 โดยเริ่มใช้ในอุตสาหกรรมเมื่อปี 1930 ถังหมักที่ใช้จะเป็นถังหมักแบบ tower fermenter หรือถังหมักแบบ conventional stirred reactor แต่ถังหมักแบบ tower fermenter จะนิยมใช้มากกว่าเนื่องจากราคาถูกกว่า สามารถสร้างถังหมักที่มีขนาดใหญ่กว่าได้ และเกิดการปนเปื้อนของเชื้อได้น้อยกว่า วิธีการนี้ใช้ในประเทศอเมริกา อิสราเอล และอังกฤษ ซึ่งกรดซิตริกจะถูกผลิตขึ้นโดยเส้นใยของเชื้อ*A. niger* ที่อยู่ในอาหารเหลวในถังหมักขนาดลึก วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบนี้ได้แก่ ไซรับที่มีความเข้มข้นของกลูโคสกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูง และธัญพืชที่นำมาย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ก่อนเช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง หรือแป้งมันเทศ ซึ่งปรับความเข้มข้นของน้ำตาลให้ได้ปริมาณร้อยละ 15 – 20 และปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 2.5 – 3.0 วัตถุดิบเหล่านี้จะต้องมีเหล็ก แมงกานีส โคบอลท์ และนิกเกิล ในปริมาณน้อยมาก ในระหว่างการหมักจะต้องมีการเติมออกซิเจนตลอดเวลา อุณหภูมิของการหมักจะต้องอยู่ระหว่าง 28 – 35 องศาเซลเซียส และพีเอช จะต้องไม่เกิน 3.5 เพื่อป้องกันการเกิดกรดออกซาลิกและกลูโคนิก ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักประมาณ 5 – 14 วัน โดยผลผลิตที่ได้จะสูงถึงร้อยละ 95 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) หลังจากการหมักสิ้นสุดลง ของเหลวที่ได้จากการหมักนำมาสกัดเอากรดซิตริกออก (ดุษณี, 2537, ชัยวัฒน์, 2536) แสดงดังรูปที่ 2 – 5

เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีนักวิทยาศาสตร์หันมาสนใจการผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อยีสต์ โดยการหมักในอาหารเหลว โดยใช้สารพวกไฮโดรคาร์บอนเป็นวัตถุดิบ แต่พบว่ามักเกิดปัญหาการขาดแคลนวัตถุดิบและการปนเปื้อนของกรดไอโซซิตริก ซึ่งพบว่ากรดนี้จะเกิดขึ้นประมาณครึ่งหนึ่งของกรดทั้งหมด (จิราภรณ์, 2525, จิระนันท์, 2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการหมักในอาหารเหลวนี้มีข้อดีคือ ใช้วัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบได้ทุกชนิด ผลิตกรดซิตริกได้สูงเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ปรับปรุงวิธีการหมักได้ง่าย ใช้พื้นที่น้อย ต้นทุนต่ำ และควบคุมสภาพปลอดเชื้อได้ง่าย (วรพจน์, 2533)

นอกจากนี้แล้ว ในการหมักที่อาศัยกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลวยังสามารถทำได้ในสภาพการหมักอย่างต่อเนื่อง (Continuous fermentation) หรือในสภาพกึ่งต่อเนื่อง (Semicontinuous fermentation) ซึ่งโดยมากมักจะเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่ใช้ในการหมักในอัตราร้อยละ 4 ของปริมาตรทั้งหมด (ในขณะเดียวกันก็ต้องแยกเอาน้ำหมักที่มีกรดซิตริกอยู่ออกมาในอัตราเท่ากัน) ในทุก ๆ 24 ชั่วโมง หลังจากที่การหมักอยู่ในสภาพสูงสุดแล้ว (ชัยวัฒน์, 2536)

2.6.2 <u>กระบวนการหมักในสภาพอาหารแข็ง</u> (Solid culture หรือ Koji fermentation process)

เป็นกระบวนการหมักโดยใช้อาหารแข็งซึ่งอาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารแข็งในสภาพซึ่งไม่มีน้ำอิสระอยู่ในระบบ แต่มีน้ำอยู่ในสภาพความชื้นที่ถูกดูดซับที่ผิวของวัตถุดิบเท่านั้น กระบวนการหมักโดยอาหารแข็งนี้ได้พัฒนาขึ้นในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีต้นแบบมาจากกระบวนการหมักโคจิ อาหารแข็งที่ใช้ในการหมัก ได้แก่ กากมัน ข้าว รำข้าว สาลี ชานอ้อย หัวบีท มันฝรั่ง สับปะรด และอื่น ๆ โดยนำวัตถุดิบมาปรับพีเอชให้ลดลงเป็น 4 – 5 ก่อนนำมาใส่ถาดแล้วทำการฆ่าเชื้ออาหาร หลังจากอาหารเย็นลงจึงใส่สปอร์ของเชื้อรา *A. niger* สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญในอาหารที่มีแร่ธาตุต่าง ๆ และสามารถสร้างกรดซิตริกได้ ถาดอาหารที่ใส่เชื้อแล้วและมีความหนา 3 – 5 เซนติเมตร จะเก็บไว้บนชั้นในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิได้ และให้อากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผ่านไปยังถาดเลี้ยงเชื้อ การให้อากาศจะเป่าค่อย ๆ ตลอดเวลา หรือให้อากาศเป็นระยะก็ได้ อุณหภูมิในระหว่างการหมักเป็น 28 องศาเซลเซียส ซึ่งในระหว่างการหมักนั้นแป้งจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโดยเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา หรืออาจใช้เอนไซม์แอลฟา อะไมเลส ที่ผลิตขึ้นเพื่อการค้ามาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อนก็ได้ ซึ่งเอนไซม์แอลฟา - อะไมเลสที่เติมลงไปนี้จะช่วยเร่งการเจริญให้ดีขึ้น น้ำตาลที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดซิตริก และพีเอชของอาหารแข็งจะลดลงเป็น 1.8 – 2.0 เมื่อมีการผลิตกรดซิตริกมากขึ้น การหมักจะใช้เวลา 5 – 8 วัน ผลผลิตที่ได้จากกรรมวิธีนี้มีประมาณ 2500 ตัน (ดุษณี, 2537, วรพจน์, 2533)

อาหารแข็งที่มีกรดซิตริกจะนำมาบดและสกัดด้วยน้ำอุ่น จะได้สารละลายกรดซิตริกร้อยละ 4 และนำมาตกตะกอนต่อให้เป็นแคลเซียมซิเตรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

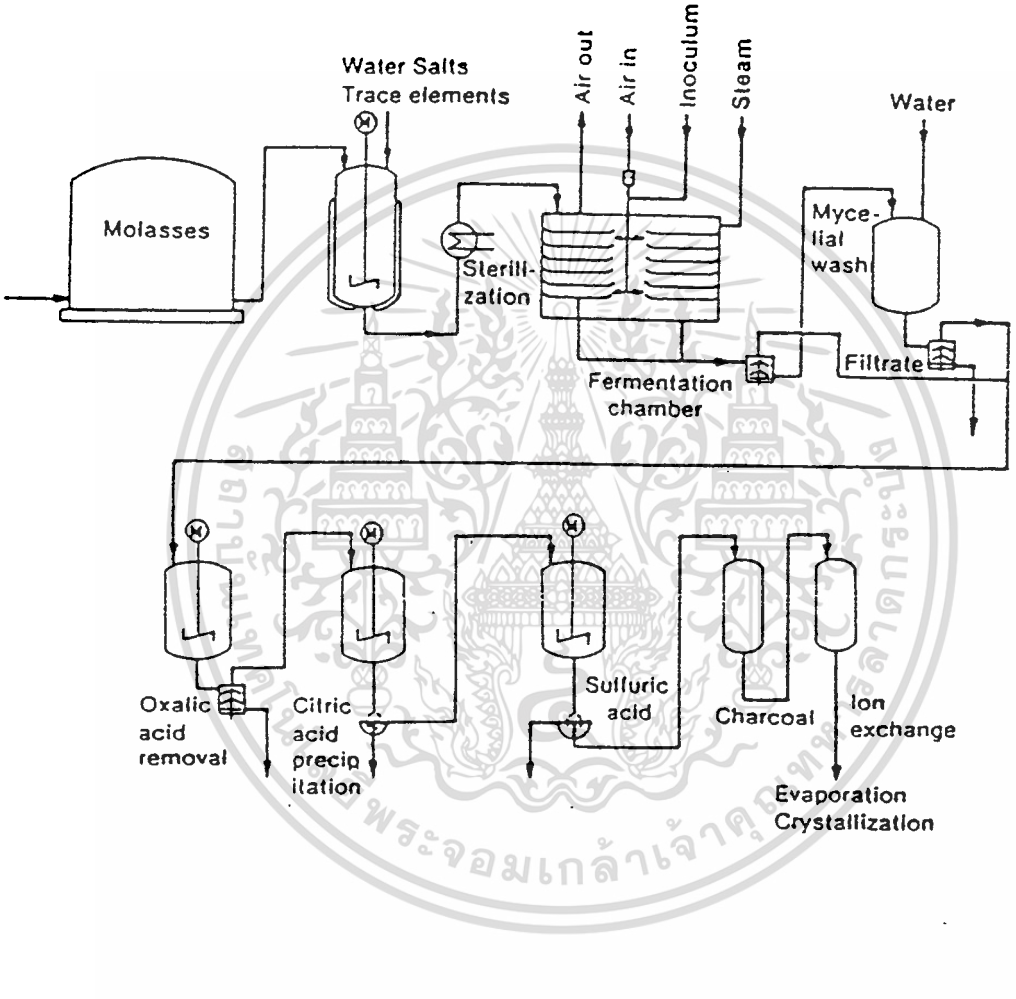
การแยกกรดซิตริกและการทำให้บริสุทธิ์(ดุษณี, 2537)

หลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุดลง กรดซิตริกที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกแยกออกโดยกรองเอาเส้นใยออกจากอาหารเหลวซึ่งในการหมักที่ผิวอาหาร สามารถกรองเอาเส้นใยออกได้ง่าย แต่การหมักในอาหารเหลวจะต้องใช้เครื่องกรองช่วย เช่น Rotary vacuum drum filter หลังจากการกรองแล้วจะได้ของเหลวซึ่งต้องนำมาแยกเอากรดซิตริกออกโดยการตกตะกอน หรือการสกัดด้วยตัวทำละลาย

การตกตะกอนเพื่อแยกเอากรดซิตริก จะใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ตกตะกอนกรดซิตริกออกมาในรูปของเกลือแคลเซียม คือแคลเซียมซิเตรต นำแคลเซียมซิเตรตที่ได้มาแยกเอากรดซิตริกโดยเติมกรดซัลฟิวริกลงไป จะได้แคลเซียมซัลเฟตและสารละลายของกรด ซึ่งสารละลายที่ได้นี้ก็คือกรดซิตริก นำสารละลายกรดซิตริกมาผ่านการฟอกสีด้วยผงถ่าน และทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้ Ion exchange resin สารละลายบริสุทธิ์ที่ได้จะนำมาระเหย จนได้ความเข้มข้น 30 – 40 องศาBaume จะได้ผลึกของกรดซิตริกที่บริสุทธิ์ ซึ่งถ้าใช้อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะได้ผลึกของกรดซิตริกในรูปปราศจากน้ำ (anhydrous) แต่ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 36.5 องศาเซลเซียส จะได้ผลึกจากกรดซิตริกที่มีน้ำปนมาด้วย 1 โมเลกุล (monohydrate)

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการแยกกรดซิตริก ตัวทำละลายหลายชนิดที่มีการจดลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการสกัดแยกกรดซิตริก ได้แก่ ไฮโดรคาร์บอนพวกออกเทน (octane) เบนซิน หรือคีโรซิน (kerosene), อีเทอร์ เช่น เอ็น (n-) หรือ ไอโซ – บิวทิลอีเทอร์ (so – butylether) เอสเตอร์ เช่น เอ็น – บิวทิวอะซิเตต (n – butylacetate), คีโตน เช่น เมทิลไอโซบิวทิลคีโตน (methyl isobutylketone), และเอมีนต่าง ๆ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

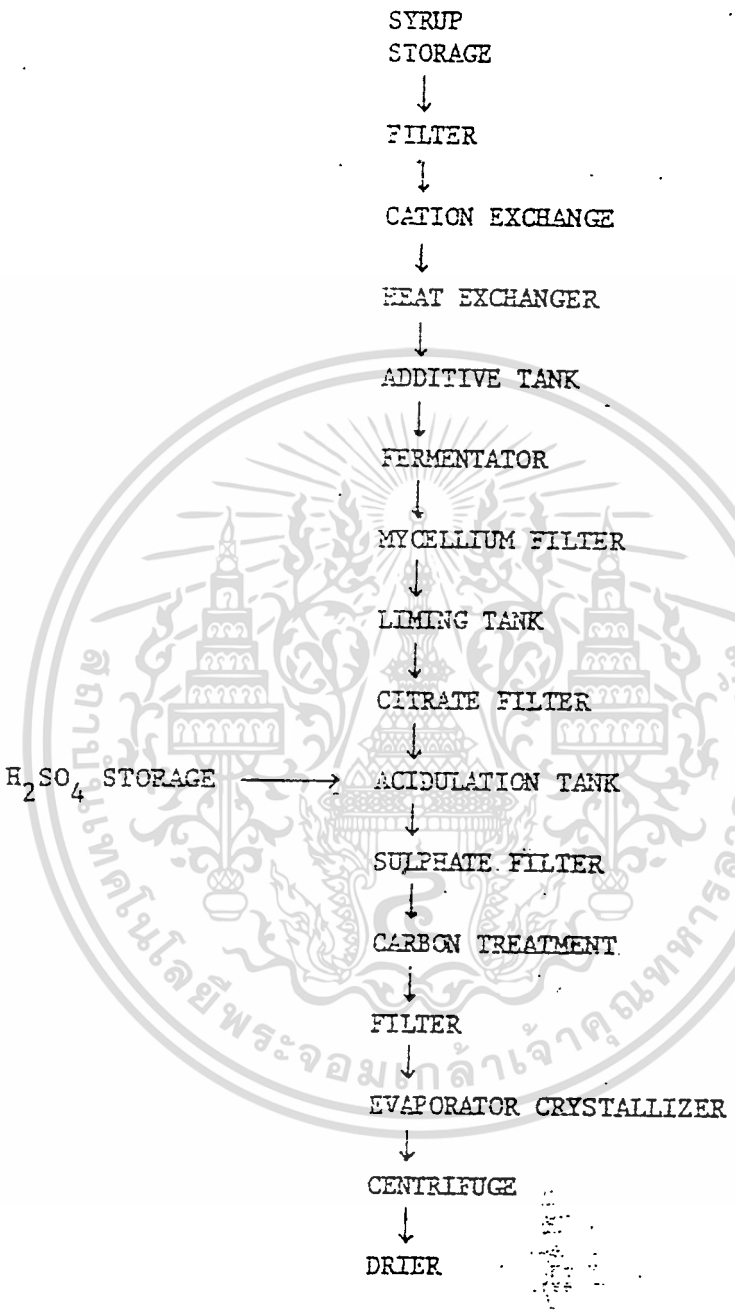


<u>รูปที่ 2 – 4</u> แผนภูมิแสดงการผลิตกรดซิตริกโดยการหมักที่ผิวอาหาร

ที่มา: Crueger และคณะ (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2 – 5 การผลิตกรดซิตริกในอาหารเหลว

ที่มา: Lockwood (1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

33529

2.7 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก

ในการผลิตกรดซิตริกจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเพื่อให้มีประสิทธิภาพและสามารถควบคุมได้ ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ ที่ควรคำนึงถึง มีดังนี้

2.7.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก (จิราภรณ์, 2525)

ควรคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติ คือ ให้ผลผลิตกรดซิตริกสูง ผลผลิตกรดมีความสม่ำเสมอ แยกกรดจากวัสดุหมักได้ง่าย และให้กรดอินทรีย์ชนิดที่ไม่ต้องการน้อย

2.7.2 สารอาหาร

สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดซิตริก สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

2.7.2.1 คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส (ดุษณี, 2537)

แหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่พบว่าสร้างกรดซิตริก สามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2 – 12 อะตอม แหล่งคาร์บอนหลายชนิดที่นำมาใช้ในการผลิตกรดซิตริก เช่น ซูโครส กากน้ำตาลจากอ้อยและหัวบีท น้ำอ้อย และแป้งจากแหล่งต่าง ๆ ซึ่งพบว่าน้ำตาลซูโครสและฟรุกโตส จะให้ผลผลิตสูงกว่ากลูโคส กากน้ำตาลจากอ้อยและกากน้ำตาลจากหัวบีทตามลำดับ แต่เมื่อมีการปรับสภาวะให้เหมาะสมก็อาจทำให้ผลผลิตสูงขึ้นได้ ผลผลิตของกรดซิตริกจะสูงสุดเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำตาลโดยทั่ว ๆ ไปอยู่ระหว่างร้อยละ 14 – 22 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณน้ำตาลสูงกว่านี้จะทำให้มีน้ำตาลเหลืออยู่หลังกระบวนการหมัก ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และถ้าปริมาณน้ำตาลต่ำจะทำให้ผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้ต่ำลง และมีการสะสมของกรดออกซาลิก

แหล่งไนโตรเจน แหล่งไนโตรเจนที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดซิตริกจะอยู่ในรูปของเกลืออนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$), แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3), โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$), โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) และยูเรีย เป็นต้น ซึ่งความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้มีผลต่อการสร้างกรดซิตริกของจุลินทรีย์ ถ้าใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อราคินเวลานาน ในขณะที่ถ้าใช้แอมโมเนียมไนเตรตจะทำให้ระยะดังกล่าวกินเวลาน้อย อย่างไรก็ตามถ้าใช้แอมโมเนียมไนเตรตที่ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 0.25 ก็จะก่อให้เกิดการสะสมของกรดออกซาลิกขึ้นอีก มีรายงานว่า เมื่อใช้โซเดียมไนเตรตและโพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้ผลในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *A. niger* ได้สูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรต ซึ่งพบว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรตในระดับความเข้มข้นเพียงร้อยละ 0.4 ก็ให้ผลผลิตของกรดซิตริกสูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตแล้ว การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนควรพิจารณาถึงความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้นั้นอีกด้วย ทั้งนี้เพราะถ้าความเข้มข้นของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้สูงเกินไป จะทำให้ระยะการเจริญเติบโตกินเวลานาน และทำให้ขั้นตอนของการผลิตเกิดขึ้นได้ช้าตามไปด้วย ในการเติมแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องเติมลงไปในระหว่างการหมักช่วงที่การผลิตกรดซิตริกเริ่มลดลงจึงจะให้ผลดี ซึ่งความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้จะอยู่ระหว่าง 0.3 – 1.5 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมนี้จะต้องขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และกระบวนการหมักที่ใช้เป็นสำคัญ

แหล่งฟอสเฟต นอกเหนือจากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแล้ว แหล่งฟอสเฟตก็มีความจำเป็นต่อการเจริญของรา มีรายงานว่า การผลิตกรดซิตริกจะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อราเกิดการสะสมของสารประกอบฟอสฟอรัสในปริมาณที่มากเพียงพอแล้ว อย่างไรก็ตามปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลต่อปริมาณกรดซิตริกที่ถูกสร้างขึ้นมาก ถ้าฟอสเฟตมีความเข้มข้นสูงจะทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อราเกิดขึ้นได้ดี ในขณะเดียวกันก็จะทำให้การผลิตกรดซิตริกลดต่ำลง ปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงร้อยละ 0.1 – 0.2

2.7.2.2 แร่ธาตุ (ดุษณี, 2537, จิราภรณ์, 2525)

แร่ธาตุหลายชนิดที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา แร่ธาตุเหล่านี้ ได้แก่ เหล็ก ทองแดง สังกะสี แมงกานีส แมกนีเซียม โมลิบดินัม เป็นต้น ซึ่งความเข้มข้นของแร่ธาตุต่าง ๆ จะมีผลต่อการผลิตกรดซิตริก

แมกนีเซียม จะมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาเอนไซม์หลายชนิดภายในเซลล์ รวมทั้งส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิตริกของเชื้อราด้วย ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมเพื่อผลิตกรดซิตริกให้ได้สูงสุดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.02 – 0.025

เหล็กและสังกะสี จะเป็นแร่ธาตุที่สำคัญ ซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของการหมัก โดยทั่วไปแล้วควรใช้ความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านี้ในปริมาณต่ำจึงจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริก แต่ถ้าความเข้มข้นสูงจะทำให้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตยืดยาวออกไป สำหรับความเข้มข้นที่เหมาะสมของเหล็กที่เหมาะต่อการผลิตกรดซิตริกจะอยู่ระหว่าง 0.05 – 0.5 พีพีเอ็ม ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้นจะแตกต่างกันไปแล้วแต่สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิต ส่วนสังกะสีนั้นเป็นแร่ธาตุที่สำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริกด้วยเช่นกัน

แร่ธาตุชนิดอื่น ๆ เช่น แมงกานีส แบเรียม อลูมิเนียม จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อรา และการผลิตกรดซิตริก เมื่อใช้ในความเข้มข้นที่ไปยับยั้งการเจริญ และจากการศึกษาพบว่าแมงกานีสมีผลสำคัญต่อการผลิตกรดซิตริก โดยพบว่าการใช้แมงกานีสในปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อลิตรจะทำให้ผลผลิตของกรดซิตริกลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3 พีเอช (ดุษณี, 2537, จิราภรณ์, 2525)

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดซิตริก โดยทั่ว ๆ ไปค่าพีเอชเริ่มต้นที่ต่ำกว่า 3 จะช่วยให้การผลิตกรดซิตริกให้ผลดี การปรับพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในระดับต่ำ (ความเป็นกรดสูง) นี้ ก่อให้เกิดผลดี คือ ช่วยในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ช่วยยับยั้งการสร้างและสะสมกรดออกซาลิก อีกทั้งเป็นการช่วยทำให้กระบวนการฆ่าเชื้อที่ใช้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นอีกด้วย ซึ่งในการปรับพีเอชนั้นจะใช้กรดอนินทรีย์ เช่น กรดเกลือ หรือกรดซัลฟิวริก หรือการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์

2.7.4 การควบคุมสภาพการหมัก (ดุษณี, 2537)

ในระหว่างการหมักจำเป็นจะต้องควบคุมปัจจัยที่สำคัญหลายอย่างเช่น การให้อากาศ การกวน อุณหภูมิ เวลาในการหมัก และกรรมวิธีที่ใช้ในการหมัก เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด

การให้อากาศและการกวน ในการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกจัดเป็นการหมักในสภาพที่มีอากาศ (Aerobic fermentation) เชื้อที่ใช้ผลิตกรดซิตริกมีความต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญ ดังนั้นในกระบวนการหมักจึงต้องมีการให้อากาศและมีออกซิเจนเพียงพอ ในกระบวนการหมักแบบ submerged ปริมาณออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น มีผลในการทำให้เกิดการปล่อย (excretion) กรดซิตริกจากเส้นใยสู่น้ำหมักเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเชื้อราที่อยู่ในช่วงที่ผลิตกรดจะมีความต้องการออกซิเจนมากกว่า เชื้อราที่อยู่ในช่วงอัตราการเจริญสูง ได้มีการทดลองผลิตกรดซิตริกในสภาพ submerged culture พบว่าปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม คือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารต่อนาที

อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้และสภาวะอื่น ๆ ของขบวนการหมัก ซึ่งโดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะต่อการผลิตดกรดซิตริกจะอยู่ระหว่าง 25 – 30 องศาเซลเซียส ซึ่งถ้าหากอุณหภูมิสูงกว่านี้จะมีผลทำให้ปริมาณกรดซิตริกลดลงและจะมีการสะสมกรดออกซาลิกแทน

เวลาที่ใช้ในการหมักและกรรมวิธีที่ใช้ในการหมัก เพื่อให้ได้กรดซิตริกสูงสุดจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ เช่น การหมักที่ผิวอาหารกระบวนการหมักจะสิ้นสุดลงภายใน 7 –10 วัน ในขณะที่การหมักในอาหารเหลวนั้น จะใช้เวลาเพียง 4 – 5 วัน ส่วนการหมักในอาหารแข็งจะใช้เวลา 6 – 7 วัน

7.5 สารเติมแต่งและตัวกระตุ้น (ดุษณี, 2537)

ได้มีการทดลองใช้ตัวกระตุ้นหลายชนิด เพื่อปรับปรุงผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้จากเชื้อ *A. niger* ตัวกระตุ้นที่สำคัญและใช้กันมากที่สุดคือ เมทานอล ซึ่งนอกจากจะช่วยกำจัดพวกโลหะที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริกแล้วยังช่วยเพิ่มผลผลิตอีกด้วย โดยจะส่งผลดีต่อความสามารถของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารในการผ่านเข้า-ออกเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา จึงทำให้การปลดปล่อยกรดซิตริกออกมาจากเส้นใยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น เมทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 – 4 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และเพิ่มผลผลิตของกรดซิตริกได้ โดยจะเติมลงไปในอาหารก่อนการใส่เชื้อ ถ้าเติมหลังใส่เชื้อแล้ว 24 ชั่วโมงจะไม่มีผล นอกจากเมทานอลและแอลกอฮอล์อื่น ๆ เช่น เอทานอล ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ หรือเมทิลอะซิเตตในปริมาณร้อยละ 1 – 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ก็ให้ผลต่อการผลิตกรดซิตริกเช่นเดียวกับเมทานอล

สารเคมีอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นาฟโทควิโนน (Naphthoquinone) เมทิลิน บลู หรือกลีเซอรอล เมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยกระตุ้นการสร้างกรดซิตริกเช่นกัน

สารกำจัดฟองที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ออกตาเดคานอล (Octadecanol) silicone oil นอกจากจะช่วยควบคุมการเกิดฟองแล้ว ยังช่วยเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกอีกด้วย นอกจากนั้นส่วนประกอบอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ในการเพิ่มผลผลิตของกรดซิตริก ได้แก่ แป้ง ใยราที่ย่อยแล้ว (Mycelial digest) เบเกอร์ยีสต์ รำข้าว เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. <u>จุลินทรีย์</u>

1.1 *Aspergillus niger* TISTR 3089

1.2 *Candida tropicalis* TISTR 5023

1.3 *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

2. <u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

2.1 อาหารสูตร Sabouraud dextrose broth (SDB)

2.2 อาหารสูตร Potato dextrose agar

2.3 อาหารสูตร YM

2.4 น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ใช้น้ำส่วนที่ได้จากการบีบเมล็ดโกโก้สด

3. <u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

3.1 เครื่องมือพื้นฐานทางชีววิทยา

3.2 เครื่องคั้นน้ำแบบบีบอัด

3.3 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

3.4 เครื่องชั่งชนิด 4 ตำแหน่ง

3.5 เครื่องกรองโดยใช้ความดัน

3.6 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์(Spectrophotometer)

3.7 เครื่องย่อย(Digestibility)

3.8 เครื่องกลั่น(Distillator)

3.9 เครื่องควบแน่น(Condenser)

3.10 เครื่องระเหย(Evaporator)

3.11 เครื่องหมุนเหวี่ยง(Centrifuge)

3.12 เครื่องเขย่า(Shaker)

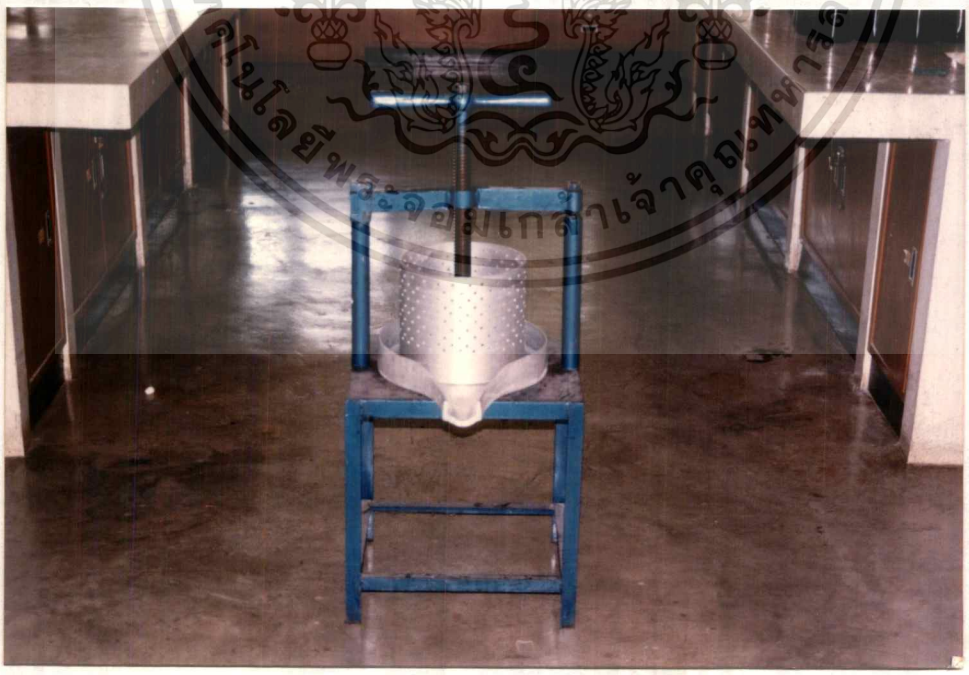
3.13 เครื่องอบสารร้อน(Hot air oven)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.14 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ(Autoclave)

3.15 เดซิกเคเตอร์ (Desiccator)

รูปที่ 3 – 1 น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้



รูปที่ 3 – 2 เครื่องคั้นน้ำแบบบีบอัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วิธีการทดลอง

4.1 การศึกษาและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

นำผลโกโก้มาคัดเลือกผลเน่าออก ชั่งน้ำหนัก ล้างทำความสะอาด จากนั้นผ่าผลโกโก้ แยกเอาเมล็ดออกจากเปลือก นำเมล็ดที่ได้ใส่ถุงตาข่ายพลาสติก เข้าเครื่องคั้นน้ำ เพื่อแยกเอาของเหลวออกจากเมล็ดโกโก้ นำน้ำส่วนที่ได้ไปกรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนที่ไม่ต้องการออก นำน้ำสกัดที่ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการผลิตกรดซิตริก อีกส่วนหนึ่งนำมาศึกษาและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด – ด่าง, COD , ไนโตรเจนทั้งหมด , ปริมาณโปรตีน , ของแข็งแขวนลอย (Suspended solid) , ของแข็งทั้งหมด (Total solid) , ตามวิธีของ APHA , AWWA and WPCF (1985) รวมทั้งน้ำตาลรีดิวซ์ , ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณกรดซิตริกเริ่มต้น

4.2 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

วางแบบแผนการทดลองปัจจัยเดียว โดยใช้ Complete Randomized Design (CRD) และ Student – Newman – Keuls test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ใน Sigma Statistical Software โดย Jandel Corporation

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น โดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้มีอายุ 24 – 48 ชั่วโมง ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 1 นอร์มอล นำไปฆ่าเชื้อ แล้วเติมจุลินทรีย์เริ่มต้น ขวดละ 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 2 , 3 , 6 , 9 และ 12 ทำการวิเคราะห์กรดซิตริก แล้วทำการเปรียบเทียบปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากจุลินทรีย์แต่ละชนิด

4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

4.3.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอน

ทำการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น โดยเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ให้มีอายุ 24 – 48 ชั่วโมง ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25, 50 , 75 และ 100 เจือจางโดยใช้น้ำกลั่นใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 1 นอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มอล นำไปฆ่าเชื้อ แล้วเติมเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นขวดละ 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 - 20 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 2 , 3 , 6 , 9 และ 12 ทำการวิเคราะห์หากรดซิตริก

4.3.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจน

โดยใช้เปปโตนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.3 , 0.5 และ 0.7 ยีสต์สกัดที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.2 , 0.4 และ 0.5 และแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.0 , 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่พบว่ามีการผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 4.3.1

4.3.3 ศึกษาอุณหภูมิ

ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้และแหล่งไนโตรเจนที่พบว่ามีการผลิตกรดซิตริกสูงสุด เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 4.3.1

4.4 <u>การวิเคราะห์กรดซิตริก</u> (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1990)

4.4.1 เก็บตัวอย่างครั้ง 5 มิลลิลิตร นำมากรองเอาตัวเซลล์ออก

4.4.2 นำตัวอย่างน้ำหมักที่กรองเซลล์ออกแล้ว 1 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4.4.3 ไตเตรตตัวอย่างน้ำหมักกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล หาจุดยุติ โดยใช้พีเอชมิเตอร์วัดพีเอชให้ได้ 8.5

4.4.4 คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริกจากสูตร

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก (ร้อยละ *)} = \frac{\text{ปริมาตรไตเตรต} \times N \times 64 \times 100}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่างน้ำหมัก} \times 100}$$

* หน่วยเป็นร้อยละ (มวลต่อปริมาตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปราย

1. ผลการศึกษาและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

ลักษณะของน้ำสกัดที่ได้จะมีสีขาวขุ่น มีความหนืด มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ มีรสเปรี้ยวอมหวานเล็กน้อย เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่า มีพีเอชค่อนข้างเป็นกรด คือประมาณ 3.6 มีปริมาณไนโตรเจนอยู่ด้วย ปริมาณของของแข็งแขวนลอยและของแข็งทั้งหมดค่อนข้างสูง ปริมาณซีโอดีสูงมาก ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 - 1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

พารามิเตอร์	ความเข้มข้น
พีเอช	3.6
ซีโอดี	4.6×10^6 มิลลิกรัมต่อลิตร
ไนโตรเจน	0.0611 (ร้อยละ)
โปรตีน	0.382 (ร้อยละ)
ของแข็งทั้งหมด	8.11 มิลลิกรัมต่อลิตร
ของแข็งแขวนลอย	2.27 มิลลิกรัมต่อลิตร
น้ำตาลรีดิวซ์	0.85 (ร้อยละ)
ปริมาณกรดทั้งหมด	1.11 (ร้อยละ)
กรดซิตริกเริ่มต้น	0.301 (ร้อยละ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

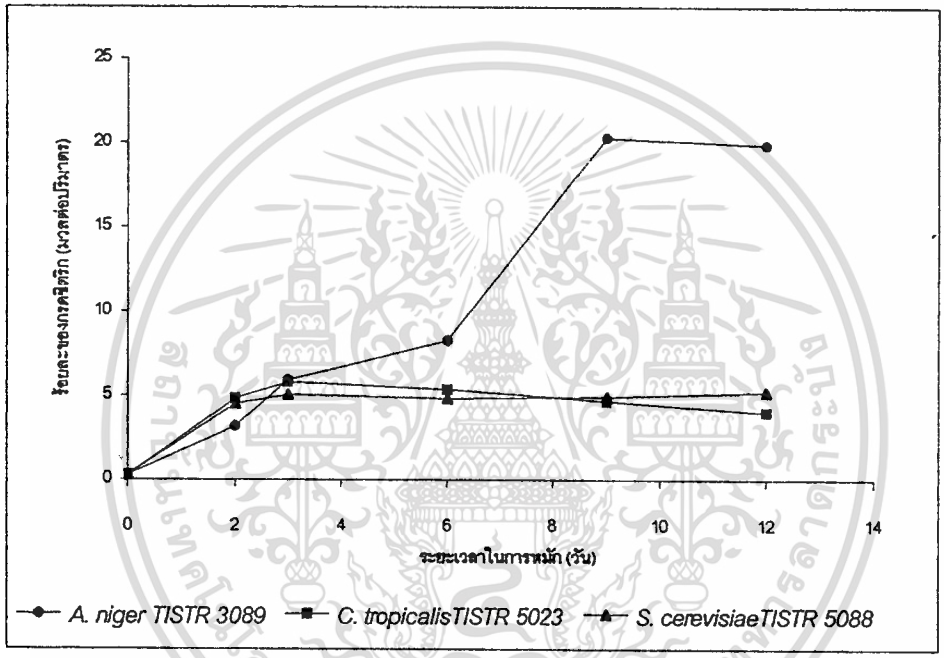
2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก จากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

การศึกษาเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ จะคัดเลือกจากจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus niger* TISTR 3089, *Candida tropicalis* TISTR 5023 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เนื่องจากทั้ง 3 สายพันธ์สามารถผลิตกรดซิตริกได้ ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ มีปริมาณกรดซิตริกเริ่มต้นร้อยละ 0.031 เมื่อเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นเวลา 12 วัน พีเอชของน้ำหมักจะลดลงซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการผลิตกรดอินทรีย์ในน้ำหมักเพิ่มขึ้นและจากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณต่าง ๆ กัน โดยจะผลิตได้ประมาณร้อยละ 3 – 8 ภายใน 6 วัน (แสดงดังรูปที่ 4 – 1) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (แสดงดังตารางภาคผนวกที่ ค – 1) ในวันที่ 9 และ 12 นั้น เชื้อ *A. niger* TISTR 3089 สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงขึ้นมากจนมีความแตกต่างทางสถิติจากวันที่ 6 และจะสูงที่สุดในวันที่ 9 ซึ่งมีปริมาณกรดซิตริกถึงร้อยละ 20.309 และในวันที่ 12 กรดซิตริกจะลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5023 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 นั้นจะผลิตกรดซิตริกไม่มากนักคือ ประมาณร้อยละ 4 – 5 ซึ่งจะใกล้เคียงกับในช่วง 6 วันแรก เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริกระหว่างจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ พบว่า *A. niger* TISTR 3089 ผลิตกรดซิตริกได้สูงกว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์อย่างมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งโดยทั่วไปในระดับอุตสาหกรรมมักใช้ *A. niger* เป็นจุลินทรีย์หลักในการผลิตกรดซิตริก (Somsak, 1994) ดังนั้นจึงเลือกเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 เพื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกต่อไป

3. การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก จากจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

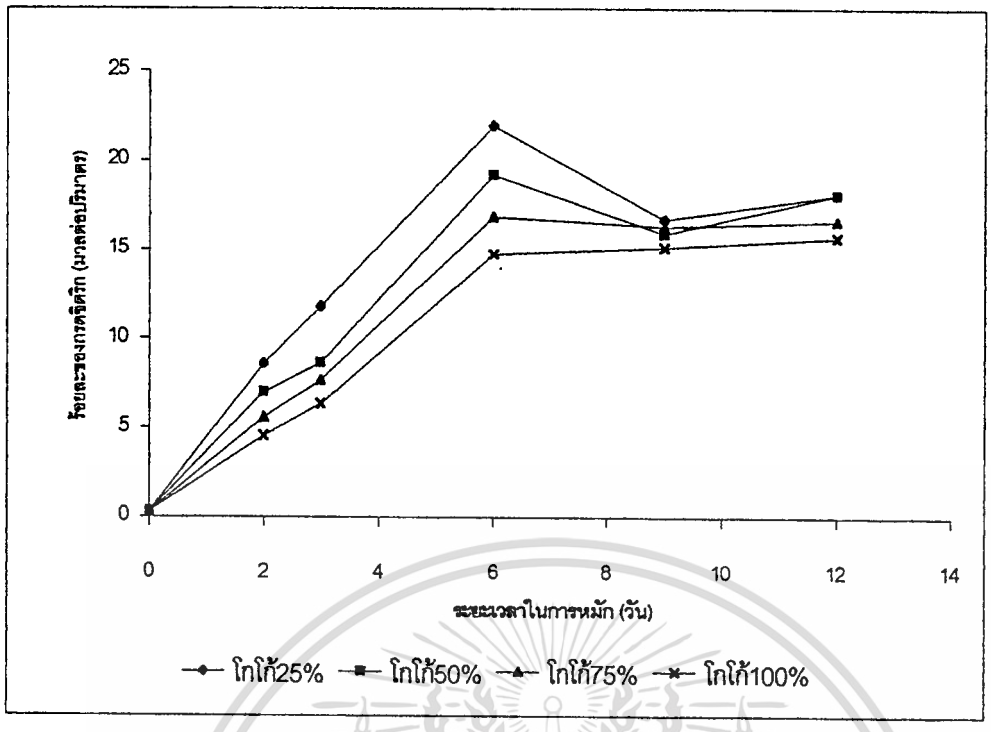
การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25, 50, 75 และ 100 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เชื้อ *A. niger* TISTR 3089 สามารถผลิตกรดซิตริกที่ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ต่าง ๆ ได้แตกต่างกัน (แสดงดังรูปที่ 4 – 2) โดยสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงที่สุดในวันที่ 6 ที่ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 และ 50 จะให้กรดซิตริกได้สูงถึงร้อยละ 21.973 และ 19.179 ตามลำดับ ซึ่งจะมีความแตกต่างทางสถิติกับเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 75 และ 100 (แสดงดังตารางภาคผนวก ค – 2) ซึ่งการทดลองของ El –Sharkawy และคณะ (1995) พบว่าเชื้อ *A. niger* ATCC 10581 สามารถผลิตกรดซิตริกจาก

น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50 ได้ร้อยละ 14.9 และที่ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 นั้น เชื้อ *Candida lipolytica* ATCC 8661 สามารถกรดซิตริกได้ร้อยละ 22.4 ในช่วงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ คือวันที่ 9 – 12 นั้น ปริมาณกรดซิตริกจะลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในวันที่ 6 เมื่อสังเกตถึงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้นั้น พบว่าความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ร้อยละ 25 นั้น สามารถให้กรดซิตริกสูงที่สุด จึงเลือกใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกต่อไป



<u>รูปที่ 4 – 1</u> ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 – 2 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 โดยมีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่างกัน ที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ในการผลิตกรดซิตริกจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 และใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเล็ดโกโก้ร้อยละ 25 นั้น แหล่งไนโตรเจนที่นำมาศึกษา คือ ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2, 0.4 และ 0.6 เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.5 และ 0.7 และแอมโมเนียมไนเตรตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 1.5 และ 2.0 โดยแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดจะถูกเติมลงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 และทำการเปรียบเทียบกับน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีผลการทดลองดังนี้

4.1 ยีสต์สกัด

เมื่อใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น พบว่าเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 จะผลิตกรดซิตริกได้สูงที่สุดในวันที่ 3 ซึ่งที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัดร้อยละ 0.2 จะผลิตได้ถึงร้อยละ 14.521 ในขณะที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 และ 0.6 จะผลิตได้ร้อยละ 10.283 และ 5.931 ตามลำดับ (แสดงดังรูปที่ 4 – 3) ในช่วงวันที่ 6 – 12 ซึ่งเป็นช่วงหลังของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าปริมาณกรดซิตริกจะลดลงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ไม่ใส่แหล่ง

ไนโตรเจน พบว่า การผลิตกรดซิตริกจะสูงที่สุดในวันที่ 6 คือร้อยละ 15.723 ซึ่งไม่แตกต่างจากปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการผลิตในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ใส่ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (แสดงดังตารางภาคผนวก ค – 3)

4.2 เปปโตน

เมื่อใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น พบว่า เชื้อ *A. niger* TISTR 3089 จะผลิตกรดซิตริกได้สูงที่สุดที่ความเข้มข้นของปปโตนร้อยละ 0.3 โดยในวันที่ 6 จะสามารถผลิตได้ถึงร้อยละ 13.675 สำหรับที่ความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 0.5 และ 0.7 จะผลิตกรดซิตริกได้สูงที่สุดในวันที่ 3 คือร้อยละ 13.077 และ 12.032 ตามลำดับ (แสดงดังรูปที่ 4 – 3) ในช่วงหลังของการหมักจะพบว่าปริมาณกรดซิตริกจะลดลงไปมาก โดยเฉพาะวันที่ 12 ที่ความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 0.3, 0.5 และ 0.7 จะมีปริมาณกรดซิตริกเหลือเพียงร้อยละ 6.251, 4.703 และ 3.989 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจนในวันที่ 6 กับที่ความเข้มข้นของเปปโตนที่ให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดนั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (แสดงดังตารางภาคผนวก ค – 4)

4.3 แอมโมเนียมไนเตรต

เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดซิตริก โดยเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 นั้น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่แอมโมเนียมไนเตรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะมีปริมาณกรดซิตริกสูงในปริมาณใกล้เคียงกัน คือประมาณร้อยละ 14 – 16 (แสดงดังรูปที่ 4 – 5) วันที่มีการผลิตกรดซิตริกสูง คือในช่วง 6 – 12 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (แสดงดังตารางภาคผนวก ค – 5)และเมื่อเปรียบเทียบน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจนกับที่ใส่แอมโมเนียมไนเตรต จะพบว่าน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจนจะมีปริมาณกรดซิตริกน้อยกว่าเล็กน้อย และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อให้ยีสต์สกัด และเปปโตนที่มีความเข้มข้นมากขึ้น การผลิตกรดซิตริกจะลดลง เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตกรดซิตริก โดยทำให้การผลิตกรดซิตริกดีขึ้น ถ้าแหล่งไนโตรเจนมากเกินไปจะกระตุ้นให้การงอกของสปอร์ ทำให้มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้การผลิตกรดซิตริกลดลง แต่ถ้าแหล่งไนโตรเจนน้อยเกินไปก็จะไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต มีการทดลองพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ คือเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (El – Sharkawy, 1995) แต่การทดลองของ Xu และคณะ (1989) ยืนยันว่าแอมโมเนียมไนเตรต หรือแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีในการผลิตกรดซิตริกโดยใช้ *A. niger* แต่เนื่องจากในการทดลองพบว่าน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจน จะสามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

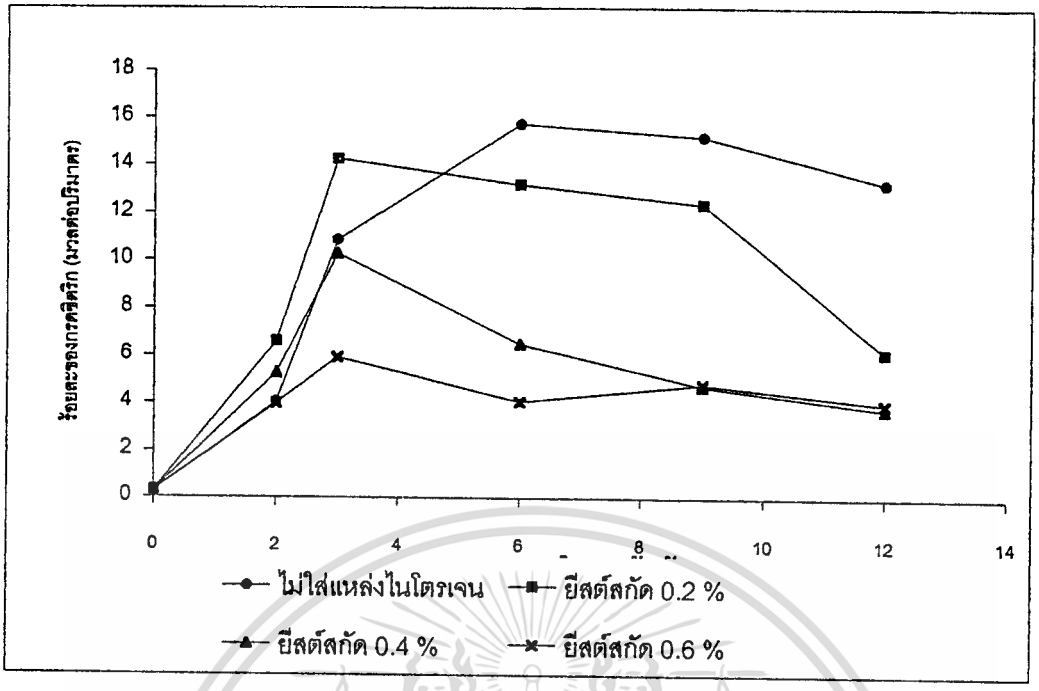
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับที่ใส่แหล่งไนโตรเจน ดังนั้น จึงเลือกใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 เพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกต่อไป

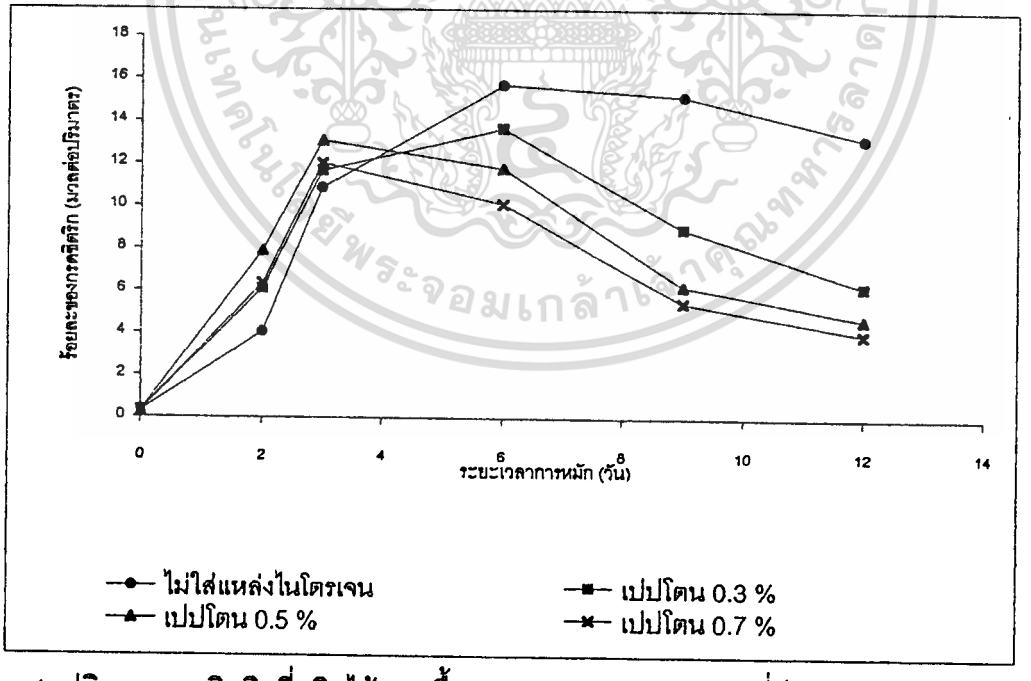
5. <u>การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการผลิตกรดซิตริกจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือก</u>

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ*A. niger* TISTR 3089 โดยใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจนเป็นอาหารในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใช้อุณหภูมิต่างๆ คือ ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 สามารถผลิตกรดซิตริกได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงถึงร้อยละ 18.064 ในวันที่ 9 และมีปริมาณกรดซิตริกลดลงเล็กน้อยในวันที่ 12 สำหรับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การผลิตกรดซิตริกจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และจะสูงสุดในวันที่ 12 คือร้อยละ 16.235 (แสดงดังรูปที่ 4 – 6) แต่ในช่วง 9 วันแรกของการหมักจะให้กรดซิตริกในปริมาณน้อยกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (แสดงดังตารางภาคผนวก ค – 6) ส่วนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การผลิตกรดซิตริกจะมีปริมาณน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน ซึ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณกรดซิตริกได้สูงสุดในวันที่ 6 คือร้อยละ 12.608 การทดลองนี้จะสอดคล้องกับ El – Sharkawy และคณะ (1995) ที่พบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก เช่นกัน และโดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกจะอยู่ระหว่าง 25 และ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งถ้าหากอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียสจะมีผลทำให้ปริมาณกรดซิตริกลดลง และเกิดการสะสมของกรดออกซาลิกแทน (ดุษณี, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

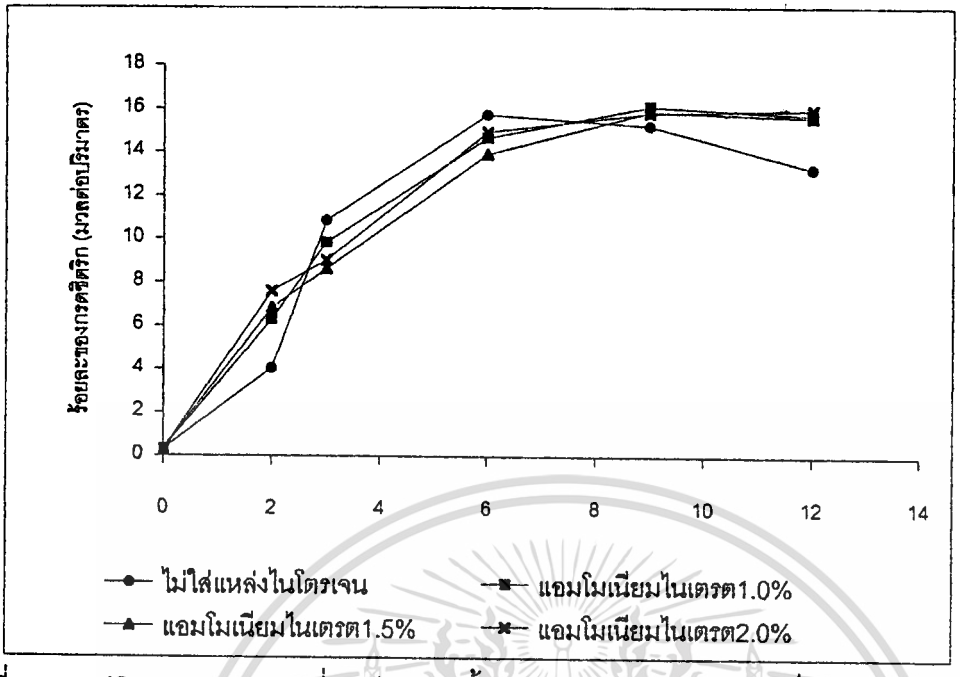


<u>รูปที่ 4 – 3</u> ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ*A. niger* TISTR 3089 ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 25 พีเอช 6.5 และมีความเข้มข้นของยีสต์สกัดต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

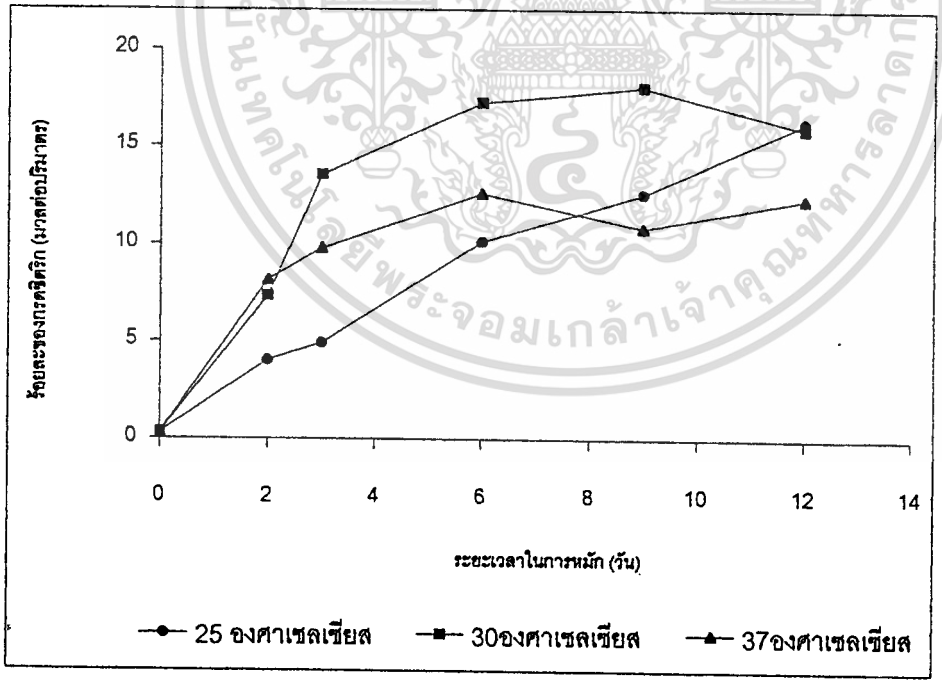


<u>รูปที่ 4 – 4</u> ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ*A. niger* TISTR 3089 ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 25 พีเอช 6.5 และมีความเข้มข้นของเปปโตน ต่างกัน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 – 5 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ*A. niger* TISTR 3089 ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 25 พีเอช 6.5 และมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4 – 6 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ*A. niger* TISTR 3089 ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 25ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจน พีเอช 6.5 โดยใช้อุณหภูมิต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่าลักษณะของเหลวที่สกัดได้จะมีสีขาวขุ่น หนืดเล็กน้อย มีรสเปรี้ยวอมหวาน มีกลิ่นหอมอ่อนๆ น้ำสกัดที่ได้มีความเป็นกรดโดยมีพีเอชประมาณ 3.6 ค่าซีโอดี 4×10^6 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 0.0611 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.382 ปริมาณของแข็งทั้งหมด 8.11 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งแขวนลอย 2.27 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.85 ปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 1.11 และปริมาณกรดซิตริกเริ่มต้น 0.301 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมคือ *Aspergillus niger* TISTR 3089 สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณสูงกว่า *Candida tropicalis* TISTR 5023 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับสภาวะในการผลิตกรดซิตริกนี้ พบว่าการใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 สามารถให้ปริมาณกรดซิตริกสูงกว่าร้อยละ 50, 75 และ 100 ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ใช้พบว่าแอมโมเนียมไนเตรตจะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงกว่าเปปโตนและยีสต์สกัด อย่างไรก็ตามปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตกับที่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจนจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นจึงเลือกที่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจนไปทำการศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการลดต้นทุนของการผลิต และพบว่าการผลิตกรดซิตริกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสามารถให้ปริมาณกรดสูงที่สุด โดยการผลิตกรดซิตริกจะผลิตได้ดีในช่วงวันที่ 6 - 12 และเมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแล้วพบว่าในช่วงวันดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1. ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ในช่วงวันที่ 6 – 12 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงควรลดระยะเวลาของการหมักให้เหลือเพียง 6 วัน เพื่อเป็นการประหยัดเวลาและลดต้นทุนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. หากต้องการผลิตกรดซิตริกให้ได้ในปริมาณสูงขึ้น ควรมีการศึกษาถึงพีเอชเริ่มต้นการให้อากาศ และแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม

3. ควรมีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจน ในระหว่างการผลิตกรดซิตริก

4. ควรมีการศึกษาถึงวิธีการเก็บเกี่ยวและความบริสุทธิ์ของกรดซิตริกที่ผลิตได้

5. เนื่องจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีปริมาณสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงสามารถนำน้ำสกัดเยื่อออหุ้มเมล็ดโกโก้ไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้เช่น ไวน์ มวลชีวภาพ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิระนันท์ เหมพูลเสริฐ. 2533. การนำวัสดุเหลือทิ้งและวัตถุดิบราคาถูกบางชนิดมาผลิตเป็นกรดมะนาวโดยใช้เชื้อ *Candida lipolytica*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยมหิดล.

จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒนะ. 2525. การผลิตกรดซิตริกจากกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ*Aspergillus niger* . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชัยวัฒน์ บรรไดเพ็ชร. 2536. การผลิตกรดมะนาวโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ครั้งที่ 2, คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 11-1 - 11-14

ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร, ศรี ปียะพงษ์, เชิญ ด่าวดัก, โกวิท ยันตศาสตร์, เกรียงศักดิ์ ศิริพงษา – โรจน์ และสุมาลัย ศรีกำไลทอง. 2529. เกษตรและอุตสาหกรรมโกโก้. สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ.

ผานิต งานกรณาธิการ. 2532. พันธุ์โกโก้, เอกสารประกอบการประชุมเรื่องโกโก้กับการพัฒนาอุตสาหกรรม, 31 มกราคม ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ.

ผานิต งานกรณาธิการ และวิทย์ สุวรรณวุธ. 2531. บทบาทของโกโก้ในทศวรรษหน้า, เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องพืชเศรษฐกิจยืนต้น, 23 – 25 พฤศจิกายน 2531. กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ ฯ

วรพจน์ สุนทรสุข. 2533. การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อผลิตกรดมะนาวและเอนไซม์กลูโคอะไมเลส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมศักดิ์ วรรณศิริ 2532 สวนโกโก้. ศูนย์ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท, กรุงเทพฯ.

Adam, M.R., Dougan. J., Glossop, E.J. and Twiddy, D.R., 1982. Cocoa sweating and effluent of potential value, Agri. Wastes. 4: 255 – 9p.

A.O.A.C. 1984. Official method of analysis of the association of analytical chemist. 14th ed. Association of official analytical chemist , USA.

A.O.A.C. 1990. Official method of analysis of the association of analytical chemist. 14th ed. Association of official analytical chemist , USA.

APHA, AWWA, and WEF. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. American public health association, Inc., New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Atsushi, S., Somsak, S., Kohtaro,K. and Shoji, U. 1996. Direct production of citric acid from starch by 2 – deoxyglucose – resistant mutant strain of *Aspergillus niger*. J. Fermentation and Bioengineering. 81: 320 – 323.

Bilgrami, K.S. and Verma, R.N. 1978. Physiology of fungi. Vikas publishing house PVT LTD, New Delhi.

Cochrane, W.V. 1958. Physiology of fungi. John Wiley and sons, Inc.,New York and London.

Crueger, W. and Crueger, A. 1990. Biotechnology. A Textbook of Industrial Microbiology, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

Dittmar, E.k. 1956. A composicao da polpa diferents variedades de cacau da Bahai. Instituto de Technologia da Bahia. Boletim 14. 9 p.

El-Sharkawy, S.H., Abdul Karim, M.I. and Yin, W.S. 1995. Production of citric acid from Cocoa juice waste. ASEAN Food. J. 10 : 112 - 114.

Hang, Y.D. and Woodams, E.E. 1989. A process for leaching citric acid from apple Pomace fermented with Aspergillus niger in solid-state culture. MIRCEN. J. 5: 379 - 382.

Lockwood, L.B. 1975. Organic acid production. In the Filamentous Fungi, Vol 1, pp. 140 – 157. Edited by J.E. Smith and D.R. Berry. Edward Arnold, London.

Milsom, P.E. and Meers, J.L. 1985. Citric acid. In Comprehensive Biotechnology, Vol 3, pp. 665 – 680. Edited by M. Moo – Young. Pergamon press, Oxford.

Rohr, M., Kubicek , C.P. and Kominek, J. 1983. Citric acid. In Biotechnology, Vol 3, pp. 419 – 454. Edited by H. – J. Rehm and G. Reed. Verlag Chemie, Weinheim.

Somsak, S., Satoshi, M., Kohtaro, K. and Shoji, U. 1994. Formation of autodiploid strains in *Aspergillus niger* and their application to citric acid production from starch. J. Fermentation and Bioengineering. 77: 474 – 478.

Xu, D-B., Kubicek, C. P. & Rohr, M., A comparison of factors influencing citric acid production by *Aspergillus niger* grown in submerged culture and on filter paper. *Applied microbiology and Biotechnology*, 30 (1989) 444 – 9.

Wood, G.J.B. and Lass, R.A. 1985. Cocoa, 4th ed., Tropical Agriculture Series. Longman, New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

1. Plate count agar (Tryptone glucose yeast extract agar)

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	2.5 กรัม
Glucose	1 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

2. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่งปอกเปลือกและหั่น	200 กรัม
Glucose	20 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

1. ต้มมันฝรั่งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
2. กรองเอาน้ำใส เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร
3. เติม glucose และ agar และต้มให้ละลาย
4. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. Yeast malt agar (YM agar)

Yeast extract	3 กรัม
Malt extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Dextrose	10 กรัม
Agar	20 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

pH 6.2 $\pm$ 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Yeast malt broth (YM broth)

Yeast extract	3 กรัม
Malt extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Dextrose	10 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

pH 6.2 $\pm$ 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

5. Sabouraud dextrose broth

Dextrose	20 กรัม
Peptone	10 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

<u>การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีLuff – Schoorl method</u>

● สารเคมี ●

- anhydrous sodium carbonate
- citric acid monohydrate
- copper (II) sulphate pentahydrate
- zinc acetate dihydrate
- acetic acid
- potassium ferrocyanide trihydrate
- potassium solution 30 % w / v
- sulphuric acid solution (3 M)
- isopentanol
- sodium thiosulphate solution (0.1 M)

● การเตรียมสารละลาย Carrez I ●

เตรียมโดยละลายกรดแอซิติก 3 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณเล็กน้อย แล้วเติมสาร zinc acetate dihydrate ปริมาณ 2.19 กรัมลงไปละลาย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

● การเตรียมสารละลาย Carrez II ●

เตรียมโดยทำการละลาย potassium ferrocyanide trihydrate ปริมาณ 10.6 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

● การเตรียม Luff – Schoorl Reagent ●

1. ละลาย anhydrous sodium carbonate 143.8 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้จนเย็น จึงเติมสารละลายที่เตรียมจากข้อ 2

2. ละลาย citric acid monohydrate ปริมาณ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมลงไปในสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 1 พร้อมกับเขย่าให้ทั่ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ปรับปริมาตรของผสมภายในขวด และผสมให้เข้ากัน

5. ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน แล้วกรองเอาตะกอนที่เกิดขึ้นออก

6. สารละลายที่ได้จะต้องมีความเข้มข้นของสารที่แน่นอน คือ copper (II) มีความเข้มข้น 0.1 โมล และ sodium carbonate มีความเข้มข้น 1 โมล

● วิธีการทำ Standardize สาร Luff – Schoorl Reagent ●

1. ใช้สารละลาย reagent ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมด้วยโปแตสเซียมไอโอไดด์ 3 กรัม และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2. ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5) เมื่อสิ้นสุดการไตเตรตควรใช้โซเดียมไธโอซัลเฟตประมาณ 25 มิลลิลิตร

3. ใช้ reagent 10 มิลลิลิตร มาทำให้เจือจางเป็น 100 มิลลิตร

4. เติมสาร reagent ที่เจือจางแล้วในข้อ 3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

5. นำไปวางบนอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. ทำให้เย็นลง และปรับปริมาตรให้เท่าเดิมด้วยน้ำกลั่น

7. ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยมีฟีนอฟ - ทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ปริมาตรของสารลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 5.5 – 6.5 มิลลิลิตร

8. ไตเตรตสาร reagent ที่เจือจางแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ปริมาตรของกรดที่ใช้ในการไตเตรตควรจะเท่ากับ 6.0 – 7.5 มิลลิลิตร

9. ค่าพีเอชของสาร reagent ควรประมาณ 9.3 - 9.4

● วิธีการวิเคราะห์●

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (ประมาณ 15 – 20 กรัม) ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำร้อนลงไป 150 มิลลิลิตร ทำการเขย่า เพื่อสกัดสารที่ละลายน้ำออกมา

3. ทำสารละลายให้ใสด้วยการเติมสารละลาย Carrez I ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยการเติมสารละลาย Carrez II อีก 5 มิลลิลิตร

4. เขย่าและปรับปริมาตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนของเหลวออกมาโดยการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำส่วนของเหลวที่ได้มาเจือจางจนกระทั่งตัวอย่างสารละลายที่เจือจาง 25 มิลลิลิตร นั้นมีปริมาณน้ำตาลติวส์อยู่ 15 – 60 มิลลิลิตร

6. ใส่สารละลาย Luff – Schoorl Reagent ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 300 มิลลิลิตร

7. เติมสารละลายที่เจือจางไว้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไป

8. ใส่เม็ดแก้วกันกระแทกลงไปในขวดแก้วรูปชมพู่ 2- 3 อัน

9. ทำการ reflux โดยปรับอุณหภูมิให้สารละลายเดือด เป็นเวลา 2 – 3 นาที แล้วลดอุณหภูมิของการ reflux ลงไป ปล่อยทิ้งไว้ให้เดือดเบา ๆ อีก 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นในน้ำเย็น เป็นเวลา 5 นาที

10. เติมสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ (30 % w / v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เติมด้วย 25 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 โมลาร์ อาจเติม isopentanol ลงไป 2 – 3 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟอง

11. เมื่อไม่มีฟองเกิดขึ้นแล้ว นำไปไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายไม่มีสี จึงเติมน้ำแป้ง (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก) ลงไป 2 – 3 มิลลิลิตร แล้วไตเตรตต่อจนกระทั่งสารละลายไม่มีสี ปริมาตรที่ได้เท่ากับ x มิลลิลิตร

12. ไตเตรตสารละลาย blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง และปฏิบัติเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง ปริมาตรที่ได้เท่ากับy มิลลิลิตร

13. เมื่อนำปริมาตร y - x จะเป็นปริมาตรของ copper ที่ถูกรีดิวส์ด้วยน้ำตาลในสารตัวอย่าง ซึ่งสามารถเปิดเทียบค่าได้จากตารางภาคผนวก

14. คำนวณค่าร้อยละของน้ำตาลกลูโคส (ในรูปน้ำตาลอินเวอร์ท)

2. การหาปริมาณกรดทั้งหมด

● สารเคมี ●

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
- ฟีนอฟทาลีน

● วิธีการวิเคราะห์●

1. นำตัวอย่างเยื่อหุ้มหรือเมล็ดโกโก้ 5 กรัม เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

2. ผสมให้เข้ากันโดยการปั่นผสมด้วยเครื่องปั่น เป็นเวลา 5 นาที อาจต้องกรองเอาตะกอนออก หากมีตะกอนมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.ไตเตรตสารละลายกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล หาจุดยุติ มีฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

4. คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก จากสูตร

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาตรไตเตรต} \times N \times 64 \times 100}{\text{มิลลิลิตรของสารตัวอย่าง} \times 100}$$

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (โดยวิธีกรดบอริก)

● สารเคมี ●

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4,000 กรัม ในน้ำกลั่น 10 ลิตร

- กรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 ผสมกับบรอมครีซอล กรีน และ เมทิล เรด

ละลายกรดบอริก 400 กรัม ในน้ำกลั่น 6 ลิตร นำไปตั้งบน hot plate ต้มจนสารละลายหมด เติมน้ำกลั่นที่ร้อน 3 ลิตร ทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง เติมบรอมครีซอล กรีน 100มิลลิลิตร และเมทิล เรด 70 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนเป็น 10 ลิตร คนให้เข้ากันดี

ดูดสารละลายกรดบอริก มา 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ถ้าสารละลายในขวดแก้วรูปชมพู่ยังคงเป็นสีแดง ให้ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งกลายเป็นสีม่วงเทา คำนวณปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่จำเป็นต้องเติมลงในกรดบอริก 10 ลิตร

มิลลิลิตร ของ 1.0 โมลาร์ Alkali = มิลลิลิตร ของการไตเตรต × 40

เติมปริมาณที่คำนวณได้ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ลงในสารละลายกรดบอริก ผสมให้เข้ากัน

- กรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล

เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 17 มิลลิลิตรใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร หาความเข้มข้นที่แน่นอนโดยไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล หรือ Na_2CO_3 0.2 นอร์มอล

- Na_2CO_3 0.2 นอร์มอล

นำ anhydrous Na_2CO_3 ประมาณ 10 กรัม บดด้วยครกให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 265 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง หรือ อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่ง Na_2CO_3 ที่อบแล้ว 1.06 กรัม (จดน้ำหนักที่แน่นอนไว้) ละลายในน้ำกลั่น ใส่ในขวดปรับปริมาตรเพื่อปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

คำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลาย } Na_2CO_3 \text{ (เป็นนอร์มอล)} = \frac{\text{น้ำหนัก } Na_2CO_3 \times 2 \times 1,000}{106 \times 100}$$

- การทำ Standardize กรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล (เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอน)

1. ปีเปต สารละลาย Na_2CO_3 ที่เตรียมไว้ 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร

2. หยด เมทิล ออเรนจ์ 2 หยดเพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ จะได้สารละลายสีเหลือง

3. ใส่กรดไฮโดรคลอริกที่ต้องการทราบความเข้มข้นในบิวเรต

4. นำ สารละลาย Na_2CO_3 ที่อยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่มาไตเตรตกับ กรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอลจนถึงจุดยุติ สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีจำปา จดปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้

5. นำไปให้ความร้อน จนเดือดน้อย ๆ เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเหลืองอีก ให้ทิ้งไว้จนเย็น แล้วนำมาไตเตรตต่อจนถึงจุดยุติอีก

6. นำปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไตเตรตได้มารวมกัน

7. ทำซ้ำเพื่อหาความเฉลี่ย

คำนวณ

$$N\ (HCl) = \frac{\text{มิลลิลิตร } Na_2CO_3 \times N\ (Na_2CO_3)}{\text{มิลลิลิตร HCl}}$$

● วิธีวิเคราะห์●

1. ชั่งตัวอย่าง 0.9 – 1.0 กรัม ใส่ลงในกระดาษกรองแล้วใส่ลงใน digestion tube

2. ใส่ K_2SO_4 3.9 กรัม และ $CuSO_4 . 5H_2O$ 0.4 กรัม

3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตรเขย่าเบา ๆ

4. นำ digestion tube วางลงในเครื่องย่อย ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 องศาเซลเซียส แล้วเปิดเครื่องดูดควัน

5. ย่อยเป็นเวลา 50 นาที จนได้สารละลายใสสีเขียวหรือสีฟ้า นำออกจากเครื่องย่อย ตั้งทิ้งไว้ในเครื่องดูดควัน เพื่อให้หมดควัน เติมน้ำลงใน digestion tube พอประมาณ แล้วนำไปเข้าเครื่องกลั่น

6. เปิดก๊อกน้ำเพื่อหล่อเย็นเครื่องควบแน่นและเปิดpower ของเครื่องกลั่น (Kjeltec)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. กดปุ่ม Alkali = 2-3 ครั้ง จนแน่ใจว่าในท่อด่างไม่มีฟองอากาศหลงเหลืออยู่

8. warm เครื่องกลั่นโดยใช้ขวดแก้วรูปชมพู่และ digestion tube เปล่า เปิด steam กลั่นเป็นเวลา 5 นาที

9. เปิด steam นำ digestion tube และขวดแก้วรูปชมพู่ ออกจากเครื่องกลั่น

10. Set Alkali = 2 Delay time = 0.2 Steam = 3.6

11. นำขวดแก้วรูปชมพู่ซึ่งมี กรดบอริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ไปตั้งบน platform ของเครื่องกลั่น กดปุ่ม Auto ยก platform ขึ้นเพื่อให้ digestion tube จุ่มลงในสารละลาย ปิด Safty door เครื่องจะทำงานโดยมีน้ำกลั่นลงมาเจือจางสารตัวอย่าง แล้วตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้น steam จะทำงาน

12. เมื่อกลั่นจนเสร็จแล้วนำขวดแก้วรูปชมพู่และ digestion tube ออกจากเครื่องกลั่น แล้วทำการกลั่นตัวอย่างใหม่ต่อไป

13. นำขวดแก้วรูปชมพู่ ซึ่งมี distillate เป็นสารละลายสีเขียวไปไตเตรตกับกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเทา

คำนวณ

$$\text{ไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{0.401 \times (\text{มิลลิลิตร HCl} - \text{blank}) \times N\ (HCl)}{\text{จำนวนกรัมของตัวอย่าง}}$$

$$\text{โปรตีน (ร้อยละ)} = \text{ไนโตรเจน (ร้อยละ)} \times 6.25$$

4. สารแขวนลอย (Suspended Solid)

● อุปกรณ์ ●

1. กระดาษกรองใยแก้ว
2. กรวยกรอง
3. เครื่องดูดอากาศ
4. เตาอบแห้ง
5. เดซิกเคเตอร์
6. เครื่องชั่งอย่างละเอียด

● วิธีวิเคราะห์●

1. อบกระดาษกรองใยแก้วในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.เลือกปริมาตรน้ำตัวอย่างที่จะให้ค่าสารแขวนลอยอย่างน้อยสุดประมาณ 2.5 มิลลิกรัม (ไม่รวมน้ำหนักกระดาษกรองใยแก้ว)

3. วางกระดาษกรองลงในกรวยที่ต่อเข้ากับเครื่องดูดอากาศ

4. ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษกรองให้เปียกเพื่อให้ติดแน่นกับกรวย

5.เทตัวอย่างน้ำปริมาตรตามต้องการผ่านกระดาษกรองโดยอาศัยแรงดูดจากเครื่องดูดอากาศ

6. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างของแข็งที่ตกค้างอยู่ข้างกรวยกรองจนหมด รอจนเครื่องดูดน้ำหมด

7. ปิดเครื่องดูดอากาศ ใช้ปากคีบจับกระดาษกรองใส่ภาชนะทนไฟ นำไปอบในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือจนกระดาษแห้ง

8. ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในเดซิกเคเตอร์ แล้วชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองที่เพิ่มขึ้น

คำนวณ

$$\text{ปริมาณสารแขวนลอย (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักตะกอน (มิลลิกรัม)} \times 1000}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่างน้ำ}}$$

5. **ของแข็งทั้งหมด** (Total Solids)

● อุปกรณ์ ●

1. จานระเหย
2. เครื่องอังน้ำ
3. เตาอบแห้ง
4. เดซิกเคเตอร์
5. เครื่องชั่งอย่างละเอียด

● วิธีวิเคราะห์●

1. นำจานระเหยไปอบให้แห้งและมีน้ำหนักคงที่ในตู้อบ อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์แล้วชั่งหาน้ำหนักของจานระเหย

2. เลือกใช้ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่เหมาะสม (50.0 – 100.0 มิลลิลิตร)

3. ค่อย ๆ รินตัวอย่างน้ำที่ต้องการลงในจานระเหย นำไปอังบนเครื่องอังไอน้ำ เมื่อน้ำระเหยหมด นำจานไปอบที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส จนแห้งและน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์

4. ชั่งหาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือน้ำหนักของของแข็งทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณ

$$\text{ของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัม / ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็ง (มิลลิกรัม)} \times 100}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่างน้ำ}}$$

6. COD (Chemical Oxygen Demand)

● อุปกรณ์ ●

1. ขวดก้นกลม ขนาด 250.0 มิลลิลิตร
2. เครื่องควบแน่น
3. เตาไฟฟ้า
4. บิวเรตต์ ขนาด 50.0 มิลลิลิตร

● สารเคมี ●

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 5.5 กรัม ต่อกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 กิโลกรัม (ต้องใช้เวลาในการละลายประมาณ 1 – 2 วัน)

2. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 0.0417 โมลาร์ ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) 12.259 กรัม (อบ 130 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง) ลงในน้ำกลั่น ทำให้เจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต 0.25 โมลาร์ ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) ชนิดเออาร์ 98 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20.0 มิลลิลิตร ลงไป ทำให้เย็นแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร สารละลายนี้จะต้องหาความเข้มข้นที่แน่นอนโดยไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 0.0417 โมลาร์

นำสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 10.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 30.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำมาไตเตรตด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้เฟอโรอินเป็นอินดิเคเตอร์ (2 – 3 หยด)

คำนวณ

$$\text{โมลาริตี (M)} = \frac{\text{มิลลิลิตร ของ 0.0417 M โพแทสเซียมไดโครเมต} \times 0.25}{\text{มิลลิลิตรของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต}}$$

4. สารละลายเฟอโรอินอินดิเคเตอร์

5. เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดผง ใช้กำจัดหมู่คลอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. กรดซัลฟามิกซนิด เออาร์ (Sulfamic acid) ใช้กำจัดไนไตรท์

● วิธีวิเคราะห์●

1. ชั่งเมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) 0.4 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม

2. เติมตัวอย่างน้ำที่ต้องการวิเคราะห์ 20.0 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างน้ำที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10.0 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่มีซิลเวอร์ซัลเฟตเจือปนอยู่ลงไป 30.0 มิลลิลิตร

4. เขย่าสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันดี นำขวดต่อเข้ากับเครื่องควบแน่น กลั่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ล้างเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่นก่อนที่จะถอดเครื่องควบแน่นออกจากขวดแก้วก้นกลม

5. เติมน้ำกลั่นลงในขวดก้นกลมจนปริมาตรประมาณ 140 – 150 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. ไตเตรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เหลือด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอรัส - แอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้เฟอโรอินอินดิเคเตอร์ (2 – 3 หยด) จนกระทั่งสีของส่วนผสมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง แสดงว่าถึงจุดยุติ

7. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ และดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทุกประการ

คำนวณ

$$\text{COD (มิลลิกรัม / ลิตร)} = \frac{(A - B) \times C \times 8000}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่างน้ำ}}$$

เมื่อ A = มิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้กับ blank

B = มิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้กับตัวอย่างน้ำ

C = โมลาริตีของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ค - 1 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จุลินทรีย์	ร้อยละของกรดซิตริก (มวลต่อปริมาตร) *					
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
A. niger TISTR 3089	0.301b	3.179b	5.952b	8.277b	20.309a	19.883a
C. tropicalis TISTR 5023	0.301b	4.843b	5.824b	5.376b	4.693b	4.011b
S. cerevisiae TISTR 5088	0.301b	4.523b	5.056b	4.843b	4.928b	5.227b

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ค - 2 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จาก *Aspergillus niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่างกัน

น้ำโกโก้ (ร้อยละ)	ร้อยละของกรดซิตริก (มวลต่อปริมาตร) *					
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
25	0.076g	8.625ef	11.776de	21.973a	16.691ab	18.069abc
50	0.151g	7.019f	8.661ef	19.179abc	15.893bcd	18.069abc
75	0.226g	5.568f	7.680f	16.832bc	16.256bc	16.576bc
100	0.301g	4.544f	6.357f	14.720cd	15.104bcd	15.659bcd

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค - 3 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 25 และมีความเข้มข้นของยีสต์สกัดต่างกัน

แหล่งไนโตรเจน	ร้อยละของกรดซิตริก (มวลต่อปริมาตร)*					
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจน	0.076f	4.053e	10.859cd	15.723a	15.189a	13.227abc
ยีสต์สกัด 0.2 (ร้อยละ)	0.076f	6.613e	14.251ab	13.184abc	12.373bcd	6.165e
ยีสต์สกัด 0.4 (ร้อยละ)	0.076f	5.269e	10.283d	6.528e	4.736e	3.776e
ยีสต์สกัด 0.6 (ร้อยละ)	0.076f	3.968e	5.931e	4.064e	4.821e	3.989e

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ค - 4 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 25 และมีความเข้มข้นของเปปโตนต่างกัน

แหล่งไนโตรเจน	ร้อยละของกรดซิตริก (มวลต่อปริมาตร)*					
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจน	0.076j	4.053i	10.859def	15.723a	15.189ab	13.227bcd
เปปโตน 0.3 (ร้อยละ)	0.076j	6.104hi	11.683cde	13.675abc	8.960fg	6.251hi
เปปโตน 0.5 (ร้อยละ)	0.076j	7.893gh	13.077bcd	11.797cde	6.251hi	4.703i
เปปโตน 0.7 (ร้อยละ)	0.076j	6.357hi	12.032cde	10.133ef	5.461hi	3.989i

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค - 5 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 25 และมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตต่างกัน

แหล่งไนโตรเจน	ร้อยละของกรดซิตริก (มวลต่อปริมาตร)*					
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจน	0.076f	4.053e	10.859b	15.723a	15.189a	13.227a
แอมโมเนียมไนเตรต 1.0 (ร้อยละ)	0.076f	6.315cd	9.835bc	14.656a	16.085a	15.680a
แอมโมเนียมไนเตรต 1.5 (ร้อยละ)	0.076f	6.827cd	8.619bcd	13.909a	15.829a	15.595a
แอมโมเนียมไนเตรต 2.0 (ร้อยละ)	0.076f	7.595cd	9.003bcd	14.933a	15.787a	15.939a

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ค - 6 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จาก *A. niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้พีเอช 6.5 ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 25 ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจนโดยใช้อุณหภูมิต่างกัน

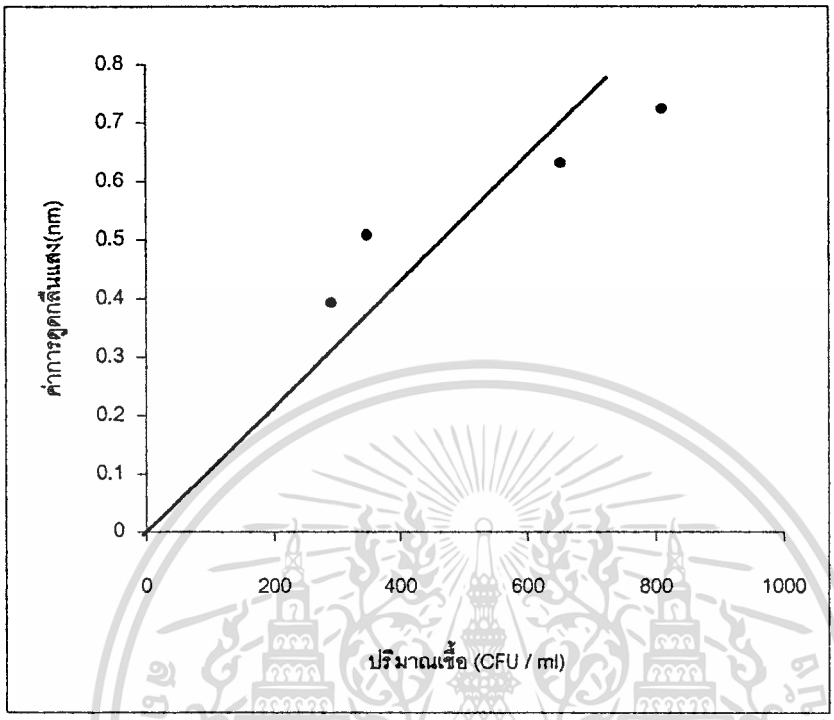
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ร้อยละของกรดซิตริก (มวลต่อปริมาตร)*					
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
25	0.076g	4.011f	4.907f	10.112cd	12.587bc	16.235a
30	0.076g	7.317e	13.547b	17.280a	18.069a	15.893a
37	0.076g	8.149de	9.771cd	12.608bc	10.837bc	12.331bc

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

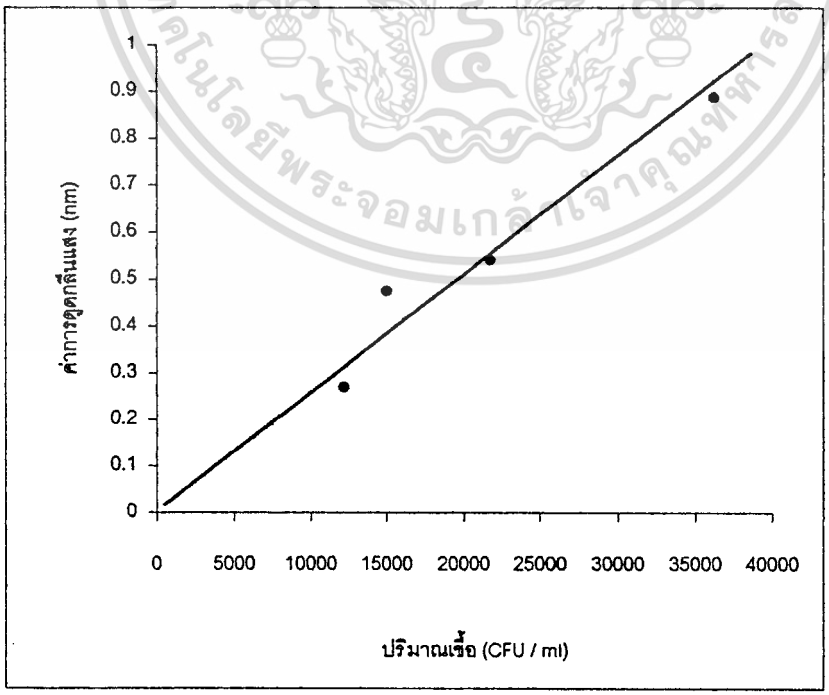
อักษรเหมือนกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างทางนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
กราฟมาตรฐาน

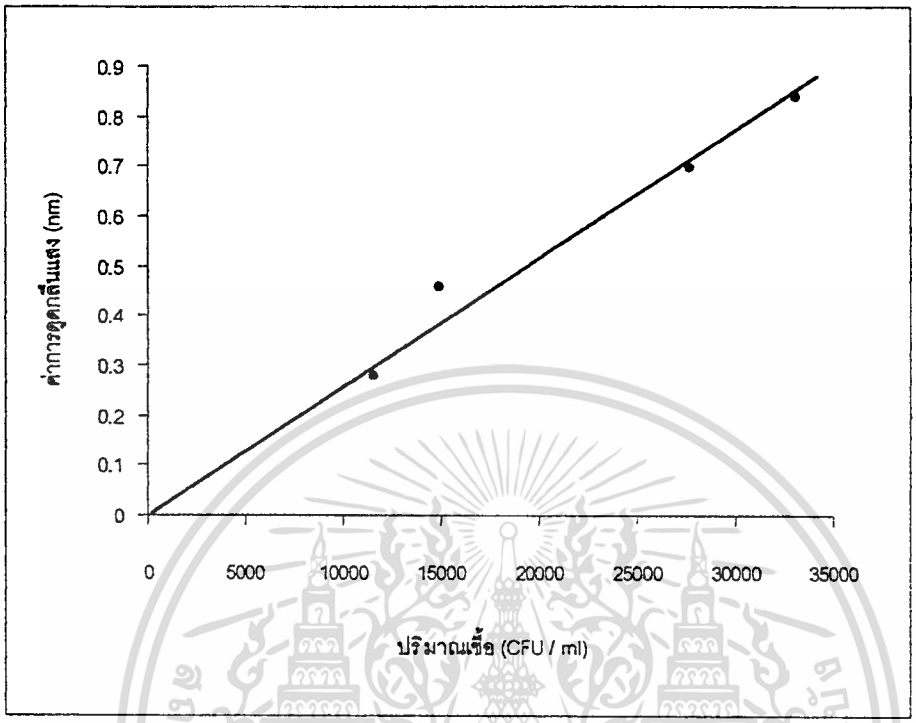


<u>รูปที่ ง – 1</u> ปริมาณเชื้อ*Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ค่าการดูดกลืนแสงต่าง ๆ



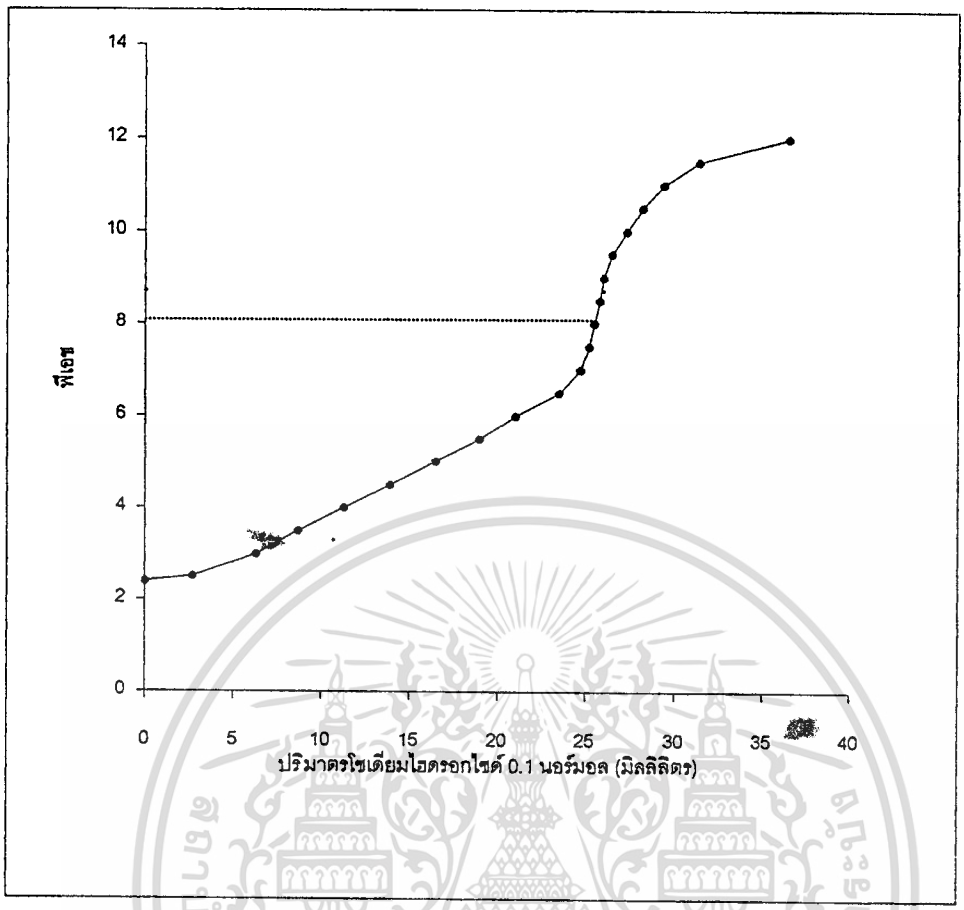
<u>รูปที่ ง – 2</u> ปริมาณเชื้อ*Candida tropicalis* TISTR 5023 ที่ค่าการดูดกลืนแสงต่าง ๆ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง – 3 ปริมาณเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ที่ค่าการดูดกลืนแสงต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง - 4 การหาจุดยุติของกรดซิตริกโดยการไตเตรตระหว่างสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล กับสารละลายกรดซิตริกมาตรฐานความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยใช้พีเอชมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้