สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของสภาวะในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ โดยเชื้อ *Aspergillus niger*

นางสาวดาวรุ้ง ทับแสง
นายดำรงศักดิ์ พิริยะภัทรกิจ

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2543

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....39887
วัน, เดือน, ปี.....11 ก.ค. 2544
.b.....
.i.....
การใช้งานเอกสารนี้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of fermentation condition on the production of Citric Acid from Cocoa Pulp Extract by *Aspergillus niger*

Miss Dauwrung Thubsang

Mr. Dumrongsak Piriyapattarakit

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

2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของสภาวะในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อ *Aspergillus niger*
นักศึกษา	นางสาวดาวรุ้ง ทับแสง
	นายดำรงศักดิ์ พิริยะภัทรกิจ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2543

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....

(ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

.....

(รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์) ประธานกรรมการ

.....

(ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล) กรรมการ

.....

(อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ผลของสภาวะในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อ *Aspergillus niger*

นักศึกษา นางสาวดาวรุ้ง ทับแสง

นายดำรงศักดิ์ พิริยะภัทรกิจ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

การผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Aspergillus niger* TISTR 3089 *Aspergillus niger* TISTR 3106 *Aspergillus niger* TISTR 3245 *Aspergillus niger* TISTR 3349 และ *Aspergillus niger* TISTR 3350 พบว่า *Aspergillus niger* TISTR 3089 ผลิตกรดซิตริกได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นในวันที่ 12 ของการหมัก รองลงมาเป็น *Aspergillus niger* TISTR 3106 พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณกรดซิตริกแตกต่างทางสถิติกับการใช้สายพันธุ์อื่นที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักเซลล์แห้งควบคู่ไปด้วย ซึ่งผลจากการทดลองสอดคล้องกับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อสร้างขึ้น โดยพบว่าจากการใช้ *A. niger* TISTR 3089 จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 12 ของการหมักจะมีปริมาณเหลือน้อยที่สุด สำหรับน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการใช้ *A. niger* TISTR 3089 และ *A. niger* TISTR 3106 มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ *A. niger* TISTR 3245 *A. niger* TISTR 3349 และ *A. niger* TISTR 3350 จึงได้คัดเลือก *A. niger* TISTR 3089 และ *A. niger* TISTR 3106 ไว้ใช้ศึกษาต่อไป

การเติมเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 4 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 25 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจาก *A. niger* TISTR 3089 และ *A. niger* TISTR 3106 การใช้ *A. niger* ทั้งสองสายพันธุ์ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการใช้ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 4.0 ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นแต่จะแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติมเมทานอล ผลของการเติมเฟอรัสไอออน (Fe^{2+}) พบว่า จากการใช้ *A. niger* TISTR 3089 และ *A. niger*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 12 ของการหมักและจะไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ $FeSO_4.7H_2O$ ที่ความเข้มข้น 75 100 125 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$ ผลของการเติมคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) พบว่า การใช้ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 12 ของการหมัก รองลงมาคือที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 18 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า $CuSO_4.5H_2O$ ที่ความเข้มข้นทั้งสองจะมีปริมาณกรดซิตริกไม่แตกต่างทางสถิติแต่จะแตกต่างทางสถิติเมื่อใช้ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 6 12 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งการไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$ สำหรับ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 12 ของการหมักและปริมาณกรดซิตริกที่ได้ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้ $CuSO_4.5H_2O$ 6 12 18 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$ ผลของการเติมซิงค์ไอออน (Zn^{2+}) พบว่า *A. niger* TISTR 3089 และ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 12 ของการหมัก เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณกรดซิตริกที่ความเข้มข้นนี้ไม่แตกต่างกับที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 20 60 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งการไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Effect of Fermentation Condition on the Production of Citric acid from Cocoa pulp Extract by *Aspergillus niger*
Name	Miss Dauwrung Thubsang
	Mr. Dumrongsak Piriyapattarakit
Special Project Advisor	Asst. Prof. Duangjai Ochaikul
Department	Applied Biology
Acedemic year	2000

Abstract

Production of citric acid from cocoa pulp extract using there fungi ; such as *Aspergillus niger* TISTR 3089 *Aspergillus niger* TISTR 3106 *Aspergillus niger* TISTR 3245 *Aspergillus niger* TISTR 3349 and *Aspergillus niger* TISTR 3350 was studied. The result showed that *A. niger* TISTR 3089 produced the highest yield of citric acid on day 12, the second was *A. niger* TISTR 3106. Citric acid which produced from both species was significant different from other species. pH, reducing sugars and cells dry weight related to citric acid. *A. niger* TISTR 3089 gave the lowest pH, the least reducing sugars and the most cells dry weight. Cells dry weight which derived from *A. niger* TISTR 3089 and *A. niger* TISTR 3106 were significant different from other species. Therefore we choosed *A. niger* TISTR 3089 and *A. niger* TISTR 3106 was studied.

The addition of 4% methanol in the medium using 25 % cocoa pulp extract as a substrate with incubation temperature of 30 $^{\circ}$ C and shaking speed at 200 rpm was optimum for citric acid production by *A. niger* TISTR 3089 and *A. niger* TISTR 3106. Citric acid which derived from 4% methanol was non significant different from other concentration but there was significant different from non addition methanol. The addition of 50 mg/l of ferrous sulphate ($FeSO_4.7H_2O$) in the medium gave the highest citric acid on day 12 by *A. niger* TISTR 3089 and *A. niger* TISTR 3106. There was non significant from adding $FeSO_4.7H_2O$ 75, 100, 125 and 150 mg/l but was

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

significant different from non addition $FeSO_4.7H_2O$. When 24 mg/l of copper sulphate ($CuSO_4.5H_2O$) was added into the medium, the highest citric acid on day 12 by *A. niger* TISTR 3089 and the second was 18 mg/l. If found that both concentations were not significant different but there was significant different from $CuSO_4.5H_2O$ 6, 12, 30 mg/l and non addition $CuSO_4.5H_2O$. *A. niger* TISTR 3106 which addition 24 mg/l of $CuSO_4.5H_2O$ in the medium gave the highest citric acid on day 12 and there was non significant different from $CuSO_4.5H_2O$ 6, 12, 18 and 30 mg/l but there was significant different from non addition $CuSO_4.5H_2O$. The addition 40 mg/l of zinc sulphate ($ZnSO_4.7H_2O$) in the medium gave the highest citric acid on day 12 by *A. niger* TISTR 3089 and *A. niger* TISTR 3106. There was significant different from adding $ZnSO_4.7H_2O$ 20, 60, 80, 100 mg/l and non addition $ZnSO_4.7H_2O$.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตและสามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีนั้นคณะะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษ ขอขอบคุณ รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการและขอขอบคุณอาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษตลอดมา ขอบคุณพี่ ๆ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ขอขอบคุณพี่ ๆ ที่โรงเรียนเสริมความรู้ บางกะปิ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุก ๆ ท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จสมบูรณ์

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
2. ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	3
1. โกโก้	3
2. กรดซิตริก	3
3. คุณสมบัติของกรดซิตริก	4
4. ลักษณะของเชื้อ *Aspergillus niger* ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก	6
5. การสังเคราะห์และการสะสมกรดซิตริกโดย *Aspergillus niger*	7
6. จลนศาสตร์การผลิตกรดซิตริก	10
7. การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม	11
8. การแยกกรดซิตริก	15
9. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก	17
10. จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดซิตริก	20
11. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก	23
12. การใช้ประโยชน์จากกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	42
1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	42
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ	42
3. เครื่องมือและอุปกรณ์	42
4. วิธีการทดลอง	43
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย	46
1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	46
2. ศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus niger* ที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	47
3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้	50
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	69
เอกสารอ้างอิง	73
ภาคผนวก	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	3
2-2	ความสามารถในการละลายน้ำของกรดซิตริก	5
2-3	คุณลักษณะทางเคมีของกรดซิตริก	5
2-4	การผลิตกรดซิตริกโดย *Candida lipolytica* จากวัตถุดิบต่างๆ	18
2-5	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *Aspergillus niger*	25
2-6	องค์ประกอบของกากน้ำตาล	26
2-7	ผลของเกลือแอมโมเนียมชนิดต่างๆที่มีต่อการสร้างกรดออกซาลิกตลอดจนสัดส่วนของกรดซิตริกต่อมวลของเชื้อ	27
2-8	ผลของเกลือฟอสเฟตต่อการสร้างกรดซิตริกของ *Aspergillus niger*	28
2-9	ผลของแมกนีเซียมที่มีต่อการใช้น้ำตาลและการสร้างกรดซิตริกของ *Aspergillus niger*	29
2-10	อิทธิพลของอุณหภูมิต่อกรดที่ไตรเตรทกับกรดซิตริกเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 วัน	37
4-1	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2-1	โครงสร้างทางเคมีของกรดซิตริก	4
2-2	ลักษณะโดยสังเขปของ *Aspergillus sp.*	6
2-3	วิถีเมตาบอลิซึมการสังเคราะห์กรดซิตริก	9
2-4	ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก	16
4-1	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดยเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์ต่าง ๆ	49
4-2	ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริก โดยเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์ต่าง ๆ	49
4-3	น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* สายพันธุ์ต่าง ๆที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก จากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในวันที่ 12 ของการหมัก	49
4-4	ปริมาณน้ำตาลรดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย เชื้อ *A. niger* สายพันธุ์ต่าง ๆ	49
4-5	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน	52
4-6	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน	52
4-7	ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน	52
4-8	ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน	52
4-9	น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน	53
4-10	น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน	53
4-11	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4-12	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน	53
4-13	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	57
4-14	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	57
4-15	ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	57
4-16	ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	57
4-17	น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	58
4-18	น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	58
4-19	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	58
4-20	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	58
4-21	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	62
4-22	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	62
4-23	ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4-24	ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	62
4-25	น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	63
4-26	น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	63
4-27	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	63
4-28	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	63
4-29	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	67
4-30	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	67
4-31	ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	67
4-32	ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	67
4-33	น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	68
4-34	น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	68
4-35	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	68
4-36	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

กรดซิตริก (citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่ มีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) 3 หมู่ สังเคราะห์ขึ้นในวัฏจักรเครบส์ (kreb's cycle) กรดนี้ใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เป็นตัวปรับความเป็นกรด-ด่าง ใช้เพิ่มรสเปรี้ยวในเครื่องดื่ม น้ำผลไม้ ผลไม้กระป๋อง และไวน์ เนื่องจากเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีและสามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ มีรสเปรี้ยว มีกลิ่นหอม ความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายได้ง่าย ราคาถูกและหาได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดซิตริกในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ ในอุตสาหกรรมยา กรดซิตริกใช้เป็นส่วนผสมในยาบางชนิดเพื่อควบคุมความเป็นกรด เป็นสารที่ทำให้เกิดความคงตัว (stabilizer) และ เป็นสารรักษาเลือดไม่ให้แข็ง (blood preservative) ในอุตสาหกรรมเคมี ใช้เป็นส่วนผสมในน้ำยาขัดโลหะ หมึกพิมพ์ น้ำหมึกและสี เป็นต้น (Kirk, 1964; Crueger,1982) การผลิตกรดซิตริกในเชิงการค้า ด้วยกรรมวิธีการหมักนั้นถือได้ว่าเป็นความสำเร็จอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการหมัก กรดตัวนี้แยกและตกผลึกจากน้ำมะนาวเป็นครั้งแรก โดย Scheele ในปี ค.ศ. 1784 กรดนี้พบมากในผลไม้ตระกูลส้ม สับปะรด แพร์ ผลท้อ มะเดื่อ ตลอดจนผลไม้อื่นๆ กรดที่ผลิตได้จากผลไม้นี้รู้จักกันในนามของ "กรดมะนาวธรรมชาติ" ซึ่งต่างจาก"กรดมะนาวส้ม" แหล่งที่เคยผลิต กรดมะนาวธรรมชาติได้แก่ซิลลี่ในอิตาลี แคลิฟอร์เนีย ฮาวาย และเวสท์อินดีส ในประเทศไทยกรดซิตริกเริ่มมีการผลิตตั้งแต่ปี พ.ศ. 2522 แต่ปริมาณการผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศที่มีประมาณปีละ 4,000 ตัน และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นอีกมากในอนาคตเนื่องจากการขยายของอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (ฉัตรและวุฒิ, 2528)

จากการสำรวจความต้องการด้านการตลาดของกรดซิตริกพบว่า ประเทศไทยมีแนวโน้มที่จะนำกรดซิตริกเป็นสินค้านำเข้าของประเทศ ในปี พ.ศ. 2526 และพ.ศ. 2527 มีรวมทั้งสิ้น 420,106 และ751,338 กิโลกรัมซึ่งคิดเป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น 13,649,075 และ 23,604,120 บาท ตามลำดับ นอกจากนี้ในปีพ.ศ. 2526 ประเทศไทย ได้ส่งกรดซิตริกเป็นสินค้าออกรวมทั้งสิ้น 104,434 กิโลกรัม คิดเป็นจำนวนเงิน 2,957,901 บาท (Department of Customs; 1983; 1984)

การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมเป็นครั้งแรกใช้กระบวนการสกัดน้ำมะนาวแต่หลังจาก Wehmer (1893) พบว่าเชื้อรา บางชนิดสามารถผลิตกรดซิตริก จึงมีการพัฒนากระบวนการผลิตกรดซิตริกให้ก้าวหน้า จนถึงปัจจุบัน พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ ซึ่งเชื้อนี้สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณสูง (Qazi และคณะ,1990) โดยสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรด ซิตริก ได้ร้อยละ 90 (Rour และ Kubicek,1981; Panda และคณะ, 1984)

การศึกษานี้ได้เป็นการพัฒนาวิธีการผลิตกรดซิตริกในอาหารเหลวซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง โดยใช้น้ำสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เป็นวัตถุดิบ ซึ่งโกโก้เป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกมากในจังหวัดแถบภาคใต้ จากการศึกษาพบว่าน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ร้อยละ 10-15 จึงสามารถนำน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มาเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อผลิตกรดซิตริกได้ ซึ่งการใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มาผลิตเป็นกรดซิตริกนั้นถือว่าเป็นการนำเอาวัสดุเหลือใช้ในทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางหนึ่ง

<u>วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ</u>

- เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณไนโตรเจน โปรตีน ของแข็งแขวนลอย ของแข็งทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคส ปริมาณกรดซิตริกเริ่มต้น รวมทั้งแร่ธาตุบางชนิด เช่น ทองแดง เหล็ก แมงกานีส และสังกะสี
- ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตกรดซิตริก เช่น การเติม เมทานอล และแร่ธาตุบางชนิด
- นำผลจากการศึกษานี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

<u>ขอบเขตของโครงงานพิเศษ</u>

ศึกษาปัจจัยที่ผลต่อกระบวนการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ โดยเชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ต่าง ๆ

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

1. สามารถผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้
2. เป็นการนำวัสดุเหลือใช้มาใช้ให้เกิดประโยชน์
3. ลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
บทตรวจเอกสาร

1. โกโก้

โกโก้เป็นพืชที่นิยมปลูกกันมากในแถบจังหวัดภาคใต้ โกโก้เป็นพืชที่เกษตรกรผู้ปลูกมักจำหน่ายในรูปเมล็ดแห้ง ส่วนใหญ่ผลโกโก้อยู่บนก้านดอก ซึ่งผลโกโก้เจริญมาจากดอก ผิวของผลโกโก้มีลักษณะเป็นตุ่มๆ ขรุขระเป็นร่องๆ ภายในผลโกโก้ที่เจริญเต็มที่ประกอบไปด้วยเมล็ดโกโก้ เมล็ดโกโก้จะมีเยื่อหุ้มเมล็ดซึ่งมีลักษณะเป็นเมือกเหนียว ล้อมรอบเมล็ดอีกชั้นหนึ่ง เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีแตกต่างกัน เช่น ขาว ชมพู ขึ้นอยู่กับพันธุ์ของโกโก้ (Wood และ Lass, 1985) ในกระบวนการหมักเมล็ดโกโก้ส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นส่วนสำคัญในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรย์ต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์และกรดซิตริก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารเหล่านี้มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ระหว่างการหมักมีการสูญเสียเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ประมาณร้อยละ 5-7 โดยสลายกลายเป็นของเหลวออกไปจากกองหมัก เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบประมาณ ร้อยละ 10-15 เพคตินร้อยละ 1 และ กรดซิตริกร้อยละ 1.5 (Dittmar, 1956) ดังแสดงในตารางที่ 2-1

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)

2. กรดซิตริก

กรดซิตริกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งซึ่งพบในผลไม้หรือเมล็ดของผักหลายชนิดโดยเฉพาะในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะนาวและพืชตระกูลส้มจะมีปริมาณกรดชนิดนี้สูง ซึ่งสามารถแยกกรดซิตริกออกจากน้ำมะนาวได้สำเร็จเป็นครั้งแรก โดยการผ่านน้ำมะนาวร้อนๆ ไปบนแคลเซียม

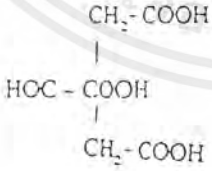
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอเนตเพื่อให้เกิดเป็นตะกอนของแคลเซียมซิเตรทจากนั้นจึงแยกกรดซิตริกออกมาโดยใช้กรดซัลฟูริกซึ่งวิธีการตกตะกอนแคลเซียมซิเตรทและแยกกรดซิตริกออกจากแคลเซียมซิเตรทยังใช้ในการทำให้กรดซิตริกบริสุทธิ์จนถึงปัจจุบันนี้ อย่างไรก็ตาม วัตถุดิบซึ่งใช้ในการผลิตได้มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากวิธีการผลิตกรดซิตริกโดยการสกัดออกมาจากน้ำมะนาวไม่เพียงพอต่อความต้องการในอุตสาหกรรมอาหาร (Schecle, 1784)

3. คุณสมบัติของกรดซิตริก

Wehmer (1893) ผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Mucor* sp. และ *Penicillium* sp. โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นวัตถุดิบ ต่อมา Currie (1917) ได้อธิบายวิธีการและสภาวะในการผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก Doelger และ Prescott (1934) พบว่าการเปลี่ยนน้ำตาลทรายเป็นกรดซิตริกโดยเชื้อรา *A. niger* เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งการค้นพบเหล่านี้กระตุ้นให้เกิดความสนใจในการศึกษาถึงการผลิตกรดซิตริกโดยการหมักด้วยเชื้อรา *A. niger* ทำให้นักวิทยาศาสตร์ท่านอื่นๆ หันมาสนใจในการพัฒนาการผลิตกรดซิตริกโดยใช้กระบวนการหมัก ในปัจจุบันการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมจึงอาศัยหมักด้วยเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ ถึงแม้ว่าวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อผลิตกรดซิตริกจะมีแนวโน้มเป็นไปได้ก็ตาม แต่ให้ผลที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจต่ำกว่าที่ได้รับจากการหมัก (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532)

กรดซิตริกมีลักษณะเป็นผลึกขุ่นมัวหรือสีขาว มีลักษณะเป็นผงคล้ายแป้ง มีโครงสร้างดังรูปที่ 2-1 คุณสมบัติสำคัญของกรดซิตริกมีดังนี้ คือ สูตรเคมี $C_6H_8O_7$ น้ำหนักโมเลกุล 192.13 ความถ่วงจำเพาะ 1.665 จุดหลอมเหลว 153 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างในสารละลาย 0.1 นอร์มัล เท่ากับ 2.2 การละลายในน้ำที่ 25 องศาเซลเซียส 162 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (อาภรณ์,2529)



รูปที่ 2-1 โครงสร้างทางเคมีของกรดซิตริก
ที่มา: วราวุฒิ และรุ่งนภา (2532)

เนื่องจากกรดซิตริกเป็นสารที่มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม ย่อยสลายได้ง่าย มีความเป็นพิษต่ำและกำจัดได้ง่าย ละลายได้ดีโดยขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ (ตารางที่ 2-2) จึงมีการใช้กรดซิตริก เกลือ และ เอสเทอร์ของกรดนี้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย คุณลักษณะทางเคมีของกรดซิตริกตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.) ดังแสดงในตารางที่ 2-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-2 แสดงความสามารถในการละลายน้ำของกรดซิตริก

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กรดซิตริก (ร้อยละ)	Solid phase
10	54.0	$C_6H_8O_7.H_2O$
20	59.2	$C_6H_8O_7.H_2O$
30	64.3	$C_6H_8O_7.H_2O$
40	68.6	$C_6H_8O_7$
50	70.9	$C_6H_8O_7$
60	73.5	$C_6H_8O_7$
70	76.2	$C_6H_8O_7$
80	78.8	$C_6H_8O_7$
90	81.4	$C_6H_8O_7$
100	84.0	$C_6H_8O_7$

ที่มา : อาภรณ์ (2529)

ตารางที่ 2-3 แสดงคุณลักษณะทางเคมีของกรดซิตริก

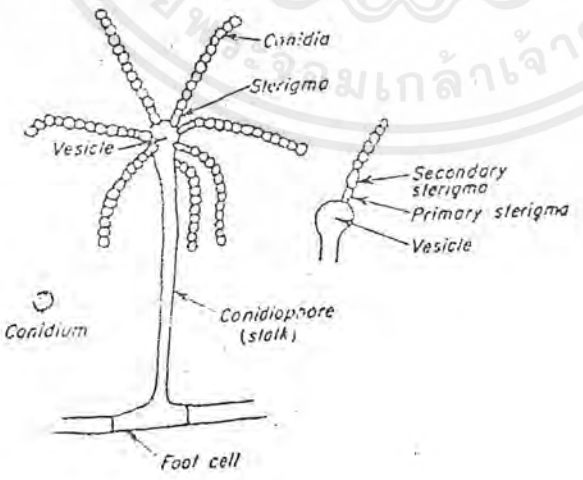
รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด	
		กรดซิตริก โมโนไฮเดรต	กรดซิตริก แอนไฮดรัส
1	ความบริสุทธิ์ $C_6H_8O_7$ คำนวณ ในสภาพแห้งร้อยละ	99.5-101.0	99.5-101.5
2	น้ำ ร้อยละ	7.5-8.8	ไม่เกิน0.5
3	ทากที่เหลือจากการเผา ร้อยละไม่เกิน	0.05	0.05
4	ออกซาเลต	สารละลายต้องไม่ขุ่น	สารละลายต้องไม่ขุ่น
5	ซัลเฟต	สารละลายต้องไม่ขุ่น	สารละลายต้องไม่ขุ่น
6	สารหนู มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	3	3
7	โลหะหนัก ยกเว้นเหล็ก (เทียบเป็นตะกั่ว) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	10	10
8	แบเรียม	สารละลายต้องไม่ขุ่น	สารละลายต้องไม่ขุ่น
9	แคลเซียม มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	200	200
10	เหล็ก มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
11	คลอไรด์ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
12	สารที่สลายให้คาร์บอนได้ง่าย (readily carbonizable substance)	สีต้องไม่เข้มกว่าสีของสารละลายมาตรฐาน	สีต้องไม่เข้มกว่าสีของสารละลายมาตรฐาน

ที่มา : มอก.(2526)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ลักษณะของเชื้อ *Aspergillus niger* ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก

A.niger เป็นเชื้อสำคัญที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกด้วยกรรมวิธีการหมักเชื้อนี้จัดเป็นราชั้นสูงอยู่ใน sub-devision Eumycotina, class Ascomycetes, subclass Euascomycetidae โดยทั่วไปราชนิดนี้จะมีสีดำ แต่เมื่อเชื้อกลายพันธุ์ก็อาจมีสีน้ำตาล เขียวออกเหลือง หรือขาวก็ได้ ลักษณะของราในกลุ่ม Aspergillus คือ เส้นใยของรามีผนังกั้นเป็นห้องๆ ก้านชูสปอร์ (conidiophore หรือ stalk) ตั้งอยู่บนเซลล์ชนิดพิเศษที่เรียกว่า "foot cell" เซลล์นี้จะมีขนาดใหญ่และผนังหนา ปลายสุดของก้านชูอับสปอร์ (vesicle) อับสปอร์นี้อาจมีรูปต่างๆกัน เช่น กลม รี และอื่นๆ บนอับสปอร์จะมีหนาม (sterigmata) อยู่โดยรอบ หรือเพียงบางส่วนในบางครั้ง ราจะสร้างหนามสองชั้น หนามชั้นแรกสุด (primary sterigmata) จะติดอยู่กับอับสปอร์ ส่วนหนามชุดที่สอง (secondary sterigmata) จะอยู่ถัดจากหนามชั้นแรกออกมา ถัดจากชั้นหนามจะเป็นที่ตั้งของสปอร์ (conidia) สปอร์นี้เกิดจากการยืดตัวของเซลล์หนามแล้วสร้างผนังกั้น บางครั้งจะต่อกันเป็นสายโดยสปอร์ที่อยู่ปลายนอกสุดของสายจะเป็นสปอร์ที่แก่ที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 2-2 *A. niger* ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักในปัจจุบันเป็นเชื้อที่ถูกทำให้กลายพันธุ์โดยการใช้กรรมวิธีและสารเคมีต่างๆ เพื่อให้สร้างกรดซิตริกออกมาได้มากขึ้น แต่การรักษาประสิทธิภาพในการผลิตกรดของเชื้อให้คงที่ตลอดไปนั้นเป็นเรื่องที่ลำบากมาก มักพบเสมอว่าราที่เพาะจากสปอร์ที่เก็บไว้นานเกินไปนั้นจะผลิตกรดออกมาได้น้อย ซึ่งเหตุผลของเรื่องนี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัด วิธีแก้ไขอย่างหนึ่งก็คือทำการถ่ายเชื้ออย่างสม่ำเสมอ (Das, 1972; Chaudhary และคณะ, 1974; Banik และคณะ, 1975; Hannan และคณะ, 1976.)



รูปที่ 2-2 ลักษณะโดยสังเขปของ *Aspergillus sp.*

ที่มา : Frazier (1967)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Steel และคณะ (1954) กล่าวว่า ลักษณะของเชื้อที่เจริญเป็นแบบเส้นสายไม่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อ เพราะไม่สามารถนับจำนวนสปอร์ได้ นอกจากนี้ลักษณะของเชื้อที่เป็นแบบรีทาด (retarded type) คือ เชื้อที่มีการเจริญได้เล็กน้อยจะทำให้การหมักได้ผลไม่ดี ดังนั้น เชื้อที่มีลักษณะเป็นเม็ด (pellet) ซึ่งมีลักษณะระหว่างแบบที่เป็นเส้นสายกับแบบรีทาด จึงเหมาะสำหรับใช้ในการผลิตกรดซิตริก

Clark (1962) ได้ศึกษาโครงสร้างภายในของ *A. niger* ที่ใช้ผลิตกรดซิตริกเมื่อเลี้ยงแบบซับเมอร์จ (submerge) โดยใช้กากน้ำตาลจากหัวบีทที่ตกตะกอนโลหะหนักด้วยเฟอร์โรไซยาไนด์ (ferrocyanide) พบว่าการเจริญในช่วง 24 ชั่วโมงแรกที่ให้อากาศนั้น เชื้อแต่ละเม็ดจะเจริญเป็นเส้นใยที่มีลักษณะเกาะกันกลม หลังจากนั้นต่อมาเป็นช่วงที่ให้ออกซิเจนซึ่งจะทำให้การเจริญบริเวณขอบนอกของเม็ดเชื้อหนาทึบส่วนตรงกลางจะเกิดการการย่อยสลายตัวเอง ช่วงสุดท้ายของการหมักเม็ดเชื้อจะประกอบด้วยชั้นของเส้นใยซึ่งจะมีปริมาตรน้อยกว่าร้อยละ 50 ของปริมาตรของเม็ดเชื้อทั้งหมด นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงสภาวะของการหมักจะมีผลต่อการเจริญบริเวณขอบรอบๆ และอัตราเร็วของการย่อยสลายด้วย

Clark และคณะ (1966) รายงานว่า ระหว่างการผลิตกรดซิตริกแบบซับเมอร์จที่มีเกลือแร่หลายๆ อย่าง พบว่ามีแมงกานีสเพียงอย่างเดียวที่ทำให้เกิดการเจริญเป็นแบบเป็นเส้นสายแทนแบบเม็ด ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตกรดซิตริกต่ำลง

5. การสังเคราะห์และการสะสมกรดซิตริกโดย *Aspergillus niger*

กรดซิตริกจัดเป็น primary metabolic product สังเคราะห์ขึ้นได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ หลายวิถี สรุปได้ดังรูปที่ 2-3 (Milsom และ Meers, 1985) โดย acetyl-CoA ระหว่างการสังเคราะห์กรดซิตริกเกิดจากกระบวนการต่อไปนี้

1. การเกิด Oxidative decarboxylation โดย pyruvate ซึ่งเกิดจาก dehydration ของน้ำตาลกลูโคสโดยผ่าน glycolytic pathway
2. การเกิด β-oxidation ของ thioester

จากการศึกษาในครั้งแรกๆ โดยใช้ C^{14} เป็น tracer ภายใต้สภาวะที่ทำให้เกิดการสะสมกรดซิตริกในปริมาณปานกลาง พบว่า ร้อยละ 40 ของกรดซิตริกที่ผลิตโดยกระบวนการ C_2 ,C_2-condensation และร้อยละ 60 ผลิตจาก C_1, C_3-condensation (Shu และคณะ, 1954)

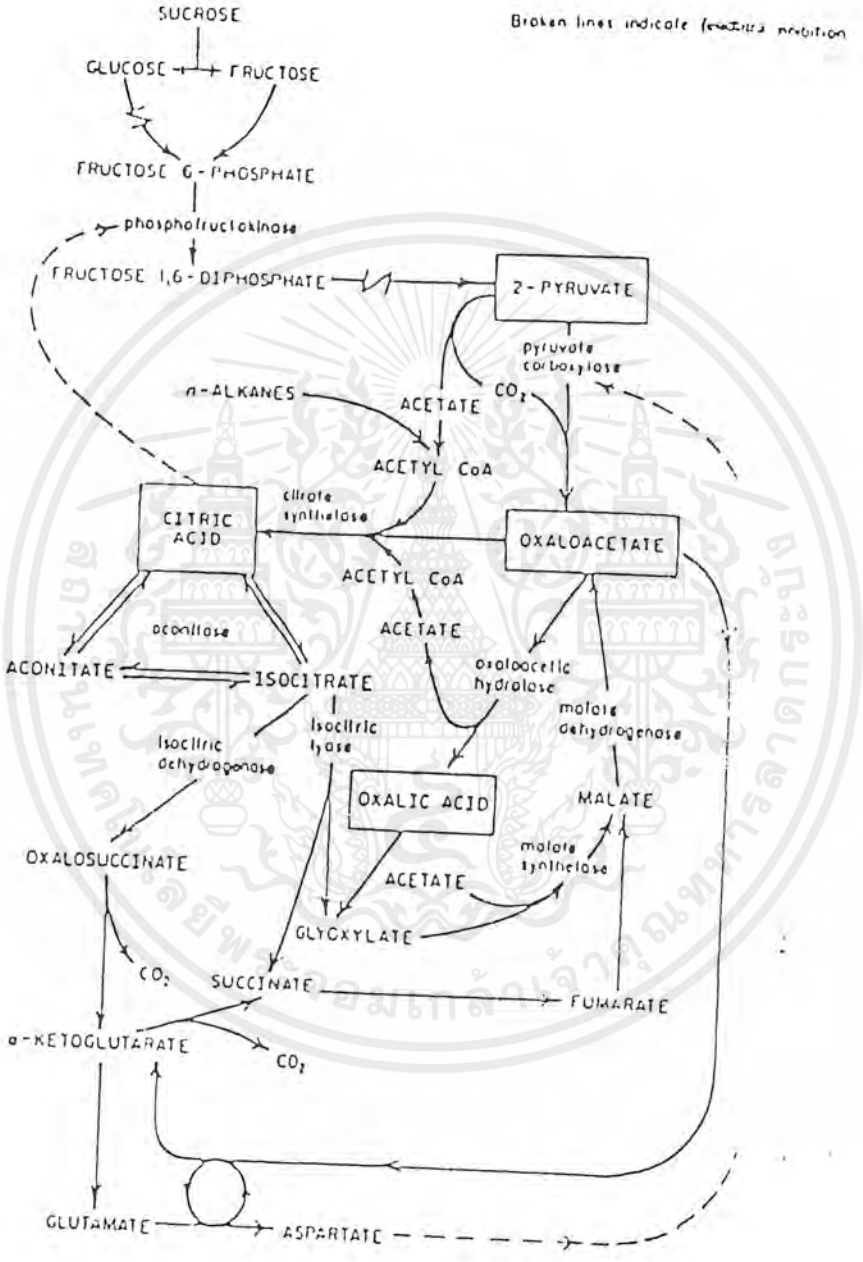
ในเชื้อรา *A. niger* น้ำตาลกลูโคสประมาณร้อยละ 80 จะถูกสลายโดยผ่านกระบวนการ Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) ส่วนน้ำตาลกลูโคสที่เหลือผ่านขบวนการ pentose phosphate (PPP) เพื่อได้เป็นไพรูเวท (pyruvate) จากนั้นไพรูเวทจะปลดปล่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนไดออกไซด์ และสร้างออกซาโลอะซิเตท (oxaloacetate) และอะซีติล-โคเอ (acetyl-CoA) ที่เกิดขึ้นมีการรวมกันได้กรดซิตริก โดยมี citrate synthetase เป็นตัวเร่งปฏิกริยา และเข้าสู่ระบบ tricarboxylic acid โดยศึกษาสมดุลสารในขบวนการที่มีไพรูเวทเป็นสารตั้งต้น พบว่ามีปริมาณกรดซิตริก กรดออกซาลิก และคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มมากขึ้น จากการวิเคราะห์ทำให้ทราบว่ามีกลไกของเมตาบอลิซึม 2 แบบโดยแบบแรกเหมือนกับที่ศึกษาโดย Cleland และ Johnson (1954) แบบที่สองเกี่ยวข้องกับการเกิด carboxylation ของไพรูเวท 2 โมเลกุล เกิดเป็นออกซาโลอะซิเตท 2 โมเลกุล หลังจากนั้นออกซาโลอะซิเตทหนึ่งโมเลกุลจะถูกย่อยสลายเป็นกรดออกซาลิก (oxalic acid) และอะซิเตท (acetate) โดยการทำงานของเอนไซม์ oxaloacetate hydrolase ซึ่งอะซิเตทที่ได้จะรวมกับออกซาโลอะซิเตทที่เหลืออีกหนึ่งโมเลกุล เกิดเป็นกรดซิตริกขึ้น จากข้อเสนอนี้พบว่ากรดออกซาลิกที่ได้จะถูกรีดิวซ์เป็นไกลออกซาเลท (glyoxylate) ซึ่งจะรวมตัวกับซัคซิเนต (succinate) โดยการทำงานของเอนไซม์ isocitrate lyase เกิดเป็นไอโซซิเตรท (isocitrate) ซึ่งจะถูกเมตาบอไลซ์โดยเอนไซม์ในระบบ tricarboxylic acid เกิดเป็นซัคซิเนต พร้อมทั้งปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา 2 โมเลกุล ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกปล่อยออกมานี้จะใช้ในการเกิด carboxylation ของไพรูเวท 2 โมเลกุลต่อไป เมื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ระหว่างการหมักกรดซิตริก พบว่า กิจกรรมของ pyruvate carboxyase สูงมาก ระหว่างเกิดการผลิตกรดซิตริก ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงระบบ tricarboxylic acid อาจสรุปได้ว่าขั้นตอนสำคัญในการผลิตกรดซิตริก คือการผลิตออกซาโลอะซิเตรทออกมามากผิดปกติ เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ pyruvate carboxylase และ citrate synthetase ใช้ออกซาโลอะซิเตรทที่เกิดขึ้นเปลี่ยนเป็นกรดซิตริก นอกจากนั้นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้กรดซิตริกที่ผลิตขึ้นไม่ถูกใช้ไปคือ การขาดเอนไซม์ aconitase, isocitrate lyase และ isocitrate dehydrogenase หรือการที่เอนไซม์ดังกล่าวมีกิจกรรมเพียงเล็กน้อย (Verhoff และ Spradlin, 1976)

A. niger ไม่เพียงแต่จะผลิตกรดซิตริกเท่านั้น ยังสามารถผลิตกรดออกซาลิกและกลูโคนิค (gluconic) ได้อีก ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ การสังเคราะห์กรดซิตริกโดย *A. niger* เป็นการขนส่งออกไปนอกวัฏจักร kreb's cycle ดังแสดงในรูปที่ 2-3 (Milsom และ Meers, 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2-3 วิถีเมตาบอลิซึมการสังเคราะห์กรดซิตริก

ที่มา : Milsom และ Meers (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. จลนศาสตร์การผลิตกรดซิตริก

การผลิตกรดซิตริกเป็น type II fermentation ซึ่งมีลักษณะสำคัญคืออัตราการเจริญและอัตราการผลิตกรดซิตริกมีค่าสูงสุดแยกออกจากกันเป็น 2 ช่วง โดยในระหว่างการเจริญ (trophopase) จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นจำนวนมากและมีการผลิตกรดซิตริกออกมาน้อย หลังจากนั้นในช่วง Stationary phase (Idiophase) จะมีการเจริญเพียงเล็กน้อยแต่มีการผลิตกรดซิตริกสูง (Gaden, 1955)

Kubicekและ Rohr (1986) ได้อธิบายการสร้างสมการแสดงอัตราการผลิตกรดซิตริกดังนี้

$$\left(\frac{dp}{dt}\right)t = k_1\left(\frac{dx}{dt}\right)t - t_m + k_2(x) - t_m$$

โดย p = ความเข้มข้นของกรดซิตริก (กรัม/ลิตร)

x = ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัม/ลิตร)

t_m = lag timeที่ต้องการเพื่อให้เซลล์เข้าสู่ระยะที่มีการผลิตกรดซิตริก

k_1, k_2 = ค่าคงที่ (1.9 และ 0.9) ตามลำดับ

$$\left(\frac{dp}{dt}\right)\left(\frac{dp}{ds}\right)\left(\frac{ds}{dx}\right)\left(\frac{dx}{dt}\right) = k_1\left(\frac{dx}{dt}\right)$$

$$k_1 = \left(\frac{dp}{ds}\right)\left(\frac{ds}{dx}\right) = Y_{p/s} \cdot Y_{x/s}^{-1}$$

ถ้า $Y_{p/s}$ = 0.8 และ $Y_{x/s}$ = 0.4 จะได้ค่า k_1 ที่สูงสุดคือ 2.0 ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลอง จึงอาจสรุปได้ว่าถ้าการผลิตกรดซิตริกในช่วงแรกของการหมักเกิดขึ้นด้วยอัตราเร็วสูงสุด ค่า k_2 ขึ้นกับ physiological state ของเส้นใย

เมื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์ต่างๆ ระหว่างการหมักกรดซิตริกพบว่ามีกิจกรรมของ pyruvate carboxylase และ oxaloacetic hydrolase สูงมากระหว่างเกิดการผลิตกรดซิตริกและออกซาเลต (Verhoff และ Spradlin, 1976) แต่เมื่อเริ่มมีการสะสมกรดซิตริกขึ้นจะไม่พบกิจกรรมของ oxaloacetic hydrolase (Joshi และ Ramakrishnan, 1959), citrate lyase และ α-ketoglutarate dehydrogenase (Kubicek และ Rohr, 1977) ในขณะที่ Muller (1967) ไม่พบกิจกรรมของ oxaloacetic hydrolase ในระหว่างการหมักกรดซิตริกเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม (อรพิน, 2526)

กรดซิตริกที่ผลิตเป็นการค้าในปัจจุบัน จะใช้กรรมวิธีการหมักเป็นส่วนใหญ่ และกรรมวิธีในการผลิตของแต่ละโรงงานจะถือเป็นความลับ ดังนั้นจึงมีรายละเอียดที่รายงานออกมาไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามจากรายงานสั้นๆ ที่ทางโรงงานได้จดลิขสิทธิ์ไว้ ทำให้ทราบเรื่องราวการผลิตกรดซิตริกบางส่วน กรรมวิธีการผลิตที่สำคัญมีอยู่ 3 วิธี ด้วยกันคือ

1. การผลิตกรดซิตริกแบบ Koji fermentation process (surface culture method) ขบวนการผลิตกรดซิตริกด้วยวิธี Koji นั้น ได้เริ่มทำกันในประเทศญี่ปุ่น โดยได้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากพวกของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ใส่อาหารลงในถาดแล้วทำการฆ่าเชื้อในอาหาร ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ประมาณ 1.0-8.0 เซนติเมตร หลังจากอาหารเย็นลงจึงใส่สปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* ลงในถาดอาหาร ถาดอาหารเหล่านี้จะเก็บไว้บนชั้นในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ในขณะเดียวกันก็ให้อากาศส่วนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผ่านเข้าไปบนถาดเลี้ยงเชื้อ เชื้อราก็จะเจริญ ซึ่งจะเห็นเส้นใยของเชื้อรา ในระยะหลัง กรรมวิธีการให้อากาศเข้าไปนั้น อาจจะเป่าค่อยๆ ตลอดเวลา หรืออาจจะให้อากาศเข้าไปเป็นระยะๆ ก็ได้ ตัวอย่างของวัตถุดิบที่จะนำมาใช้เลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริกเช่น พวกรำข้าวต่างๆ เศษเหลือของมันเทศ ในกรณีที่วัตถุดิบที่ใช้เป็นเศษเหลือของมันเทศ (sweet potato) หรือรำข้าวสาลี จะมีโลหะบางชนิดที่จะไปป้องกันการสะสมกรดซิตริกในขบวนการหมัก โลหะเหล่านี้ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส โคบอลท์หรือนิกเกิล ดังนั้น จึงควรจะต้องคัดเลือกสายพันธุ์ *Aspergillus niger* ที่ทนต่อโลหะเหล่านี้สำหรับการผลิตกรดซิตริกที่ใช้เศษเหลือจากการแยกแป้งออกไปจากมันเทศ เศษเหลือเหล่านี้ก็คือพวกเยื่อใยในกรณีนี้จำเป็นจะต้องเติมรำข้าวลงไปด้วย ในอัตราส่วนต่างๆ ระหว่างวัตถุดิบทั้งสองชนิดนี้ เมื่อทำการฆ่าเชื้ออาหารและใส่สปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* และเก็บไว้ให้เชื้อเจริญ ในระหว่างนี้ในอาหารนั้นจะมีน้ำตาลเกิดขึ้น เนื่องจากเชื้อราผลิตเอนไซม์ amylase และเอนไซม์ที่จะไปย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นเชื้อราจะเปลี่ยนน้ำตาลนั้นให้เป็นกรดซิตริก

ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื่อเพื่อผลิตกรดซิตริกนั้นอุณหภูมิใน solid mass ไม่ควรจะเกิน 28 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงมาอยู่ที่ความเป็นกรด-ด่างราว 1.8-2.0 ในขณะที่เกิดมีการสะสมกรดซิตริกในขบวนการหมัก หลังจากเลี้ยงได้ 5-8 วัน จึงนำ solid mass ที่มีเชื้อราขึ้นนั้นมาแยกเอากรดซิตริกออก โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ไปละลายกรดซิตริกให้แยกออกจาก solid mass แล้วจึงทำการแยกสารละลายกรดซิตริกออก นำไปทำให้บริสุทธิ์ การผลิตกรดซิตริกโดยวิธีนี้สามารถที่จะผลิตได้ประมาณ 2 ล้าน 5 แสน กิโลกรัมในปี 1966 Hisanga และ Nakamura (Japan patent 16555/66,1966) พบว่าถ้าหากได้เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

filter cake ที่ได้จากโรงงานผลิตกรดกลูตามิค (glutamic acid) ในปริมาณร้อยละ 3-7 จะทำให้ประสิทธิภาพผลิตกรดซิตริกดีขึ้น

บางครั้งอาจจะผลิตกรดซิตริกโดยเติมเอนไซม์ลงไป ซึ่งสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จะปรับความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 4-5 และความชื้นประมาณร้อยละ 70-80 หลังจากได้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำและขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงบางครั้งอาจจะเติมเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำการย่อยแป้งแล้วทำให้อุณหภูมิลดลงถึง 30-35 องศาเซลเซียส จึงใส่สปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* ลงในอาหารที่เตรียมไว้ความหนาของ solid mass ในถาดประมาณ 3-5 เซนติเมตร สำหรับข้อดีของการใช้เอนไซม์ไปช่วยในการย่อยแป้งนั้นคือทำให้สามารถจะใช้อาหารต่อถาดมากขึ้นโดยไม่ต้องมีการเติมของเสียจากการหมักกรดกลูตามิค

2. <u>การผลิตกรดซิตริกแบบ liquid culture shallow pan process (surface liquid culture)</u> ในสมัยก่อนการผลิตกรดซิตริกในประเทศยุโรปและอเมริกามักจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (culture solution) เทลงในถาดนั้นๆ ซึ่งโรงงานที่ผลิตโดยวิธีนี้จะต้องใช้เนื้อที่ของโรงงานมากกว่า 30 เอเคอร์และถาดที่ใช้จะทำจากโลหะอลูมิเนียมที่มีความบริสุทธิ์สูง หรือเป็นโลหะพวกเหล็กปลอดสนิมเพื่อเลี่ยงปัญหาการสึกกร่อนและการปลอมแปลงของพวกแร่ธาตุ (trace element)

สำหรับหัวเชื้อที่ใช้นั้นโดยทั่วไปมักจะเตรียมโดยใช้ surface liquid medium เพื่อการเลี้ยงสปอร์ของเชื้อราโดยเฉพาะ จะทำการเลี้ยงโดยใช้เวลาประมาณ 9 วัน แล้วจึงถ่ายไปยังสารละลายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อทำการหมัก (sterile fermentation solution) แล้วทำสปอร์นั้นกระจายอยู่ในสารละลายดังกล่าวหลังจากนั้นจึงถ่าย inoculum medium ที่มีสปอร์ของเชื้อรากระจายอยู่นั้นไปยังถาดหมัก (fermentation pan) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซิตริก ในบางครั้งอาจจะไม่ต้องเตรียม inoculum medium แต่จะใช้วิธีเป่าให้สปอร์ของเชื้อราลงไปยังถาดหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกโดยตรงก็ได้

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดซิตริกด้วยวิธี surface liquid culture นั้นแหล่งคาร์บอนที่ใช้มักจะเป็นพวกกากน้ำตาลจากอ้อยหรือจากหัวบีท แต่น้ำตาลบริสุทธิ์ ก็นำมาใช้ได้เช่นเดียวกัน การเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตกรดซิตริกที่จะให้ได้ปริมาณกรดซิตริกสูง ความเข้มข้นของน้ำตาลที่จะให้ผลิตผลของกรดซิตริกสูงนั้น ควรจะใช้น้ำตาลประมาณร้อยละ 14-20 นอกจากกรณีนี้พวกแร่ธาตุ หรือฟอสเฟตก็มีความจำเป็นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *Aspergillus niger* ที่ใช้ อาหารที่ใช้ควรจะมีฟอสเฟตเพียงพอ โลหะอื่นๆ ก็มี เหล็ก สังกะสี ทองแดง ซึ่งโลหะเหล่านี้ไม่จำเป็นต้องมีครบทุกชนิด อาจจะมีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไป fermentation medium จะประกอบด้วยกากน้ำตาล (molass) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ในระหว่างร้อยละ 10-20, NH_4NO_3, $MgSO_4$ และ KH_2PO_4 และความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะปรับให้อยู่ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 2.5-4.0 โดยใช้กรด H_2SO_4 สำหรับแร่ธาตุชนิดอื่นๆ มักจะมีมากอยู่ในวัตถุดิบที่ใช้และมีอยู่ในปริมาณเพียงพอ แต่ในบางครั้งแร่ธาตุจะมีปริมาณสูงเกินไปในวัตถุดิบที่ใช้ เช่น กากน้ำตาลจากหัวบีท ในกรณีนี้ต้องทำการลดปริมาณโลหะก่อน โดยการทำ pretreatment กับ ferriccyanide เพื่อจะรวมตัวกับโลหะ เหล็ก หรืออาจจะ preteat invert molass ด้วย cation-exchange resin ก็ได้ ซึ่งมักจะใช้กับการผลิตกรดซิตริกโดยวิธี submerged-aerated citric acid fermentation

ความสมดุลย์ของโลหะในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดซิตริกในปริมาณสูงนั้นมีความสำคัญยิ่ง ดังนั้นในบางครั้งจึงอาจจะมีการเติมแมงกานีสลงไปด้วย ตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกประกอบด้วย molass 250 กรัม, NH_4NO_3 0.05 กรัม, KH_2PO_4 0.5 กรัม และ $MgSO_4$ .H_2O 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร และปรับความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย HCl หรือ H_2SO_4 ให้อยู่ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 3.5

เมื่อทำการเลี้ยงสปอร์ใน fermentation medium ได้ 24 ชั่วโมง จะเห็นเยื่อสีขาวของเส้นใยปกคลุมบนพื้นผิวของสารละลาย แล้วจึงให้อากาศชื้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผ่านเข้าไป ซึ่งอากาศนี้มีอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส การผ่านของอากาศจะให้ผ่านสู่ผิวของสารละลายอย่างช้าๆ หลังจากนั้น 5-6 วัน ก็ไม่จำเป็นต้องให้อากาศชื้นติดต่อกันอีก เมื่อถึงช่วงนี้จะเห็นเส้นใยยาวจับกันเป็นแผ่นอยู่บนพื้นผิวของ fermentation medium หลังจากใส่สปอร์ลงไปแล้ว 8-10 วัน ปริมาณน้ำที่อยู่ใน culture solution จะลดลงจากระยะเริ่มต้นไปประมาณร้อยละ 20 ระดับความเข้มข้นของกรดจะสูงสุดในช่วงนี้ จะทำให้ได้ปริมาณกรดซิตริกความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำได้สองวิธีคือ การใช้ขบวนการการหมักที่เหมาะสม (fermentation process) และใช้วิธีการระเหย (evaporation process)

ในระหว่างขบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกถ้าหากความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็นความเป็นกรด-ด่าง 3.5 ก็จะต้องคิดว่าอาจมีกรดชนิดอื่นปนมาในขบวนการหมัก เช่น อาจจะเป็นกรดออกซาลิก กรดกลูโคนิก ซึ่งจะไปทำให้กรดซิตริกที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเหล็กปนมาด้วยในปริมาณไม่เหมาะสมนั้น จะทำให้เกิดกรดออกซาลิก เกิดเม็ดสี (pigment) และการงอกของสปอร์ (sporulation) สำหรับการงอกของเส้นใยจะเกิดการสะสมกรดซิตริกได้น้อย เชื้อรา *Aspergillus niger* ส่วนใหญ่จะให้เม็ดสีเขียว หรือสีเหลืองในเส้นใย เมื่อเกิด sporulating pigment เหล่านี้จะขับออกจากเซลล์มาใน culture solution เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มความยุ่งยากต่อการทำให้เกิดกรดซิตริกบริสุทธิ์ ปริมาณของกรดซิตริกที่ผลิตขึ้นได้แบบ surface liquid จะได้ประมาณร้อยละ 80-85 ของน้ำหนักคาร์โบไฮเดรตที่เริ่มต้นใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยว มีประมาณร้อยละ 90 ของปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตขึ้น

3. การผลิตกรดซิตริกแบบ Submerged fermentation process ปัจจุบันได้พยายามพัฒนาการผลิตกรดซิตริก โดยใช้วิธี Submerged fermentation process ซึ่งเป็นกรรมวิธีการผลิตในขั้นอุตสาหกรรม ขบวนการผลิตโดยทั่วไปก็อาศัยหลักการเลี้ยงเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus niger* ในถังลึกที่มีอาหารสำหรับการผลิตกรดซิตริก วิธีการผลิตกรดซิตริกโดยใช้ถังหมักนี้ได้ใช้ผลิตเป็นอุตสากรรมในหลายๆประเทศ เช่น บริษัท Miles Laboratories ในประเทศอเมริกา ในประเทศอิสราเอล และบริษัท John E. Sturge Ltd. ในประเทศอังกฤษ

สำหรับวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกแบบ submerged fermentation process ได้ดีนั้นสามารถใช้น้ำเชื่อมเข้มข้นที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง น้ำอ้อยเข้มข้นที่มีความเข้มข้นของ sucrose inverted ประมาณ 2/3 นอกจากนี้ยังอาจจะใช้เอนไซม์ hydrolyzate ของธัญญาพืช พวกข้าวโพด ข้าวฟ่าง หรือแป้งมันเทศ (Swartove, 1996) ในกรณีที่เป็นเอนไซม์ hydrolyzate วัตถุดิบที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ จะต้องมีปริมาณของน้ำตาลอยู่ระหว่าง 15-20 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นน้ำเชื่อมที่ใช้ต้องกำจัดประจุบวกต่างๆ โดยให้น้ำเชื่อมผ่าน sulphonate ion exchange resin ที่อยู่ในรูปของ hydrogen form สารละลายที่ผ่าน ion exchange resin แล้วจะมีลักษณะเป็นกรดมากขึ้น ดังนั้นจึงต้องเติมแอมโมเนียมเพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ระหว่าง 2-4 ในขณะเดียวกันจะมีการเติม $CUSO_4$ เพื่อการเจริญของเชื้อรา และเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์เพื่อให้เกิดการสะสมกรดซิตริก หลังจากนั้นจะถ่ายเชื้อลงในอาหาร สำหรับผลิตกรดซิตริกแบบปลอดเชื้อ inoculum culture นั้นจะเป็นแบบแข็งหรือเหลวก็ได้ ส่วนอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจะให้ผ่านเข้าไปในใน fermentation solution และให้ขบวนการหมักเกิดขึ้นจนได้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด ในการหมักนี้ปริมาณออกซิเจนที่ต้องการนั้นมีน้อยมาก แต่ถ้าหากได้มีการหยุดการให้อากาศระยะหนึ่ง การผลิตกรดซิตริกก็จะหยุดชะงักด้วย และอาจจะผลิตกรดซิตริกขึ้นมาใหม่แบบช้าๆ และจะผลิตมากขึ้นต่อไปอีกได้ก็ต่อเมื่อได้ปรับความเป็นกรด-ด่างใหม่และเติมไนโตรเจน หลังจากที่เชื้อราเจริญใน fermentation solution ความเป็นกรด-ด่างในนั้นไม่ควรจะเกินความเป็นกรด-ด่าง 3.5 เพราะอาจมีกรดชนิดอื่นปะปนมาด้วย สำหรับเรื่องการกวน (agitation) เพื่อให้ออกซิเจนกระจายอย่างเพียงพอนั้นก็ไม่จำเป็นในกรณีนี้ เพราะช่วงระยะเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของขบวนการหมักนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลในตอนต้นที่ใช้ด้วย แต่ในบางครั้งก็อาจจะมีการเติมน้ำตาล จุลินทรีย์และตัวยับยั้งเอนไซม์ ส่วนเวลาของขบวนการหมักจะใช้ประมาณ 5-14 วัน

ส่วนในด้านเกี่ยวกับการควบคุมฟองที่เกิดขึ้นในระหว่างขบวนการหมักนั้น สามารถทำได้โดยการเติมสาร antifoam ลงไปเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารล้นออกนอกถังหมัก ซึ่งจะเป็นอนุพันธ์ของ sulphonate fatty acid ของ sorbitan (tween) หรือพวกน้ำมันพืชหรือน้ำมันหมู ปริมาณ antifoam ที่ใช้นั้นควรจะใช้เท่าที่จำเป็น

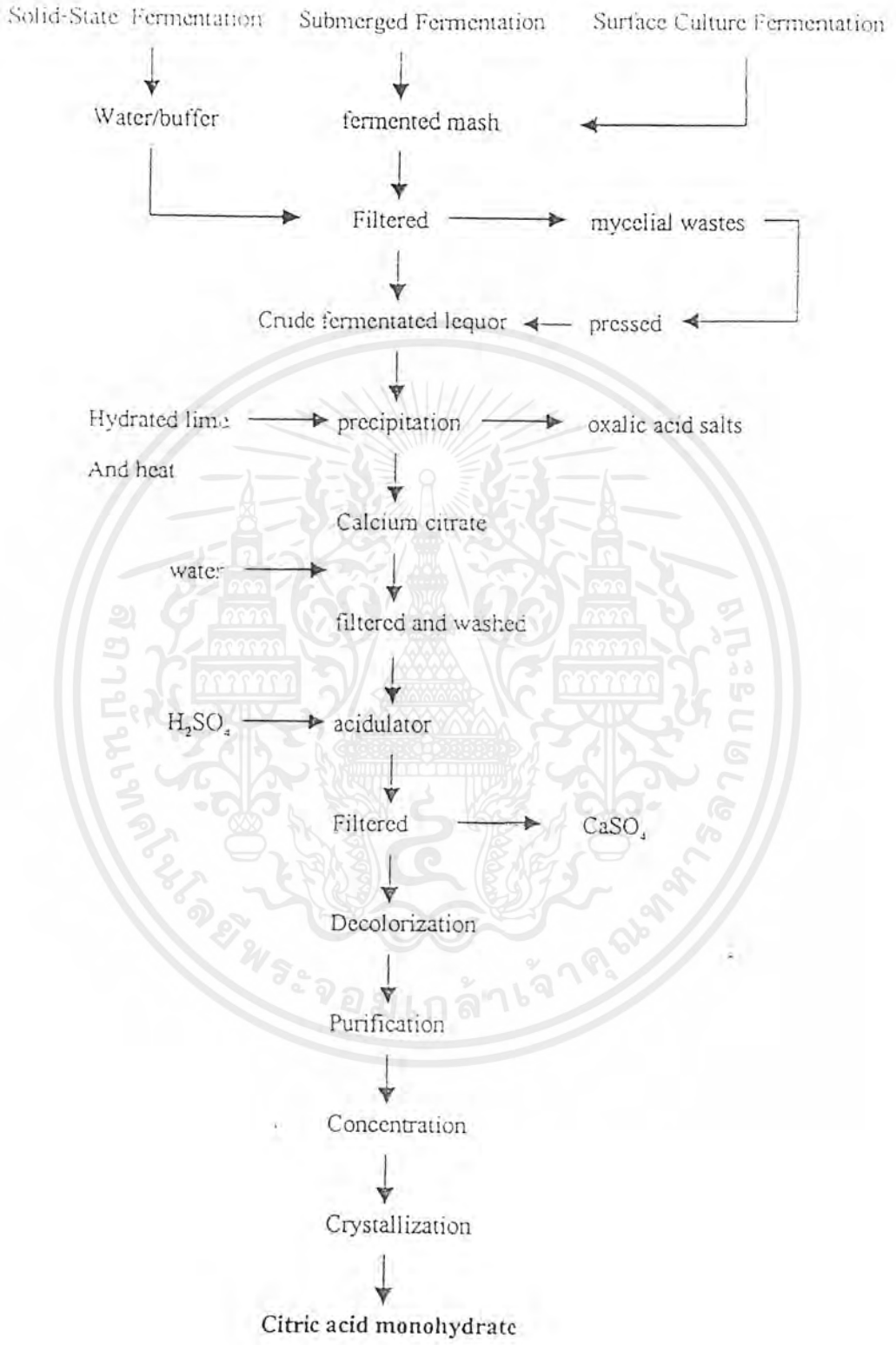
ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตขึ้นได้โดยวิธี submerged fermentation process สามารถผลิตกรดได้ถึงร้อยละ 95 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ในทางการค้านั้นก็ไม่ทราบว่าจะสามารถผลิตได้ถึงขั้นนี้หรือไม่ โดยทั่วไปแล้วปริมาณการผลิตจะอยู่ในช่วงร้อยละ 70-90 ในเวลา 8-10 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Schierholt, 1977)

<u>8. การแยกกรดซิตริก</u> (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2523)

ตามปกติในกระบวนการหมักมีขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอน ซึ่งประกอบด้วยการเตรียมวัตถุดิบ การหมักและการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ตามธรรมดาแล้วถ้าทำการหมักจนได้ผลผลิตสูง แต่ถ้าวิธีการที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวที่ไม่เหมาะสม ก็จะทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตลดต่ำลงอีกเช่นกัน

ในกรณีการเก็บเกี่ยวกรดซิตริกออกมาจากน้ำหมักแสดงในรูปที่ 2-4 เริ่มต้นด้วยการแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกมาจากน้ำหมักก่อน (ในกรณีที่ใช้การหมักในกระบวนการหมักที่เชื้อเจริญที่ผิวของอาหารและกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว) หรือต้องทำการสกัดเอากรดซิตริกด้วยน้ำหรือบัฟเฟอร์ออกมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักโดยกระบวนการหมักในสภาพอาหารแห้ง แล้วจึงกรองแยกเอาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ออกก่อน จากนั้นจึงนำน้ำหมักที่ได้มาผ่านกระบวนการตกตะกอน (precipitation) โดยในช่วงแรกทำการตกตะกอนกรดออกซาลิกออกมาด้วยน้ำปูนใส (hydrated-lime) ปริมาณเล็กน้อยและปรับอุณหภูมิประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมน้ำปูนขาวลงไปอีก ในอัตราส่วนน้ำปูนขาว 1 ส่วนต่อน้ำหมัก 2 ส่วน โดยใช้เวลาในการเติมมากกว่า 1 ชั่วโมง ในขณะเดียวกันเพิ่มอุณหภูมิให้สูงถึง 95 องศาเซลเซียส การเติมปูนขาวในช่วงนี้จะทำให้กรดซิตริกตกตะกอนออกมาในรูปของเกลือแคลเซียมซิเตรท (calcium citrate) ซึ่งจะถูกกรองและล้างด้วยน้ำหลายครั้ง ๆ ก่อนที่จะส่งเข้าเครื่องเติมกรด (acidulators) โดยการเติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้าไปเพื่อแยกแคลเซียมออกไปในรูปของแคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$) แล้วกรองออกไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2-4 ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก lakshminarayans และคณะ (1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ส่วนสารละลายที่มีกรดซิตริกละลายอยู่ จะถูกนำไปกำจัดสี (decolourized) โดยถ่านกัมมันต์ แล้วจึงนำไปผ่านคอลัมน์เรซินแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange columns) เพื่อทำให้กรดซิตริกที่ได้บริสุทธิ์ปราศจากสิ่งเจือปน (impurities) ก่อนที่จะนำไปทำให้เข้มข้น (concentrated) ภายในสภาพสุญญากาศ แล้วจึงผ่านขั้นตอนการตกผลึก (crystallization) และขั้นตอนทำแห้ง ซึ่งจะได้กรดซิตริกในรูป citric acid monohydrate ออกมาในที่สุด

สำหรับการหมักเพื่อผลิตกรดด้วยเชื้อยีสต์ เช่น *Candida* นอกจากกรดซิตริกที่ถูกสร้างขึ้นมาแล้ว มักจะมีกรดไอโซซิตริกปนออกมาด้วยเสมอ ดังนั้นในการเก็บเกี่ยวผลผลิต จึงจำเป็นต้องแยกกรดทั้งสองออกจากกันทั้งนี้สามารถทำได้โดยการเติมปูนขาว (ในรูปของแคลเซียมไฮดรอกไซด์: $Ca(OH)_2$) ในอัตราส่วน 3:3 ส่วนของน้ำหมักที่แยกเชื้อออกไปแล้ว และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 85-90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะทำให้กรดไอโซซิตริกตกตะกอนลงมา จากนั้นจึงนำทั้งเกลือซิเตรทและเกลือไอโซซิเตรทไปผ่านกระบวนการเก็บเกี่ยวดังที่กล่าวมาแล้ว

ในกรณีที่ต้องการให้กรดซิตริกอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม หรือโพแทสเซียมซิเทรทสามารถทำได้โดยการเติมร้อยละ 15 ของ NaOH หรือร้อยละ 15 ของ KOH ในปริมาณที่มากเกินพอในช่วงอุณหภูมิ 95-98 องศาเซลเซียส แล้วจึงผ่านกระบวนการต่าง ๆ จนถึงการตกผลึกก็จะได้เกลือซิเทรททั้งสองรูปออกมา

9. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก

การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่วัตถุดิบที่ใช้จะเป็นประเภท น้ำตาล และแป้ง สำหรับแป้งใช้ใน 2 รูปแบบคือ solid state และย่อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคสในการหมักในอาหารเหลว แป้งที่นำมาผลิตกรดซิตริกอาจจะเป็นแป้งจากธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง แป้งมันสำปะหลัง รำข้าว แกลบ สำหรับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ซูโครส มอลโทส หรืออาจใช้กาก น้ำตาลที่มาจากอ้อยและหัวบีท และใช้น้ำผลไม้ เช่น สับปะรด น้ำมะพร้าว และน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (Astons และคณะ, 1996; El-chariot และคณะ, 1995; Hang และคณะ, 1989; Somas และคณะ,1994) นอกจากนี้ยังมีการผลิตกรดซิตริกจากวัตถุดิบอื่นๆ เช่น เปลือกแข็งของเมล็ดกาแฟ (coffee husk) โดยใช้กระบวนการหมักแบบ solid state ด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* (Shankaranand and Lonsane, 1994) เปลือกของลูกแพร์ (pear peel) หมักแบบ solid state โดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger* (Gutierrz-Correa และคณะ, 1994) ใช้รำข้าวสาลี (wheat bran) หมักแบบ solid state โดยเชื้อ *Aspergillus niger* (Shankaranand and Lonsane, 1992) ใช้เปลือกส้ม (orange peel) (Lombardi and Zarizky,1996) ใช้ส่วนที่ได้จากการย่อยไซแลน (Xylan hydrolysate) หมักแบบ semi-solid โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
39887

เชื้อ *Aspergillus niger* (Kohtaro kirimura และคณะ,1999) ใช้หางนมของถั่วเหลือง (soy whey) หมักโดยเชื้อ *Aspergillus njger* (Khare และคณะ, 1994) ใช้เซลโลไบโอส (cellobiose) เป็นวัตถุดิบหมักโดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์มิวแตนท์ที่ต้านทาน 2-deoxyglucase หมักแบบ semisolid (Sarangbin และคณะ,1993) ซึ่งการผลิตกรดซิตริกจากวัตถุดิบต่างๆ แสดงในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 การผลิตกรดซิตริกโดย *Candida lipolytica* จากวัตถุดิบต่างๆ

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
Soyaabean 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

แอลกอฮอล์หลายชนิด เช่น เมทานอล (methanol), บิวทานอล (butanol), เอทานอล (ethanol) และ C 12-16 alchols สามารถใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน สำหรับการผลิตกรดซิตริก โดย *Candida fibrae, Candida subtropicalis, Pichia farinosa, Candida lipolytica* และ *Torulopsis xylinus* ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะใช้ร้อยละ 1-2 และเติมแอลกอฮอล์เรื่อยๆ ในระหว่างการหมัก นอกจากแอลกอฮอล์แล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วยแหล่งของไนโตรเจน แหล่งของฟอสเฟต และ trace elements เช่น เฟอรัสไอออน (Fe^{2+}), แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}), ซิงค์ไอออน (Zn^{2+}), แมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) และ คอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) โดย Ikeno และคณะ (1975) ใช้แอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกรดซิตริก ทำการหมัก 7 วัน พบว่าจะผลิตกรดซิตริก *Candida fibrae และ Candida subtropicalis* สามารถใช้อะซิเตทหรือแคลเซียมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซิตริกได้

ยีสต์หลายจีนัส เช่น Candida, Hansenula และ Pichia สามารถผลิตกรดซิตริกจากกรดไขมัน natural oils และ fats ได้ นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้ ไข น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันต้นแฟล็กซ์ น้ำมันปลา น้ำมันข้าวโพด และกรดไขมันอิสระ (free lipids acid) มีการทดลองผลิตกรดตริกโดย Ikeno (1975) สามารถผลิตกรดซิตริกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะพร้าว และส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้

น้ำมันมะพร้าวร้อยละ	5.0
$(NH_4)_2SO_4$ ร้อยละ	0.2
น้ำแช่ข้าวโพด ร้อยละ	0.26
KH_2PO_4 ร้อยละ	0.0125
$MgSO_4.7H_2O$ร้อยละ	0.01
$CaCO_3$ ร้อยละ	0.5
Antifoam ร้อยละ	0.5
Thiamin hydrochloride	100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในบางครั้งมีการใช้ polyhydric alchols เช่น แมนนิทอล (manitol), ซอบิทอล (sorbitol) หรือ อิริทิออล (erythriol) ในระยะเริ่มต้นของกระบวนการหมัก n-paraffin culture medium ที่มี neutralizing agent เช่น $CaCO_3$ (Tabuchi และ Hara 1973) โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี neutralizing agent ปริมาณของซิเตรตจะลดลงและพบว่าความเข้มข้นของไทอะมิน (thiamine) ในอาหารที่ใช้ในการผลิตจะมีผลต่อการผลิตกรดซิตริกและไอโซซิตริก ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีไทอะมินในปริมาณที่เพียงพอจะมีการผลิตกรดซิตริกมาก แต่ถ้าขาดไทอะมินจะทำให้มีการผลิตคีโตกลูตาเลท (ketoglutalate) มากและมีกรดซิตริกลดลง (จิระนันท์, 2533)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) Tabuchi และคณะ (1969) รายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดซิตริกจากอัลเคน (alkane) โดยเชื้อ *Candida lipolytica* ประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนร้อยละ 4-6, NH_4Cl ร้อยละ 0.2, KH_2PO_4 ร้อยละ 0.05, $MgSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.05, น้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 0.1 และ $CaCO_3$ ร้อยละ 30 เมื่อหมักเป็นเวลา 6-8 วัน โดยมีการเขย่าจะผลิตกรดซิตริกได้ร้อยละ 17-56 ขึ้นอยู่กับชนิดของอัลเคน

การผลิตกรดซิตริกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี lead salt เป็นองค์ประกอบได้มีการศึกษาโดย Pfizer (1971) ใช้ *Candida guilliermondii* ผลิตกรดซิตริกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย cerelose 150 กรัม, NaCl 4 กรัม, ยีสต์สกัด 5 กรัม, เปปโตน (peptone) 15 กรัม, $CaCO_3$ 10 กรัมและ lead acetate 1.5 กรัม ต่อลิตร หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศจะผลิตกรดซิตริกได้ 53 กรัมต่อลิตร แต่ถ้าไม่มี lead salt จะผลิตกรดซิตริกได้ 29 กรัม

10. จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดซิตริก (วราวุฒิ และ รุ่งนภา, 2532)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้มีดังนี้

10.1 การผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อรา

ปัจจัยในการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา มีดังนี้

1.สายพันธุ์ของเชื้อรา

2. ชนิดของกระบวนการหมัก

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

สายพันธุ์ของราที่สามารถผลิตกรดซิตริกในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ *Aspergillus niger, A.awamori, A. fonsecaens, A. luchensis, A. wentii, A. saitoi, A. usami, A. fumaricus, A. phoenicus, A. flavus, Penicillium janthinellum, P. restrictum, Trichoderma viride, Mucor*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

piriformis และเชื้อราสายพันธุ์ Botrytis, Ascochyta, Absidia, Talaromyces, Acremonium และ Eupenicillium เป็นต้น

เชื้อราสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม คือ *Aspergillus niger* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ใช้ในการผลิตมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันทั้งนี้จะต้องเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบและปรับพีเอชให้อยู่ในระดับกรดในการใช้เชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริกนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการดังนี้คือ

1. การปฏิบัติงานสามารถทำได้ง่าย
2. วัตถุดิบที่เชื้อราสามารถใช้เพื่อผลิตกรดซิตริกมีราคาถูก
3. ผลิตผลที่ได้มีปริมาณสูงและมีความคงตัว

10.2 การผลิตกรดซิตริกโดยยีสต์

เชื้อยีสต์หลายชนิดที่พบว่ามีการสะสมกรดซิตริกในระหว่างการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อยีสต์ดังกล่าวได้แก่ 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) Oh และคณะ (1973) รายงานว่าการผลิตกรดซิตริกโดย *Hansenula anomala* ในร้อยละ 10 ของ glucose medium ที่มี $CaCO_3$ ร้อยละ 3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที และเติม KH_2PO_4 ร้อยละ 0.05, $MnSO_4$ ร้อยละ 0.025 และ NH_4Cl ร้อยละ 0.1 หมักเป็นเวลา 6 วัน จะผลิตกรดซิตริกได้ร้อยละ 46

มีรายงานว่ายีสต์จีนัส Candida สามารถใช้วัตถุดิบเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซิตริกได้หลายชนิด โดยเชื้อ *C. lipolytica* 281 (ATCC 20346) และสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์นั้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสร้อยละ 17.3 เอ็น-พาราฟินและน้ำมะพร้าวร้อยละ 5 ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการผลิตกรดซิตริกและกรดไอโซซิตริกเป็น 2 ต่อ 1 เมื่อใช้น้ำมะพร้าวและเอ็น-พาราฟิน ถ้าใช้สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ N-5704 จะมีอัตราการผลิตกรดซิตริกและกรดไอโซซิตริกเป็น 44 ต่อ 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเอ็น-พาราฟิน และถ้าใช้สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ N-2484 จะมีอัตราการผลิตกรดซิตริกและกรดไอโซซิตริกเป็น 62 ต่อ 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกลูโคส สำหรับผลผลิตของสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ของ N- 5704 จากวัตถุดิบอื่น ๆ นอกจากนี้ยังสามารถใช้แอลกอฮอล์หลายชนิด เช่น เอทานอล เมทานอล บิวทานอล รวมถึงแอลกอฮอล์ที่มี 12-16 คาร์บอน ซึ่งเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนรูปนี้ เช่น *Candida fibrae C. subtropicalis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Torulopsis xylinus เป็นต้น โดยทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลกอฮอล์ประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ จะได้กรดซิตริกประมาณ 28 กรัมต่อลิตรภายใน 7 วัน

ส่วน Ishic และคณะ (1972) ใช้ *C. oleophila* ในการผลิตกรดซิตริกจาก waste glucose (กลูโคส ร้อยละ 32.6 และ ฟรุกโทส ร้อยละ 3) ที่ได้หลังจากการแยก ฟรุกโทสออกจาก สารละลายผสมกลูโคส-ฟรุกโทส แล้วเติม ยูเรีย, น้ำแช่ข้าวโพด, KH_2PO_4, $MnSO_4$ และ $CaCO_3$ หมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยให้อากาศเป็นเวลา 5 วัน จะผลิตแคลเซียมซิเตรต ได้ร้อยละ 70.5

นอกจากนั้น Miall และ Parker (1975) สามารถผลิตกรดซิตริกได้จากกากน้ำตาลโดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องและใช้เชื้อ *Candida guilliermondii* และ *Candida lipolytica* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ประกอบด้วย กากน้ำตาลจากอ้อยหรือหัวบีท 50-250 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน คือ $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl หรือ NH_4NO_3 เกลือแร่ และวิตามินบีรวม ทำการหมักเป็นเวลา 189 ชั่วโมงให้อากาศ 0.3-1.5 v.v.m. ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5-6.5 และความเป็นกรด-ด่างจะคงที่ 2.8-4.0 ในระหว่างที่มีการผลิตกรดซิตริก พบว่ากากน้ำตาล 3,145 กิโลกรัม สามารถผลิต citrate monohydrate ได้ 119 กิโลกรัม

ข้อดีของการใช้ยีสต์ในการผลิตกรดซิตริก เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโดย *Aspergillus* คือสามารถใช้กระบวนการแบบต่อเนื่องในการผลิตได้

10.3 การผลิตกรดซิตริกโดยแบคทีเรีย (กำเนิด, 2534)

แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus licheniformis Bacillus subtilis* และ *Brevibacterium flavum* สามารถผลิตกรดซิตริกจากกลูโคส กรดไอโซซิตริกหรือไฮโดรคาร์บอนได้ (Saridinas, 1972) เช่น *B. licheniformis* ผลิตกรดซิตริกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน คือ ยูเรีย, แอมโมเนียมซัลเฟต หรือ กลูตาเมท และมี $CaCO_3$ ทำการหมักภายใต้สภาวะที่มีอากาศที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36-120 ชั่วโมง และความเป็นกรด-ด่าง 7.0 จะผลิตกรดซิตริกได้ 42 กรัมต่อลิตร Kyowa Fermentation Industries *Arthrobacter paraffinens* ผลิตกรดซิตริกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี dodecane หรือส่วนผสมของ C12-C14 paraffin และ salt ใช้เชื้อตั้งต้นร้อยละ 5 และให้อากาศ 3 v.v.m. ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลิตกรดซิตริกได้ 28 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ *Corynebacterium* sp. และ *Brevibacterium* sp. สามารถผลิตกรดซิตริกจากเอ็น-พาราฟินได้ 41.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้เวลาในการหมัก 64 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส Klebsiella, Aerobacter, Pseudomonas, Micrococcus, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacteriuum

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ Arthrobacter สามารถผลิตกรดซิตริกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดไอโซซิตริกร้อยละ 5.6 ความเป็นกรด-ด่าง 5-8 ใช้เวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 32-37 องศาเซลเซียสและมีการเขย่า

ส่วนมิวแตนท์ของ *Brevibacterium flavum* ที่ต้องการแอล-กูลตาเมท (L-glutamate) สำหรับเจริญสามารถผลิตกรดซิตริกได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสร้อยละ 3.6 ยูเรียร้อยละ 0.2 KH_2PO_4 ร้อยละ 0.01 $MgSO_4$ ร้อยละ 0.04 Sodium แอล-กูลตาเมท ร้อยละ 0.05 $CaCO_3$ ร้อยละ 1 Soybean hydrolyzate 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ วิตามิน บี 12 FeSO4 และ $MnSO_4$ ปริมาณเล็กน้อย หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ความเป็นกรด-ด่าง 7.4 จะผลิตกรดซิตริกได้ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร การผลิตกรดซิตริก โดยแบคทีเรีย แม้ว่าจะมีการศึกษาน้อยกว่าการผลิตจากเชื้อรา แต่เป็นหนทางใหม่ของการผลิตกรดซิตริก

11. **ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก** (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532)

สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา โดยเฉพาะการหมักในอาหารเหลวจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. ธาตุอาหาร (nutrient)
2. การแปรสภาพวัตถุดิบ (pretreatment of raw materials)
3. ความเป็นกรด-ด่าง
4. หัวเชื้อ (Inoculum)
5. การควบคุมสภาพการหมัก (Fermentation control)
6. สารกระตุ้น (Stimulants)
7. ฟองและ การควบคุม (Foaming problem and Control)
8. ปัจจัยอื่นๆ

1. **ธาตุอาหาร**

ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริกนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราและชนิดของการหมัก ซึ่งปกติแล้วเชื้อราสายพันธุ์ที่ใช้จะมีความจำเพาะต่อกระบวนการที่ใช้เท่านั้น ดังนั้นถ้าใช้เชื้อราสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกด้วยกระบวนการหมักที่ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ จะให้ประสิทธิภาพในการผลิตลดต่ำลงถ้านำไปใช้กับกระบวนการหมักในอาหารเหลวเป็นต้น

ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริกพอจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส (Carbon, Nitrogen and Phosphorus)

- แหล่งคาร์บอน

ในทางทฤษฎีแล้วน้ำตาลที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2-7 และซนิด 12 คาร์บอนสามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดซิตริกได้ (Prescott และ Dunn,1959) แต่น้ำตาลที่ดีที่สุดในการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* ก็คือ ซูโครส ถัดไปก็คือกลูโคสและฟรักโตส ตามลำดับ (Hossain และ คณะ, 1984) ส่วนน้ำตาลนมถูกเปลี่ยนเป็นกรดซิตริกได้น้อย(Hossain และคณะ, 1983) ในขณะที่กาแลคโตสไม่ให้กรดออกมาเลย แต่เชื้อเจริญได้ดีพอๆ กับเลี้ยงในซูโครส (Hossain และคณะ, 1984) ส่วน Miall (1978) ประสบผลสำเร็จจากการใช้กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้ง นอกจากนี้ยังอาจใช้กากน้ำตาลจากอ้อยหรือหัวผักกาดหวาน (beet) ก็ได้

ปริมาณของน้ำตาลที่ใช้โดยทั่วๆไป อยู่ในช่วง 140-200 กรัมต่อลิตร (Prescott และ Dunn, 1959) ส่วน Currie (1917) ใช้ซูโครสที่มีความเข้มข้น 125-150 กรัมต่อลิตรในการผลิตกรดซิตริก ทางด้าน Doelger กับ Prescott (1934) พบว่าเมื่อใช้ซูโครสเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตร จะได้ผลผลิตสูงสุดเมื่อดำเนินการหมักไป 9-12 วัน และยังพบอีกว่าถ้าใช้น้ำตาลเกิน 150 กรัมต่อลิตร จะเหลือน้ำตาลภายหลังการหมักสูงกว่าปกติ (ต่ำกว่า 30 กรัมต่อลิตร) เมื่อทดแทนซูโครสด้วยฟรักโตสหรือกลูโคส 10-50 กรัมต่อลิตร (จากจำนวนทั้งหมด 140 กรัมต่อลิตร) ปริมาณของกรดซิตริกที่ได้จะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักที่ใช้ซูโครสอย่างเดียว นอกจากนี้ซูโครสที่ถูกย่อยไปบางส่วนในระหว่างการนึ่งฆ่าเชื้อ จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลิตลดลงด้วย

สายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกมีความจำเพาะกับแหล่งคาร์บอนเป็นส่วนใหญ่ และมักจะสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เพียงชนิดเดียวที่ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด ดังเช่น การหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกในระยะแรกด้วยเชื้อ *Penicillium* sp.จะต้องใช้น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 10-12 เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นต้น ดังนั้นในการเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อใช้ในการหมัก จึงจำเป็นต้องศึกษาแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมควบคู่กันไปด้วย

การผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *A. niger* มีขั้นตอนที่เกี่ยวข้อง 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเจริญเติบโตของเชื้อ (growth stage) และขั้นตอนการหมัก (fermentation stage) ดังนั้นเชื้อราจึงจำเป็นจะต้องใช้ธาตุอาหารหลัก เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ รวมทั้งแร่ธาตุรอง (trace elements) สำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิตริก ดังนั้นความเข้มข้นส่วนประกอบเหล่านี้จึงส่งผลกระทบโดยตรงต่อผลผลิตของกรดซิตริกที่จะได้รับ

ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* (สายพันธุ์ที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน) จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้เหมาะสมซึ่งโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงร้อยละ 15-18 อย่างไรก็ตาม ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงกว่าร้อยละ 15-18 จะทำให้มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการหมัก (residual sugar) สูง ซึ่งจะเป็นการสิ้นเปลือง แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่ำเกินไปจะส่งผลให้ผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้ลดน้อยลง และในขณะเดียวกันจะเกิดการสะสมของกรดออกซาลิกด้วย (Kovats, 1960)

สำหรับส่วนประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* แสดงอยู่ในตารางที่ 2-5 กรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครสหรือกากน้ำตาลเป็นแหล่งวัตถุดิบเท่ากับ 2.0-3.0 หรือ 5.0-6.0 ตามลำดับ

ตารางที่ 2-5 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger*

องค์ประกอบ	ปริมาณ
น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด (กากน้ำตาล,ซูโครส)	ร้อยละ 14-15
แหล่งไนโตรเจน	ร้อยละ 0.25
KH_2PO_4	ร้อยละ 0.10-0.15
$MgSO_4.7H_2O$	ร้อยละ 0.02-0.025
ความเป็นกรด-ด่าง : อาหารเลี้ยงเชื้อจากกากน้ำตาล	5.0-6.0
อาหารเลี้ยงเชื้อจากซูโครส	2.0-3.0

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kapoor และคณะ (1982)

ตามปกติแล้วการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา มักต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท synthetic media ที่มีองค์ประกอบง่ายไม่ซับซ้อนอย่างเช่น แหล่งคาร์บอนที่ใช้กันได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำอ้อย แป้งจากแหล่งต่างๆ กากน้ำตาลจากอ้อย เป็นต้น ทั้งนี้น้ำตาลซูโครส หรือกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบที่นิยมใช้มากที่สุด กากน้ำตาลหรืออาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าน้ำเหลืองเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย ประมาณการว่าน้ำตาลทรายที่ผลิตขึ้นมาทุก 3 ตัน จะให้กากน้ำตาลประมาณ 1 ตัน แต่คุณสมบัติของกากน้ำตาลจะดีหรือไม่ดีขึ้นกับประสิทธิภาพของโรงงานน้ำตาลเป็นสำคัญ กากน้ำตาลแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ blackstrap molasses (กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 50-60) refinery molasses (กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์มีน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 48) และ hightest molasses หรือ invert molasses (กากน้ำตาลผลิตขึ้นมาโดยนำน้ำอ้อยมาเปลี่ยนรูปหรือ invert บางส่วนแล้วจึงนำไประเหยให้ข้นเป็นน้ำเชื่อม ดังนั้น hightest molasses จึงไม่ใช่กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทราย มีน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 70)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยส่วนใหญ่ตามโรงงานนิยมใช้กากน้ำตาลชนิดแรกเป็นวัตถุดิบ ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ แสดงได้ในตารางที่ 2-6 จะเห็นได้ว่าในกากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลซูโครสอยู่สูงและเหมาะสมในการใช้เป็นวัตถุดิบ อย่างไรก็ตามในการใช้กากน้ำตาลนี้อาจเกิดข้อเสียต่อการหมักทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณของเถ้า (ash) สูงซึ่งจะส่งผลยับยั้งประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริกได้ ในการหมักที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบนี้ เริ่มต้นด้วยการนำเอากากน้ำตาลมาเจือจางให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 15-20 และปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.5-6.5 ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง จากนั้นจึงเติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที ทำการถ่ายสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* เพื่อทำการหมักต่อไป

ตารางที่ 2-6 องค์ประกอบของกากน้ำตาล

องค์ประกอบ	ปริมาณที่ใช้ (ที่ร้อยละ 75 ของสารแห้ง)
น้ำตาลทั้งหมด :	48-56
ซูโครส	30-40
น้ำตาลรีดิวซ์	15-20
น้ำตาลที่หมักไม่ได้	2-4
สารอินทรีย์ที่ไม่มีน้ำตาล:	9-12
คาร์โบไฮเดรตที่สามารถละลายได้	4.0
สารอินทรีย์ เช่น กรดอโคนิติก	3.0
กรดซิตริก กรดมาลิก กรดซักซินิก เป็นต้น	trace
แวกซ์ ,สเตอรอล, เม็ดสี และวิตามิน	trace
สารประกอบไนโตรเจน เช่น โปรตีน	2-3
เถ้าซัลเฟต	10-15
โซเดียม	0.1-0.4
โพแทสเซียม	1.5-5.0
แคลเซียม	0.4-0.8
คลอไรด์	0.7-3.0
ฟอสฟอรัส	0.6-2.0

ที่มา : Paturau (1969)

- แหล่งไนโตรเจน

A. niger สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปเกลือต่าง ๆ Porgers (1932) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โซเดียมไนเตรตเข้มข้นร้อยละ 0.4 จะให้ผลที่ดีกว่าใช้เกลือแอมโมเนียมไนเตรทหรือแอมโมเนียมซัลเฟต กรณีที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรทเกินกว่า 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะสูง (Prescott และ Dunn, 1959) อย่างไรก็ตาม ชนิดของแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ จะส่งผลกระทบต่อ เชื้อราอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ ถ้าใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อรากินเวลานาน ในขณะที่ถ้าใช้แอมโมเนียมไนเตรตจะทำให้ระยะดังกล่าวกินเวลาน้อย อย่างไรก็ตามถ้าใช้แอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 0.25 จะก่อให้เกิดการสะสมของกรดออกซาลิกขึ้นอีก

ส่วน Snell กับ Schweiger (1949) พบว่าแอมโมเนียมคาร์บอเนตเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ดีที่สุดเพราะ

1. การสร้างกรดออกซาลิกลดลงจนวิเคราะห์ไม่พบในน้ำหมัก
2. ไม่มีการสร้างสี
3. ไม่เกิดเมือก เมื่อเพิ่มการให้อากาศ และแยกเอาเชื้อออกจากน้ำหมักได้ง่ายเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก
4. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริกต่อน้ำหนักมวลของเชื้อ

จากการทดลองใช้เกลือแอมโมเนียม 3 ชนิด ปริมาณความเข้มข้นร้อยละ 0.15-0.2 ในการผลิตกรดซิตริก พบว่าเกลือแอมโมเนียมมีผลต่อการสร้างกรดออกซาลิกแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2-7

ตารางที่ 2-7 ผลของเกลือแอมโมเนียมชนิดต่างๆ ที่มีต่อการสร้างกรดออกซาลิกตลอดจนสัดส่วนของกรดซิตริกต่อมวลของเชื้อ

แหล่งไนโตรเจน	กรดออกซาลิก (ร้อยละ)	กรดซิตริก(กรัม) ต่อ น้ำหนักแห้งของเส้นใย(กรัม)
แอมโมเนียมไนเตรต	0.03-0.5	9-10
แอมโมเนียมคาร์บอเนต	0.0	25-30
แอมโมเนียมคลอไรด์	0.1-0.5	-

ที่มา : Snell และ Schweiger (1949)

นอกจากนี้ Shepard (1963) พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตของกรดซิตริกได้เมื่อเติมเกลือไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากที่ราหยุดสร้างเซลล์ โดยจะเติมหลังจากที่การหมักดำเนินไปได้แล้ว 1 ต่อ 3 ของเวลาทั้งหมด ถ้าหากทำได้เช่นนี้ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลจะสูงขึ้น และได้กรดซิตริกเพิ่มมากขึ้นด้วย แต่ถ้าเติมเกลือไนโตรเจนก่อนเวลาอันสมควรผลผลิตจะลดลง

ในกลุ่มของเกลือไนเตรตจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรตและโพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้ผลในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *A. niger* ได้สูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน จากการศึกษาต่อมาพบว่าโซเดียมไนเตรตในระดับความเข้มข้นร้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละ 0.4 ก็ให้ผลผลิตของกรดซิตริกสูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรท ดังนั้นในการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนเพื่อให้ผลผลิตของกรดซิตริกสูงสุดแล้ว ยังจำเป็นต้องพิจารณาถึงความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้นั้นอีกด้วย ทั้งนี้เพราะถ้าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สูงเกินไปจะทำให้ระยะการเจริญเติบโตกินเวลานาน และทำให้ขั้นตอนของการผลิตเกิดขึ้นได้ช้าตามไปด้วย อย่างไรก็ตามการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมนี้จะต้องขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา และกระบวนการหมักที่ใช้เป็นสำคัญ

- แหล่งฟอสเฟต

ในระยะเริ่มต้นการหมักขณะที่ยังมีเกลือฟอสเฟตในอาหาร เชื้อจะอยู่ในช่วงการเจริญ โดยที่เกลือฟอสเฟตจะชลอการสร้างกรดไว้ก่อน เมื่อเกลือฟอสเฟตหมดไปเชื้อจึงเริ่มการสังเคราะห์กรดขึ้น (Szuce, 1944) ส่วน Steel และคณะ (1955) เติมเกลือฟอสเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก กากน้ำตาลของหัวผักกาดหวาน ในปริมาณ 0.01-0.50 กรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีการสร้างกรดออกซาลิก แต่เม็ดเชื้อจะมีขนาดใหญผิดปกติทำให้มีความหนืดเพิ่มขึ้นแล้ว ในที่สุดจะขัดขวางการทำงานของเครื่องให้อากาศ ส่วนตัวอย่างที่ไม่เติมเกลือฟอสเฟตจะมีการสร้างกรดออกซาลิกออกมาถึงร้อยละ 80 ของกรดอื่นที่เกิดขึ้น นอกเหนือไปจากกรดซิตริก นอกจากนี้ Martin กับ Steel (1955) พบว่าถ้าเติมเกลือฟอสเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากกากน้ำตาลหัวผักกาดหวานมากเกินไป นอกจากจะได้กรดซิตริกออกมาน้อยรายังสร้างกรดกลูโคนิค กรดมาลิก (malic acid) เพิ่มขึ้นอีกด้วย ส่วนตัวอย่างที่ไม่เติมเกลือฟอสเฟตเลยจะเริ่มเกิดกรดออกซาลิกภายหลังจากที่หมักไปแล้ว 45 ชั่วโมง สำหรับตารางที่ 2-8 จะแสดงให้เห็นถึงผลของเกลือฟอสเฟตในปริมาณต่างๆ กัน ที่มีต่อการสร้างกรดซิตริก

ตารางที่ 2-8 ผลของเกลือฟอสเฟตต่อการสร้างกรดซิตริก ของ *A. niger* ระยะเวลาในการหมัก 11วัน

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ร้อยละ)	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)	การสูญเสียน้ำตาลไปเป็นเซลล์และสารอื่นๆ นอกจากกรดซิตริก (ร้อยละ)
0.05	3.14	3.24
0.04	3.24	1.87
0.02	4.24	1.36
0.01	5.59	1.00

ที่มา : Noyes (1960)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 แร่ธาตุ

เชื้อรา *A. niger* สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกต้องการแร่ธาตุหลายชนิด ได้แก่ Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} และ Mg^{2+} เป็นต้น สำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิตริก อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลกระทบต่อการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกอย่างมากจนอาจกล่าวได้ว่า ถ้าต้องการจะให้การผลิตกรดซิตริกประสบความสำเร็จจะต้องควบคุมความเข้มข้นของแร่ธาตุนี้เสียก่อน แร่ธาตุดังกล่าวพอมีดังนี้

แมกนีเซียมไอออน (magnesium ion: Mg^{2+}) มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาเอนไซม์หลายชนิดภายในเซลล์ ในขณะเดียวกันก็ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริกด้วย ความเข้มข้นของ $MgSO_4$ ที่เหมาะสมเพื่อผลิตกรดซิตริกให้ได้สูงสุดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.02-0.025 แมกนีเซียมและสังกะสีมีผลต่อการผลิตกรดซิตริก Sue และ Johnson (1947) พบว่าถ้าเติมแมกนีเซียมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 9.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ราสร้างสปอร์มากมายภายใน 48 ชั่วโมง แทนที่จะเป็น 68 ชั่วโมงอย่างทั่วไป แต่แมกนีเซียมที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของขั้นเตรียมเชื้อนี้จะถูกถ่ายต่อๆ ไปจนถึงขั้นการหมักและพบว่าแมกนีเซียมนี้เองจะไปลดปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ ไม่ว่าจะใช้แมกนีเซียมเพียงตัวเดียวหรือจะใช้ร่วมกับสังกะสี ทองแดง และ / หรือเหล็ก ก็ตาม แต่ถ้าเลี้ยงเชื้อแบบผิวหน้า (surface culture) แมกนีเซียมจะไม่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริกแต่อย่างใด นอกจากนี้ Perlman (1949) ยังได้ผลทดลองเช่นเดียวกับ Sue และ Johnson แต่ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ด้วย ส่วนตารางที่2-9 จะแสดงให้เห็นถึงผลของแมกนีเซียมที่มีต่อการใช้กากน้ำตาลและการสร้างกรดซิตริก

ตารางที่ 2-9 ผลของแมกนีเซียมที่มีต่อการใช้น้ำตาลและการสร้างกรดซิตริกของ *A. niger* น้ำตาลเริ่มต้น 130 กรัมต่อลิตร ระยะเวลาในการหมัก 13 วัน

ดีเกลือ($MgSO_4$) (ร้อยละ)	การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลเริ่มต้น (ร้อยละ)	การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (ร้อยละ)	กรดซิตริก (ร้อยละ)
0.02	42.7	57.2	6.13
0.04	53.0	72.2	7.41
0.06	56.6	72.2	7.79
0.08	59.2	73.3	8.03

ที่มา : Noyes(1969)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในบรรดาแร่ธาตุหลายชนิดเหล่านี้ แร่ธาตุที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริกคือ Fe^{2+}และ Zn^{2+}โดยทั่วไปแล้วแร่ธาตุทั้งสองชนิดนี้ต้องมีความเข้มข้นต่ำจึงเหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกแต่ถ้าความเข้มข้นสูงจะทำให้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตยืดยาวออกไป (Sue และ Johnson, 1947)

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ เฟอรัสไอออน (ferrous ion: Fe^{2+}) สำหรับการผลิตกรดซิตริกสูงสุดขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อรา ดังที่ Schweiger (1961) รายงานว่าการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อ *A. niger* ภายใต้สภาวะการหมักในสภาพอาหารเหลว โดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบพบว่าความเข้มข้นของ Fe^{2+} เพียง 0.2 พีพีเอ็ม (หนึ่งส่วนในล้านส่วน) ก็ส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อการหมัก พบว่าเชื้อราจะเจริญได้ดีเมื่ออยู่ในสภาพที่มีความเข้มข้นของเหล็กสูงเนื่องจากเป็น cofactor ของเอนไซม์ aconitase แต่จะเกิดการผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดเมื่อมีความเข้มข้นของเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 0.05-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น (Rohr และ kubicek ,1986) แต่อย่างไรก็ตาม ถ้ามีทองแดงไอออน (copper ion: Cu^{2+}) ความเข้มข้น 0.1-500 พีพีเอ็ม (หนึ่งส่วนในล้านส่วน) ลงไปในน้ำหมักในระหว่างการถ่ายสปอร์เชื้อหรือในช่วง 50 ชั่วโมงแรก Cu^{2+} จะไปช่วยลดความรุนแรงของ Fe^{2+} ลงมาได้มาก และจากการศึกษาของ Fedoseev (1970) พบว่าถ้าเติม $CuSO_4$ ในระดับ 4.7 มิลลิกรัมต่อกากน้ำตาล 100 กรัม จะช่วยทำให้การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นกรดซิตริกสูงขึ้น

ความเข้มข้นของซิงค์ไอออน (Zinc ion: Zn^{2+}) ต่อการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อ *A. niger* มีลักษณะเช่นเดียวกับ Fe^{2+} ถ้าความเข้มข้นของ Zn^{2+} อยู่ในระดับ 1-2 ไมโครโมล จะทำให้ช่วงของการเจริญเติบโตของเชื้อราเกิดอย่างต่อเนื่อง แต่ถ้าความเข้มข้นต่ำกว่า 1 ไมโครโมลจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริกด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ในการติดตามการหมักยังอาศัยความเข้มข้นของ Zn^{2+} เข้ามาเกี่ยวข้องได้อีก กล่าวคือในระหว่างช่วงการการเลี้ยงเชื้อราเมื่อเกิดการขาด Zn^{2+} ขึ้นมาช่วงใดย่อมเป็นสัญญาณแสดงให้เห็นว่า จะเกิดการเปลี่ยนสภาพจากช่วงการเจริญเติบโตไปสู่ช่วงการผลิตกรดซิตริกต่อไป

Shu และJohnson (1948) ศึกษาถึงปริมาณของ trace element เช่น สังกะสี เหล็ก ทองแดง และแมงกานีส ที่มีต่อการผลิตกรดซิตริก พบว่า การเติมเหล็กและแมงกานีสในปริมาณที่เหมาะสมมีความสำคัญต่อการผลิตกรดซิตริกโดยปริมาณที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ เช่น เมื่อหมักกรดซิตริกจากอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้เชื้อรา *A. niger* Wisconsin 72-4 ปริมาณสังกะสีที่เหมาะสมคือ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเหล็ก 1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่มีแมงกานีสในอาหารเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของสังกะสี เหล็ก และแมงกานีสที่มีในอาหารมีผลต่อการสะสมกรดซิตริกจึงต้องทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความบริสุทธิ์ก่อน เช่น การทำให้สารละลายกลูโคสบริสุทธิ์ โดยใช้ ion-exchanger หรือการทำน้ำตาลให้บริสุทธิ์ โดยใช้ ferrocyanide ion

ส่วนแร่ธาตุชนิดอื่นๆ เช่น Mn^{2+}, Ba^{2+} และ Al^{3+} เป็นต้น จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อลักษณะทางสรีระวิทยาของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริก แต่อย่างไรก็ตาม แร่ธาตุเหล่านี้ไม่ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ส่วนผลกระทบที่แน่นอนต่อการผลิตกรดซิตริกว่าเกิดขึ้นในบริเวณใดหรือช่วงใดยังไม่ปรากฏแน่ชัด

ในปัจจุบันในอุตสาหกรรมหมักกรดซิตริกมักใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากากน้ำตาลมีแร่ธาตุต่างๆ อยู่มากเกินพอ ซึ่งเป็นผลเสียต่อการหมัก เพราะแร่ธาตุต่างๆ เหล่านี้จะไปกระตุ้นการเจริญของราทำให้ราผลิตกรดออกมาน้อย วิธีแก้ไขก็คือต้องเติมโพแทสเซียมฟอร์โรไซยาไนด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เกลือตัวนี้จะรวมตัวกับแร่ธาตุต่างๆ ทำให้ตกตะกอนราไม่สามารถใช้ได้อีกต่อไป Steel (1955) พบว่าสารไซยาไนด์ที่ปล่อยออกจากเกลือตัวนี้ไม่มีผลต่อการสร้างกรดหรือการเจริญของ *A. niger* อย่างไรก็ตามเขาให้ข้อคิดเห็นสำหรับเกลือตัวนี้ไว้สองประการคือ เกลือตัวนี้จะลดปริมาณของแร่ธาตุต่างๆ ที่ไปกระตุ้นการเจริญของราและเกลือตัวนี้มีผลโดยตรงในการยับยั้งการเจริญของราดังกล่าว นอกจากนี้ Steel และคณะ (1955) ยังพบอีกว่าปริมาณที่เหมาะสมของโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ (potassium ferrocyanide) ที่ควรเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากกากน้ำตาลหัวผักกาดหวาน 0.5-0.6 กรัมต่อลิตร

2. การแปรสภาพของวัตถุดิบ

จากการที่แร่ธาตุที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลกระทบต่อการผลิตกรดซิตริก ดังนั้นจึงได้มีการค้นคว้าหาเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ลดความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านั้นให้อยู่ในระดับต่ำที่สุด อย่างไรก็ตามความเป็นไปได้ในเชิงปฏิบัติเพื่อกำจัดแร่ธาตุดังกล่าวอย่างสมบูรณ์ทำกันได้ยากมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ

สำหรับเทคนิคที่ใช้ในการแก้ไขปัญหานี้เท่าที่มีการศึกษาค้นคว้า พอจะแบ่งออกได้ 2 วิธี คือ

2.1 การแปรสภาพของวัตถุดิบด้วยสารเคมีหรือเรซินที่ใช้แลกเปลี่ยนประจุ เพื่อลดความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านั้น

2.2 การปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา เพื่อให้สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในสภาพที่มีแร่ธาตุอยู่ในระดับความเข้มข้นสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแปรสภาพของวัตถุดิบด้วยสารเคมี เพื่อลดความเข้มข้นของแร่ธาตุ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Fe^{2+} สารเคมีที่ใช้ลด Fe^{2+} ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ โพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์โดยมีวิธีการที่ใช้ 2 วิธี คือ (1) โดยอาศัยการเติมเฟอโรไซยาไนด์ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง หรือ (2) โดยอาศัยการแปรสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเฟอโรไซยาไนด์ในระดับความเข้มข้นสูง ก่อนที่จะทำการถ่ายสปอร์ของเชื้อ

สารเฟอโรไซยาไนด์ในระดับความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อเชื้อรา แต่ความเข้มข้นในระดับดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยตกตะกอน Fe^{2+} และ Zn^{2+} ได้อย่างดี สำหรับความเข้มข้นของเฟอโรไซยาไนด์ที่ใช้นี้ขึ้นกับชนิดของวัตุดิบที่ใช้เป็นสำคัญ เช่น ในกรณีของกากน้ำตาลอาจใช้เฟอโรไซยาไนด์ได้ในช่วงร้อยละ 0.005-0.04 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกากน้ำตาลด้วยเช่นกัน ส่วนการเติมเฟอโรไซยาไนด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนทำการถ่ายสปอร์ของเชื้อนั้น ใช้ความเข้มข้น 20-40 พีพีเอ็ม (หนึ่งส่วนในล้านส่วน) ก็เพียงพอ

การเติมสารโพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณของคาร์บอน ไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัส แต่จะช่วยลดปริมาณของเถ้า (ash) และช่วยทำให้แร่ธาตุ Fe^{2+} และ Zn^{2+} ตกตะกอนซึ่งจะช่วยลดผลกระทบของแร่ธาตุทั้งสองต่อการหมักดังที่ได้กล่าวมานอกจากนี้แล้วสารเคมีที่ใช้ลดปริมาณของแร่ธาตุยังมีอีกหลายชนิด อาทิเช่น EDTA, actived charcoas, polyethylene amine และ quaternary ammonium compound (เช่น diisobutylphenoxyethyl dimethylbenzylammoniumchloride) เป็นต้น

สำหรับในกรณีการใช้เรซินที่ใช้แลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange resins) ในการลดปริมาณของแร่ธาตุในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหรือใช้วัตถุดิบชนิดอื่นๆ ปรากฏว่าวิธีการนี้ให้ประสิทธิภาพในการลดปริมาณแร่ธาตุสูงกว่าวิธีการที่ใช้ในการเติมสารเคมี ดังนั้นจึงน่าที่จะนำเรซินมาใช้ แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นจะต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

3. ความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักนับได้ว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่จะทำให้การหมักบรรลุผลสำเร็จ เมื่อใช้ความเป็นกรด-ด่างต่ำๆ นอกจากจะได้กรดซิตริกออกมามาก ยังช่วยลดการเกิดกรดออกซาลิกและ ลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นได้อีกด้วย โดยไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อในอาหารเหลวที่อุณหภูมิสูงและเป็นเวลานาน จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นที่ 2.20 หรือต่ำกว่า ก็ยังให้ผลการหมักที่ดีโดยไม่ต้องทำการฆ่าเชื้อในอาหารเหลวก่อนเริ่มการหมักแต่อย่างใด (Prescott กับ Dunn, 1959)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองของ Currie (1917) โดยปรับความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 3.4-3.5 ด้วยกรดเกลือ และควบคุมพวกเกลืออนินทรีย์จะได้กรดซิตริกออกมามาก ในขณะที่มีการสร้างกรดออกซาลิกน้อย ส่วน Doelger กับ Prescott (1934) ได้ใช้กรดเกลือปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหลือ 1.60-2.20 และให้ผลการหมักที่ดีเช่นกัน สำหรับ Hossain และคณะ (1983,1984) พบว่าถึงแม้จะไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในขณะที่หมักก็ยังได้ผลผลิตเป็นที่น่าพอใจ

กรดที่ใช้นั้นพบว่ากรดเกลือให้ประสิทธิภาพสูงกว่า กรดกำมะถัน กรดดินประสิวและกรดน้ำส้ม เมื่อพิจารณาถึงผลิตผลของกรดซิตริกที่ได้ออกมาหลังจากปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดต่างๆ ดังที่กล่าวมา สำหรับกรดมด (formic acid) ต้องใช้ในปริมาณมากกว่าจึงปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหลือ 3.0 เพื่อป้องกันการงอกของสปอร์ (Prescott กับ Dunn,1959)

ในการหมักจำเป็นจะต้องปรับกรด-ด่างเริ่มต้น แต่ทั้งนี้ขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ เช่น ในกรณีที่ใช้ซูโครสหรือกลูโคส รวมถึงกากน้ำตาลที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแล้ว ให้ปรับกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 3.0 ทั้งนี้เพราะถ้าปรับกรด-ด่างเริ่มต้นสูง จะทำให้เกิดการสะสมกรดออกซาลิกขึ้นมาแทน ส่วนในกรณีที่ใช้กากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการแปรรูป (หรือเรียกว่า crude cane molass) เป็นแหล่งคาร์บอนจำเป็นต้องปรับกรด-ด่างเริ่มต้นให้สูง เพราะถ้ากรด-ด่างต่ำจะทำให้เชื้อรา *A. niger* ถูกยับยั้งด้วยสารต่างๆ เช่น แร่ธาตุที่มีอยู่ในกากน้ำตาลนั้น อย่างไรก็ตาม ถ้ากากน้ำตาลที่ใช้ได้ผ่านการแยกเอาประจุบวก (decationized molass) ออกไปแล้วจะสามารถปรับกรด-ด่างเริ่มต้นได้ถึงช่วง 1.4-2.8

การปรับกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในระดับต่ำ (ความเป็นกรดสูง) ก่อให้เกิดผลดีดังนี้

1. ช่วยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ
2. ช่วยยับยั้งการสร้างและ / หรือการสะสมกรดออกซาลิก
3. ช่วยทำให้กระบวนการฆ่าเชื้อที่ใช้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

4. หัวเชื้อ

โดยทั่วไปเชื้อราสายพันธุ์ที่ผลิตกรดซิตริกจำเป็นต้องทำการเก็บรักษาเพื่อให้มีชีวิตอยู่ตลอดไป และคงคุณสมบัติและลักษณะเดิมให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยให้มีการเปลี่ยนแปลงให้น้อยที่สุด ทั้งนี้โดยอาศัยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. การเก็บรักษาโดยเลี้ยงเชื้อราไว้บนอาหารวุ้นและทำการถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่เป็นระยะๆ ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะต้องเป็นอาหารที่เชื้อเจริญได้ดี และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคุณสมบัติของเชื้อน้อยที่สุด เช่น เชื้อรา โดยทั่วไปจะใช้อาหาร potato dextrose agar (PDA) เพราะเป็นอาหารที่มีธาตุอาหารสำหรับเชื้อราครบถ้วน นอกจากนี้อาจใช้วัสดุตามธรรมชาติที่เชื้อราสามารถเจริญขึ้นได้ เช่น ดิน เมล็ดธัญพืช มันฝรั่ง ผลไม้ ซึ่งนำมานึ่งฆ่าเชื้อก่อนทำการเลี้ยงเชื้อแทนอาหารเลี้ยงเชื้อก็ได้

2. การเก็บโดยทำให้แห้งและเก็บไว้ภายใต้สภาพไม่มีอากาศ (โดยการหลอมปิดปากหลอดหรือใช้หลอดฝาเกลียวที่ปิดสนิท) โดยทำสารละลายสปอร์ของเชื้อราโดยใช้อาหารป้องกัน (protective medium) ที่นิยมใช้คือ หางนม (skim milk) นำไปใส่หลอดที่มีทรายหรือดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อราแล้ว หรือซิลิกาเจล (silica gel) ที่แห้ง ทำการดูดอากาศออกแล้วหลอมปิดปากหลอด

3. การเก็บโดยวิธี lyophilization หรือ freeze-drying โดยทำสารละลายสปอร์ของเชื้อราด้วยอาหารป้องกัน เช่น เซรุ่ม น้ำตาลชนิดต่างๆ หรือหางนมเป็นต้น ที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือนำหางนมใส่สารละลายใส่หลอด ampules (หลอดขนาดเล็ก มีหยักโดยรอบตรงบริเวณคอ) ทำให้แห้งในขณะที่แข็งตัวโดยดูดอากาศออก เมื่อแห้งแล้วทำการหลอมปากหลอด ampules

4. เก็บภายใต้ความเย็นยิ่งยวด (Ultra-low temperature) โดยใช้ในโตรเจนเหลว อุณหภูมิที่เก็บประมาณ –130 องศาเซลเซียส สำหรับหัวเชื้อที่ใช้ในการหมักอาจใช้ในลักษณะของสปอร์หรือเส้นใยในช่วงก่อนเจริญเติบโต (pregrown mycelia) สำหรับการใช้สปอร์ จำเป็นต้องเตรียมสารละลายสปอร์ด้วยน้ำกลั่น หรือ น้ำกลั่นผสม Tween 80 ที่ผ่านมาการฆ่าเชื้อแล้ว และปรับให้มีปริมาณสปอร์ประมาณ 10^8-10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร การใช้สปอร์นี้นิยมใช้ในการหมักในสภาพที่เชื้อเจริญที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อและการหมักในสภาพอาหารแข็ง โดยที่การหมักในสภาพแรกนั้น ภายหลังที่เติมสปอร์ลงไปแล้วจะเกิดเป็นเส้นใยเจริญปกคลุมที่ผิวของอาหารเหลว แล้วรวมตัวเป็นก้อนซึ่งเรียกว่า "mycelial pellets" ซึ่งอาจนำไปใช้เป็นหัวเชื้อของการหมักครั้งต่อไปได้ หัวเชื้อที่ใช้ในการหมักในสภาพอาหารเหลว สามารถใช้สปอร์หรือ mycelial pellets ก็ได้แต่ถ้าใช้ mycelial pellets จะต้องเตรียมขึ้น โดยถ่ายสปอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจริญเติบโต (growth medium) บ่ม ในสภาพอาหารเหลวเป็นเวลา 2-3 วัน จนเกิดเป็น pellets ขึ้นมาจึงนำไปใช้ต่อไป สำหรับหัวเชื้อที่ใช้ในลักษณะของเส้นใยช่วงก่อนเจริญเติบโต การเตรียมหัวเชื้อนี้จะต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบที่เหมือนกันกับที่ใช้ในการหมัก ทั้งนี้เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในการหมักได้ดีและรวดเร็ว

ในการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกในสภาพต่างๆ สามารถใช้หัวเชื้อในลักษณะต่างๆ ซึ่งในแต่ละลักษณะจำเป็นต้องมีการคำนึงถึงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อใช้เตรียมหัวเชื้อให้แข็งแรงและสามารถทำการหมักได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พัฒนาการเตรียมหัวเชื้อควบคู่กับการพัฒนาทางด้านอื่นๆ ด้วย จึงจะทำให้การหมักเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์และให้ผลผลิตสูงตามที่ต้องการ

5. การควบคุมสภาพการหมัก (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532)

ในระหว่างการหมักจำเป็นจะต้องควบคุมปัจจัยที่สำคัญหลายอย่าง เช่น การให้อากาศ (aeration) การกวน (agitation) อุณหภูมิ และเวลาในการบ่ม เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด

ในการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริก จัดเป็นการหมักในสภาพที่มีอากาศ (aerobic fermentation) ดังนั้นเชื้อราจึงจำเป็นต้องได้รับอากาศ โดยอาศัยการให้อากาศ และการกวน ทั้งสองระบบนี้จะช่วยทำให้เกิดการแผ่กระจายออกซิเจนในน้ำหมักได้ดี แต่ทั้งนี้จะต้องขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และขนาดของถังหมักเป็นสำคัญ

การให้อากาศลงในน้ำหมักสามารถทำได้หลายแบบดังนี้

1. การแพร่กระจายของอากาศลงสู่น้ำหมักโดยตรง กล่าวคือ อากาศหรือออกซิเจนที่อยู่ในบริเวณเหนือผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจะแพร่กระจายเข้าสู่น้ำหมัก โดยส่วนใหญ่แล้วการให้อากาศแบบนี้มักใช้กับการเลี้ยงเชื้อราให้เจริญที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือ surface culture

2. การให้อากาศบริสุทธิ์ (sterile air) หรือออกซิเจนเข้าไปในบริเวณส่วนล่างของผิวหน้าอาหาร การให้อากาศแบบนี้เรียกว่า "submerged aeration" นิยมใช้กับการหมักสภาพอาหารเหลว

3. การเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) ซึ่งวิธีการนี้สามารถใช้ได้ทั้งการหมักสภาพเลี้ยงเชื้อที่ผิวหน้าอาหาร และการหมักในสภาพอาหารเหลวแต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่เหมาะสมต่อการใช้ในระดับอุตสาหกรรม

การหมักกรดซิตริกในสภาพที่เชื้อเจริญที่ผิวอาหาร (Surface culture) นิยมทำในถาดซึ่งมีลักษณะคล้ายกระทะก้นแบนทรงตื้นหรือเรียกว่า shallow pans ซึ่งทำด้วยโลหะปลอดสนิม ในระหว่างการหมักจะมีเชื้อราเจริญอยู่ที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อและทำการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดซิตริกโดยอาศัยกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเส้นใย หลังจากนั้นจึงปล่อยออกมาสู่น้ำหมัก สำหรับอากาศได้จากการเป่าอากาศชื้น (humidified air) เข้าไปเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ อากาศจะแพร่กระจายลงไปสู่อาหารแล้วเชื้อราจึงนำไปใช้ในเมตาบอลิซึมของเชื้อต่อไป

การให้อากาศและการกวนจะช่วยทำให้มีออกซิเจนเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและทำการปล่อย กรดซิตริกจากเส้นใยสู่น้ำหมักเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพในการหมักในสภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเหลว ส่วนการหมักในสภาพอาหารแห้งอากาศที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริก จะได้จากอากาศที่แพร่กระจายผ่านตามช่องว่างของสับสเตรท (void fraction) ในการหมักระบบนี้จะไม่สามารถใช้การกวนหรือการเขย่าได้

ราจัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ จึงจำเป็นอย่างยิ่งในการให้อากาศแก่ราในขณะที่ทำการหมักกรดซิตริก Kubicek กับคณะ (1980) ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักต่อการผลิตกรดซิตริก เขาพบว่าในช่วงการเจริญคงที่ของเชื้อราจะมีการผลิตกรดออกมามาก และจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนมากกว่าในช่วงที่รามีอัตราการเจริญสูง ซึ่งในระยะนั้นราจะสร้างกรดออกมาน้อย ค่าวิกฤตการละลายได้ของออกซิเจนจะเป็น 18-21 มิลลิบาร์ (mbar) เมื่อราอยู่ในระยะอัตราการเจริญสูง แต่ค่านี้จะเพิ่มเป็น 23-26 มิลลิบาร์ เมื่อราอยู่ในระยะการเจริญคงที่และมีการสะสมของกรดซิตริกมาก ในระยะการเจริญคงที่ดังกล่าวนี้ถ้าค่าวิกฤตการละลายได้ของออกซิเจนต่ำกว่าที่กำหนดแม้แต่เพียง 20 นาที ก็จะทำให้การผลิตกรด ยุติลงได้โดยสิ้นเชิงแต่จะไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ

นอกจากนี้ Hossain กับคณะ (1934) พบว่าหลังจากที่เลี้ยงราเป็นเวลา 4 วัน (มีการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที ความเร็วรอบในการหมุน 180 รอบต่อนาที) ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายได้จะเหลือเพียงร้อยละ 15 ของปริมาณที่ละลายได้ทั้งหมด ในขณะทำการหมักราจะปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาด้วย ก๊าซนี้มีผลโดยตรงต่อการผลิตกรดซิตริก จากการทดลองของ Foster และคณะ (1941) พบว่าเมื่อเติมคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปร้อยละ 5-15 ในขณะที่หมัก นอกจากจะได้กรดออกมาน้อยแล้วยังทำให้การใช้น้ำตาลและการสร้างใยของราลดลงด้วย

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *A. niger* หรือเชื้อราอื่นๆ อยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิในระหว่างการหมักสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส (Prescott กับ Dunn, 1959) ส่วน Doelger และ Prescott (1934) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกของราชนิดนี้อยู่ระหว่าง 26-28 องศาเซลเซียส ปริมาณการผลิตกรดซิตริกจะเพิ่มขึ้นจาก 8-28 องศาเซลเซียส แต่ที่ 30 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่านี้การเกิดกรดซิตริกจะลดลงและกรดออกซาลิกจะถูกสร้างมากขึ้น ดังแสดงใน ตารางที่ 2-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-10 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อกรดที่ไตเตรตกับกรดซิตริกเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดที่ไตเตรต (นอร์มอลลิตี)	กรดซิตริกที่ผลิตได้		การระเหยของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ร้อยละ)
		ต่อฟลาสก์ (กรัม)	ต่อ 100 กรัม น้ำตาล (กรัม)	
20-22	1.00	3.37	32	24
24	1.0535	3.55	34	27
26	1.1187	3.96	38	26
28	1.1564	3.88	37	30
30-32	1.1045	2.87	27	36

ที่มา : Doelger และ Prescott (1934)

ระยะเวลาในการหมักบ่มที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก ขึ้นกับชนิดของเชื้อราและสภาวะของการหมักเป็นหลัก กล่าวคือ ในกรณีที่ใช้เชื้อ *A. niger* ถ้าทำการหมักโดยเลี้ยงเชื้อที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้เวลาในการบ่มเชื้อประมาณ 7-10 วัน ในขณะที่การหมักในสภาพอาหารเหลวจะใช้เวลาสั้นกว่าโดยใช้เพียง 4-5 วันเท่านั้น ส่วนในการหมักในสภาพอาหารแข็งใช้ระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมเท่ากับ 6-7 วัน ส่วนประสิทธิภาพสูงสุดในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดคือ ร้อยละ 90.7 (Wells และคณะ, 1936) แต่โดยทั่วไปการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมจะทำการแยกเอากรดออกเสียก่อนที่จะสิ้นสุดการหมัก ดังนั้นประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดจะเหลือประมาณร้อยละ 60 เท่านั้น ถ้าปล่อยให้การหมักดำเนินต่อไปจนสิ้นสุดถึงแม้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดจะสูงแต่จะไม่คุ้มทุน (Prescott และ Dunn, 1959)

6.สารกระตุ้น (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532)

สารกระตุ้นที่ใช้เพื่อปรับปรุงผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อรา *A. niger* มีหลายชนิด เช่น เมทานอล เอทานอล ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ naphtoquinone methylene blue เป็นต้น ในบรรดาสารกระตุ้นดังกล่าว เมทานอลเป็นสารกระตุ้นที่ทำให้ผลผลิตของกรดซิตริกจากเชื้อ *A. niger* สูงขึ้นมากกว่าสารกระตุ้นชนิดอื่นๆ Andrew (1952) รายงานว่าแหล่งของคาร์โบไฮเดรตต่างๆ สามารถนำมาใช้ในการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ *A. niger* ได้ ทั้งแบบให้เชื้อเจริญที่ผิวหน้าและซับเมอร์จโดยการเติมแอลกอฮอล์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น เมทานอล โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1-4 (โดยปริมาตรของอาหาร) จากการศึกษาของ Chaudhary และคณะ (1978) พบว่าเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 3-4 จะช่วยทำให้มีการเจริญเติบโตและการเกิดสปอร์ (sporulation) และในขณะเดียวกันจะส่งผลทำให้กรดซิตริกถูกสร้างมากขึ้นด้วยทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นี้อาจเนื่องจากเมทานอลไม่ได้ทำให้เมตาบอลิซึมของเชื้อราเสียหายแต่กลับส่งผลดีต่อคุณสมบัติการซึมผ่านของสารเข้า-ออกเมมเบรน (membrane) ของเชื้อรา จึงทำให้การปลดปล่อยกรดซิตริกออกมาจากเส้นใยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น

5. ฟอง และการควบคุม

ในขณะที่หมักเอากรดซิตริกนั้นนอกจากจะมีการให้อากาศกับการกวนแล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อยังมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่สูง ตลอดจนเชื้อปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาอีกด้วย จึงทำให้มีฟองเกิดขึ้นในขณะหมัก ฟองที่เกิดขึ้นอาจควบคุมได้โดยการเติมสารพวกไขมันหรือน้ำมันลงไปในน้ำหมัก น้ำมันที่เติมลงไปนอกจากจะลดปัญหาเรื่องฟองแล้ว ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักอีกด้วย น้ำมันที่ใช้เติมอาจเป็น เนย เปรียง น้ำมันหมู น้ำมันมะกอก น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วลิสงและอื่นๆ (Noyes, 1969)

Gold กับ Kiber (1968) แนะนำว่าในช่วงแรกของการหมักควรปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.0 เมื่อหมักไประยะหนึ่งมันจะลดลงเหลือ 2.0-2.5 ถ้าความเป็นกรด-ด่างลดลงเหลือประมาณ 3.0 จะเริ่มมีปัญหาเรื่องฟอง จึงควรเติมสารป้องกันฟองจำพวกไขมันหรือน้ำมันลงไปประมาณร้อยละ 0.2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณที่ใช้ขนาดนี้ สามารถป้องกันฟองได้ตลอดช่วงของการหมัก ส่วน Al-Obaidi กับ Berry (1979) ใช้น้ำมันข้าวโพดร้อยละ 0.2 ในช่วง 3 วันแรกของการหมักเพื่อป้องกันฟองและพบว่าน้ำมันข้าวโพดมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสารป้องกันฟองจำพวกซิลิโคน

8. ปัจจัยอื่นๆ

การปนเปื้อนของโลหะหนักที่มาจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตมีความสำคัญต่อการหมักกรดซิตริก จึงมีการพยายามเพิ่มผลได้ของการหมักโดยการเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

8.1 Hexacyanoferrate

ใช้ในการกำจัดการปนเปื้อนของโลหะที่มีในแหล่งคาร์บอนโดยอาศัยคุณสมบัติการเป็น chelating agent พบว่าผลได้ของการผลิตกรดซิตริกสูงขึ้น ถ้ามี hexacyanoferrate ในสารละลายสูงกว่าปกติเล็กน้อย เนื่องจากจะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 10-200 มิลลิกรัมต่อลิตร (Rohr และ Kubicek, 1986)

8.2 Fatty material

Millis (1963) พบว่าน้ำมันธรรมชาติที่มีสัดส่วนของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงจะเพิ่มผลได้สุดท้ายของการผลิตกรดซิตริกโดยไม่มีผลต่อผลได้สุดท้ายของน้ำหนักแห้ง Fatty material ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักมักเป็นสารกำจัดฟอง ปริมาณกรดไขมันที่เหมาะสมคือร้อยละ 0.05-0.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.3 สารประกอบอื่น ๆ

สารประกอบอื่นๆ ที่มีผล เช่น H_2O_2 ซึ่งจะมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ aconitase และเพิ่ม oxygen tension ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังมี 4-methyl-umbelliferone, Benzoic acid, 3-hydroxy-2naphtoic acid, Iron cyanide, Amine oximes, Starch, EDTA, 1,2-diaminocyclohexane N,N'-tetraacetate, dimethylentriaminepentaacetate, surface active agent, Verniculite เป็นต้น (Rohr และ Kubicek, 1986)

12.การใช้ประโยชน์จากกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม (ดุษณี ,2537)

กรดซิตริกที่ผลิตขึ้นเพื่อเป็นการค้าจะผลิตในรูปปราศจากน้ำหรือในรูปโมโนไฮเดรต ซึ่งการผลิตกรดซิตริกในรูปปราศจากน้ำจะได้จากการตกผลึกของสารละลายกรดที่ร้อน ในขณะที่กรดซิตริกในรูปโมโนไฮเดรตจากการตกผลึกสารละลายที่อุณหภูมิต่ำกว่า 36.5 องศาเซลเซียส ในอุตสาหกรรมและยามีการใช้กรดซิตริกอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นสารที่ละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม มีความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายได้ง่าย ราคาถูก และหาได้ง่าย นอกจากนี้กรดซิตริกยังใช้กันแพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอุตสาหกรรมอื่นๆ (จิรภรณ์ ,2525) ประโยชน์ของการใช้กรดซิตริก เกลือและเอสเตอร์ของกรดซิตริกมีดังนี้

1. อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

โดยใช้เป็นส่วนผสมในการทำลูกกวาด ลูกอม ผลไม้เชื่อม แยม เยลลี ผักผลไม้ดอง น้ำหวาน น้ำเชื่อม น้ำอัดลม น้ำผลไม้ ไวน์ อาหารแข็ง อาหารกระป๋อง เนยแข็ง ไอศกรีม และอื่นๆ ซึ่งกรดซิตริกมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มกลิ่นรส ควบคุมความเป็นกรด ลดความฝาด ป้องกันการเปลี่ยนแปลงกลิ่นของเครื่องดื่มและอาหารแข็ง ป้องกันการขุ่นของไวน์ เป็น emulsifier ในผลิตภัณฑ์นมต่างๆ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการเก็บถนอมอาหารอีกด้วย

ข้อกำหนดในการใช้กรดซิตริกเป็นวัตถุเจือปนในอาหาร ซึ่งอนุญาตปนในอาหารบางชนิดเพื่อวัตถุประสงค์และปริมาณต่างกันดังนี้

1. สำหรับปรับความเป็นกรด-ด่าง โดยการเจือปนกับผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดต่อไปนี้ด้วยปริมาณที่เหมาะสม
   - น้ำมะเขือเทศเข้มข้น เพื่อให้มีความเป็นกรด-ด่างไม่เกิน 4.3
   - แยมและเยลลี เพื่อให้มีความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 2.8-3.5
2. สำหรับการปรุงแต่งกลิ่น รส และป้องกันการรวมตัวเป็นก้อนของน้ำตาล โดยการเจือปนกับผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดต่อไปนี้ด้วยปริมาณ 5,000 พีพีเอ็ม (หนึ่งส่วนในล้านส่วน) หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหารทั้งหมด 1 กิโลกรัม หรือใช้ร่วมกับกรด แอล-ตาร์ตาก ก็ได้ แต่ปริมาณที่ใช้ร่วมกันต้องไม่เกิน 5,000 พีพีเอ็ม (หนึ่งส่วนในล้านส่วน)

- โกโก้ผงและโกโก้ผงผสมน้ำตาลชนิดแห้ง
- อาหารเสริมสำหรับเด็ก
- สเตอริไลส์ฟังไจ (sterilized Fungi)

3. สำหรับป้องกันการรวมตัวเป็นก้อน โดยการเจือปนกับผลิตภัณฑ์อาหารแห้งด้วยปริมาณ 25,000 พีพีเอ็ม (หนึ่งส่วนในล้านส่วน) ในอาหารเสริมสำหรับเด็กชนิดแป้ง

4. สำหรับป้องกันการเปลี่ยนสี กลิ่น รส และกันเสีย ของผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกรรมวิธีแคนนิ่งดังต่อไปนี้ ด้วยการใช้เจือปนในปริมาณที่เหมาะสม คือ

- จำพวกเนื้อสัตว์ กุ้ง ปู ปลาแมคเคอเรล (Mackerel)
- จำพวกพืช ผัก ผลไม้ เกรฟฟรุต ข้าวโพด สตรอเบอรี่ สับปะรด ส้ม เห็ด หน่อไม้ฝรั่ง (Asparagus)ซอสแอปเปิล ทรอปิคอลฟรุดสลัด (Tropical Fruit Salad)

5. สำหรับป้องกันการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ของผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็งต่อไปนี้ ด้วยการใช้เจือปนในปริมาณที่เหมาะสม คือ

- จำพวกเนื้อสัตว์ กุ้ง
- จำพวก ผลไม้ พีช (peach) สตรอเบอรี่

6. สำหรับป้องกันการเปลี่ยนสี กลิ่น รส และช่วยเสริมฤทธิ์วัตถุกันหืนของผลิตภัณฑ์อาหารต่อไปนี้ ด้วยการใช้เจือปนในปริมาณที่เหมาะสม คือ

- บูยองและคอนซูเม่ (Bouilons and Consumme) เนยเทียม ไอศกรีม และอาหารทารก
- น้ำแบลคเคอร์แรนท์ (Black currant) ผสมน้ำแตงกวาดอง
- ฟังไจและผลิตภัณฑ์จากฟังไจที่ใช้รับประทานได้ (Edible Fungi and Fungus Products) ยกเว้น สเตอริไลส์ฟังไจ

7. สำหรับป้องกันการเกิดตะกอนของผลิตภัณฑ์อาหารดอง คือ มะกอกดอง ด้วยการใช้ปริมาณ 15,000 พีพีเอ็ม (หนึ่งส่วนในล้านส่วน)

2. อุตสาหกรรมยา

ใช้เป็นส่วนผสมในการทำยาบางชนิด เป็นสารทำให้เกิดฟองฟู่เมื่อผสมกับคาร์บอเนตหรือไบคาร์บอเนต โดยใช้ในการเตรียมยาลดกรด หรือแอสไพรินที่ละลายน้ำได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

stabilizer ในวิตามินซี (ascorbic acid) อีกด้วย การใช้ผสมกับยาจะใช้ในรูปของเกลือ หรือเอสเตอร์ของกรดซิตริก

3. อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

ใช้เป็นส่วนผสมของครีมนวดผมและโลชั่น โดยจะควบคุมระดับพีเอชของผลิตภัณฑ์ และช่วยเพิ่มความแวววาวและความอ่อนนุ่มของผลิตภัณฑ์ด้วย นอกจากนี้ยังเป็นวัตถุกันเสียอีกด้วย

4. อุตสาหกรรมอื่น ๆ

- ใช้ทำความสะอาดโลหะ ล้างสนิมเนื่องจากกรดซิตริกสามารถรวมตัวกับโลหะหนัก เช่น เหล็ก และทองแดง ได้เป็นอย่างดี
- ใช้ผสมกับผงซักฟอกในรูปของไตรโซเดียมซิเตรต (trisodium citrate) แทนการใช้โพลีฟอสเฟตเพื่อช่วยในการทำความสะอาดให้ได้ดีขึ้น
- ใช้เป็น plasticizer ในแผ่นฟิล์มพลาสติกที่ใช้ห่อหุ้มอาหารในรูปของไตรเอทิล (triethy) ไตรบิวทิว (tributyl) และอะซิติลไตรบิวทิลเอสเตอร์ (acetyltributly ester) เนื่องจากไม่มีความเป็นพิษ
- ใช้เป็นส่วนผสมของหมึกพิมพ์ น้ำและสี
- ใช้เป็น softener ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น

นอกจากประโยชน์ต่างๆ ที่กล่าวมานี้แล้ว เกลือของกรดซิตริกยังมีประโยชน์ในทางการแพทย์อีกด้วย เช่น เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรต (ferric ammonium citrate) ใช้ในการรักษาโรคโลหิตจาก หรือการใช้ไตรโซเดียมซิเตรต (trisodium citrate) ในการเก็บรักษาเลือด โดยป้องกันเลือดไม่ให้เกาะกันเป็นก้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

- *Aspergillus niger* TISTR 3089
- *Aspergillus niger* TISTR 3106
- *Aspergillus niger* TISTR 3245
- *Aspergillus niger* TISTR 3349
- *Aspergillus niger* TISTR 3350

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารสูตร potato dextrose agar

2.2 น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ใช้น้ำส่วนที่ได้จากการบีบเมล็ดโกโก้สด

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1 เครื่องมือพื้นฐานทางชีววิทยา

3.2 เครื่องคั้นน้ำแบบบีบอัด

3.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.4 เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.5 เครื่องกรองโดยใช้ความดัน

3.6 เครื่องย่อย (digestor)

3.7 เครื่องกลั่น (digestor)

3.8 เครื่องควบแน่น (condenser)

3.9 เครื่องระเหย (evaporator)

3.10 เครื่องเขย่า (shaker)

3.11 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

3.12 เครื่องอบสารร้อน (hot air oven)

3.13 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ (autoclave)

3.14 เดซิเคเตอร์ (desicator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. วิธีการทดลอง

1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยวิเคราะห์

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง
- ค่าซีโอดี
- ไนโตรเจนทั้งหมด
- ปริมาณโปรตีน
- ของแข็งแขวนลอย (suspend solid)
- ของแข็งทั้งหมด (total solid)

ตามวิธีของ APHA, AWWA และ WPCF (1992)

- น้ำตาลรีดิวซ์
- ปริมาณกรดซิตริกเริ่มต้น
- แร่ธาตุ บางชนิด เช่น ทองแดง แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม และสังกะสี (วิเคราะห์โดยเครื่อง automic absorbtion)

1.2 คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

1.2.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นและหัวเชื้อ

การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เลี้ยง *Aspergillus niger* สายพันธุ์ต่าง ๆ บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเจริญเต็มที่ จากนั้นนำสารละลายสปอร์ มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ให้มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

การเตรียมหัวเชื้อ

นำน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 90 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.2.2 คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เหมาะสม

เลี้ยง *Aspergillus niger* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 ปริมาตร 90 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อ ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ซึ่งเลี้ยงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน เพื่อทำการวิเคราะห์หากรดซิตริก โดยวิธีการไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Nelson วิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง ด้วย pH meter วิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยการหาน้ำหนักแห้งและทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

1.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

1.3.1 ศึกษาการเติมสารกระตุ้น

โดยเลี้ยง *Aspergillus niger* ที่ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดซิตริกได้สูง 2 สายพันธุ์ นำมาเลี้ยงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 ปริมาตร 90 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติมเมทานอล ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 2, 3 และ 4 เติมหัวเชื้อที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ซึ่งเลี้ยงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน ทำการวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับ 4.2.2

1.3.2 ศึกษาการเติมแร่ธาตุ

1.3.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของ Fe^{2+}

โดยเลี้ยง *Aspergillus niger* ที่ทำการคัดเลือกได้จาก 4.2.2 ไปเลี้ยงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เติม $FeSO_4.7H_2O$ที่ความเข้มข้น 0 50 75 100 125และ150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ปริมาณ Fe^{2+} เท่ากับ 49.75 74.75 99.75 124.75และ149.75 กรัมเหล็กต่อลิตรตามลำดับ) นำไปฆ่าเชื้อ เติมหัวเชื้อที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ซึ่งเลี้ยงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ขวดละ 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับ 4.2.2

1.3.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของ Cu^{2+}

โดยเลี้ยง *Aspergillus niger* ที่ทำการคัดเลือกได้จาก 4.2.2 ไปเลี้ยงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$CuSO_4.5H_2O$ ที่ความเข้มข้น 0 6 12 18 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร(ปริมาณ Cu^{2+} เท่ากับ 5.981 11.981 17.981 23.981และ29.981)นำไปฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงเติมหัวเชื้อที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ซึ่งเลี้ยงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 10 มิลลิลิตรนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับ 4.2.2

1.3.2.3 ศึกษาความเข้มข้นของ Zn^{2+}

โดยเลี้ยง *Aspergillus niger* ที่ทำการคัดเลือกได้จาก 4.2.2 ไปเลี้ยงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เติม $ZnSO_4.7H_2O$ ที่มีความเข้มข้น 0 20 40 60 80และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ปริมาณ Zn^{2+} เท่ากับ 19.904 39.904 59.904 79.904และ99.904) นำไปฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงเติมหัวเชื้อที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ซึ่งเลี้ยงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับ 4.2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปราย

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

ลักษณะของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ได้จะมีสีขาวขุ่น มีความหนืด มีกลิ่นหอมอ่อนๆ มีรสเปรี้ยวอมหวานเล็กน้อย เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่า มีค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างเป็นกรด มีปริมาณไนโตรเจน ของแข็งแขวนลอย ของแข็งทั้งหมด ค่าซีโอดีค่อนข้างสูงและแร่ธาตุบางชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

พารามิเตอร์	ความเข้มข้น
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	3.2
ค่าซีโอดี	3.8×10^{6} มิลลิกรัมต่อลิตร
ไนโตรเจน	0.168 (ร้อยละ)
โปรตีน	1.050 (ร้อยละ)
ของแข็งทั้งหมด	285.81 มิลลิกรัมต่อลิตร
ของแข็งแขวนลอย	80 มิลลิกรัมต่อลิตร
น้ำตาลรีดิวซ์	1.945 (ร้อยละ)
ปริมาณกรดทั้งหมด	0.969 (ร้อยละ)
กรดซิตริกเริ่มต้น	0.749 (ร้อยละ)
แร่ธาตุบางชนิด	
ทองแดง (Cu)	0.075 พีพีเอ็ม
เหล็ก (Fe)	1.032 พีพีเอ็ม
แมกนีเซียม (Mg)	0.138×10^{2} พีพีเอ็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (ต่อ)

พารามิเตอร์	ความเข้มข้น
แคลเซียม (Ca)	0.924X10 พีพีเอ็ม
แมงกานีส (Mn)	0.333 พีพีเอ็ม
สังกะสี (Zn)	0.385 พีพีเอ็ม

2. ศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus niger* ที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

การศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus niger* ที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ โดยปรับความเข้มข้นน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เป็นร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เชื้อที่ใช้ในการศึกษาคือ *Aspergillus niger* TISTR 3089 *Aspergillus niger* TISTR 3106 *Aspergillus niger* TISTR 3245 *Aspergillus niger* TISTR 3349 และ *Aspergillus niger* TISTR 3350 โดยทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน พบว่า เชื้อ *A. niger* TISTR 3089 สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดในวันที่ 12 ซึ่งผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดถึงร้อยละ 0.2700 รองลงมาเป็น *A. niger* TISTR 3106 ซึ่งผลิตกรดซิตริกได้ร้อยละ 0.2100 (แสดงดังรูปที่ 4-1) ซึ่งปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากทั้ง 2 สายพันธุ์จะแตกต่างทางสถิติกับ *A. niger* TISTR 3245 และ *A. niger* TISTR 3349 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (แสดงดังตารางภาคผนวกที่ ค-1) ในขณะที่เชื้อ *A. niger* TISTR 3245 *A. niger* TISTR 3349 และ *A. niger* TISTR 3350 จะผลิตกรดได้ร้อยละ 0.1320 0.0390 และ 0.1950 ตามลำดับ

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *A. niger* แต่ละสายพันธุ์มีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมักและปริมาณกรดซิตริกที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่า *A. niger* TISTR 3089 จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 1.47 (แสดงดังรูปที่ 4-2 และตารางภาคผนวกที่ ค-2) ขณะที่ เชื้อ *A. niger* TISTR 3106 *A. niger* TISTR 3245 *A. niger* TISTR 3349 และ *A. niger* TISTR 3350 จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 1.565 2.295 2.005 และ 1.575 ตามลำดับในวันที่ 12 ของการหมัก เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างจากการใช้ *A. niger*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

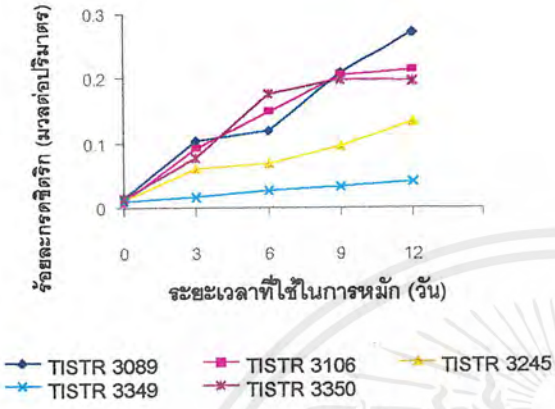
TISTR 3089 และ *A. niger* TISTR 3106 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่จะแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น

น้ำหนักเซลล์แห้ง ของ *A. niger* พบว่า *A. niger* TISTR 3089 จะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงสุดในวันที่ 12 คือ 0.5320 กรัม รองลงมาเป็น *A. niger* TISTR 3106 ที่มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.3405 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-3) เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างทางสถิติแต่น้ำหนักเซลล์แห้งจาก 2 สายพันธุ์จะแตกต่างทางสถิติกับสายพันธุ์อื่น (แสดงดังตารางภาคผนวกที่ ค-3) ขณะที่ เชื้อ *A. niger* TISTR 3245 *A. niger* TISTR 3349 และ *A. niger* TISTR 3350 จะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 0.0740 0.0220 และ 0.1750 กรัม ตามลำดับในวันที่ 12 ของการหมัก

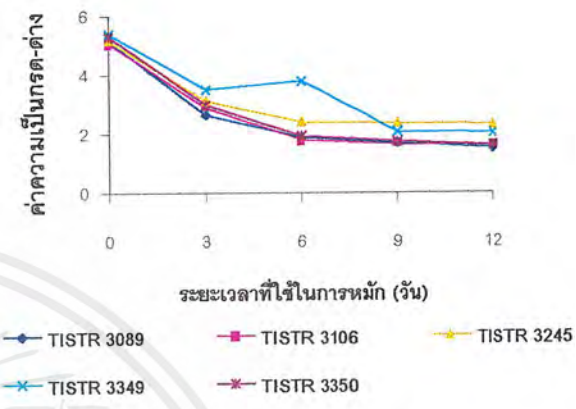
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของ *A.niger* แต่ละสายพันธุ์มีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมักและปริมาณกรดซิตริกที่เพิ่ม โดยพบว่า *A.niger* TISTR 3089 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 0.000144 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-4) ขณะที่ เชื้อ *A.niger* TISTR 3106 *A.niger* TISTR 3245 *A.niger* TISTR 3349 และ *A.niger* TISTR 3350 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 0.000201 0.000283 0.000261 และ 0.000148 กรัม ตามลำดับในวันที่ 12 ของการหมัก จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงจากการใช้ *A. niger* TISTR 3089 จะมีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ *A. niger* สายพันธุ์อื่น (แสดงดังตารางภาคผนวก ที่ ค-4)

จากการศึกษาจึงได้คัดเลือกเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 และ *A. niger* TISTR 3106 ซึ่งผลิตกรดซิตริกได้สูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

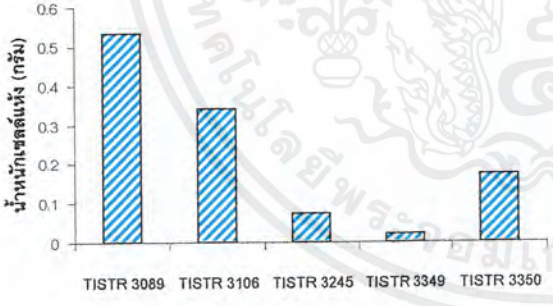
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



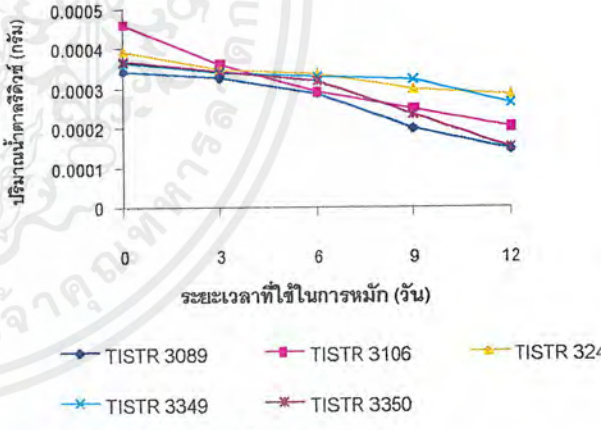
รูปที่ 4-1 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดยเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์ต่างๆ



รูปที่ 4-2 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* สายพันธุ์ต่างๆ



รูปที่ 4-3 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในวันที่ 12 ของการหมัก



รูปที่ 4-4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

3.1 การศึกษาการเติมสารกระตุ้นเริ่มต้น

โดยการเติมเมทานอลในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เข้มข้นร้อยละ 25 ใช้เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน พบว่าการผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3089 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมักเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 4.0 จะผลิตกรดซิตริกได้สูงถึงร้อยละ 1.6000 ในวันที่ 12 ของการหมัก (แสดงดังรูปที่ 4-5และ ตารางภาคผนวกที่ ง-1) ในขณะการเติมเมทานอลเริ่มต้น ร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 จะผลิตกรดสูงสุดได้ร้อยละ 1.1200 1.1520 และ 1.1840 ตามลำดับสำหรับการผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3106 พบว่า การเติมเมทานอลเริ่มต้น ร้อยละ 4.0 จะผลิตกรดซิตริกได้สูงถึงร้อยละ 0.9600 ในวันที่ 12 ของการหมัก (แสดงดังรูปที่ 4-6 และตารางภาคผนวก ที่ ง-2) ในขณะที่การเติมเมทานอลเริ่มต้น ร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 จะผลิตกรดสูงสุดได้ร้อยละ 0.3840 0.6720 และ 0.8640 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการเติมเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 4 จากการใช้เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการเติมเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 แต่จะแตกต่างทางสถิติเมื่อไม่เติมเมทานอล

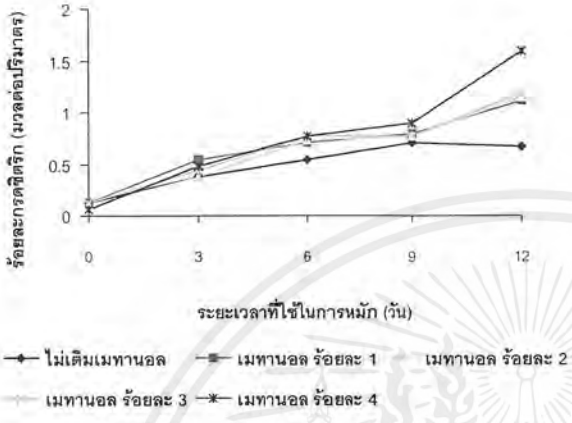
ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นที่แตกต่างกันมีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมักและปริมาณกรดซิตริกที่เพิ่ม โดยพบว่า *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้น ร้อยละ 4.0 จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 1.73 (แสดงดังรูปที่ 4-7 และตารางภาคผนวกที่ ง-3) ในขณะที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้น ร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 2.55 3.43 และ 1.96 ตามลำดับ สำหรับ *A.niger* TISTR 3106 จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นที่แตกต่างกัน พบว่า จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 1.53 (แสดงดังรูปที่ 4-8 และตารางภาคผนวกที่ ง-4) ในขณะที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้น ร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 1.69 1.61 และ 1.59 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าจากการใช้เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ การใช้ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 4 มีค่าความเป็นกรด-ด่างไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เมทานอลความเข้มข้นอื่นแต่จะแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับไม่การเติมเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

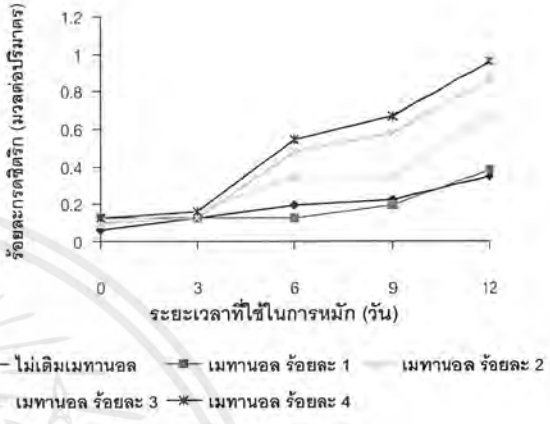
น้ำหนักเซลล์แห้ง ของ *A. niger* TISTR 3089 มีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน พบว่า ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 4.0 จะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 12 คือ 0.1566 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-9 และตารางภาคผนวกที่ ง-5) ในขณะที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้น ร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 จะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 0.1001 0.0845 และ 0.1133 กรัม ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 4.0 ไม่แตกต่างกับการใช้เมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 แต่แตกต่างทางสถิติกับการไม่เติมเมทานอล สำหรับ *A. niger* TISTR 3106 จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 12 คือ 0.2324 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-10 และตารางภาคผนวกที่ ง-6) ในขณะที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 จะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 0.1053 0.1212 และ 0.1516 กรัม ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 4.0 แตกต่างทางสถิติกับการใช้เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นที่แตกต่างกันมีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมัก โดยพบว่า *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้น ร้อยละ 4.0 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 0.000113 กรัม (แสดงดังรูป ที่ 4-11 และตารางภาคผนวกที่ ง-7) ในขณะที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 จะมีมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 0.000131 0.000235 และ 0.000119 กรัม ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 4.0 ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้เมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 แต่จะแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติมเมทานอล สำหรับ *A. niger* TISTR 3106 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นแตกต่างกัน พบว่า มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 0.000032 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-12 และตารางภาคผนวกที่ ง-8) ในขณะที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 0.000202 0.000140 และ 0.000139 กรัม ตามลำดับ

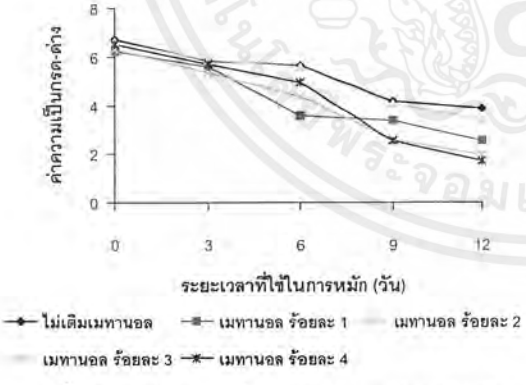
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



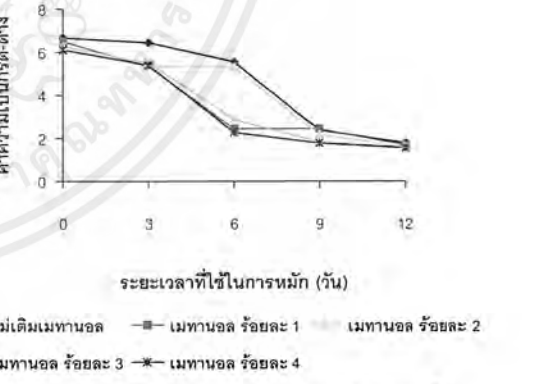
รูปที่ 4-5 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-6 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน

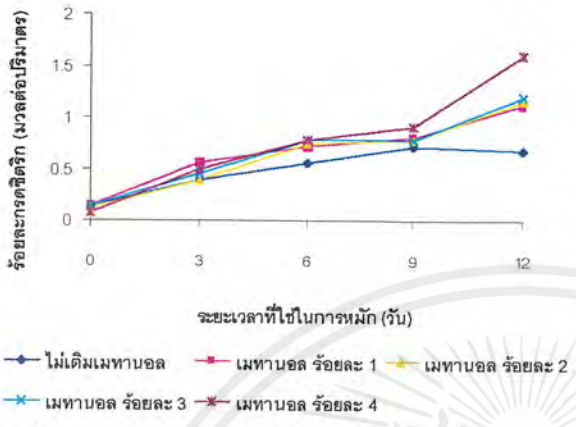


รูปที่ 4-7 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน

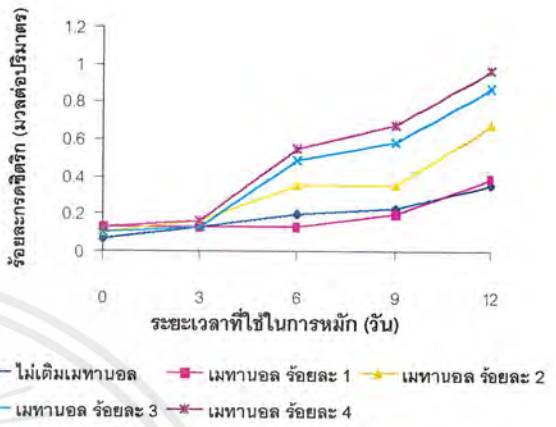


รูปที่ 4-8 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน

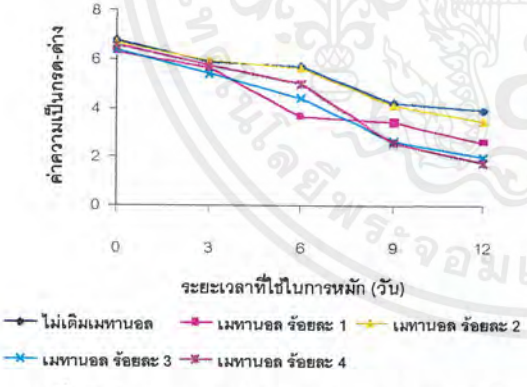
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



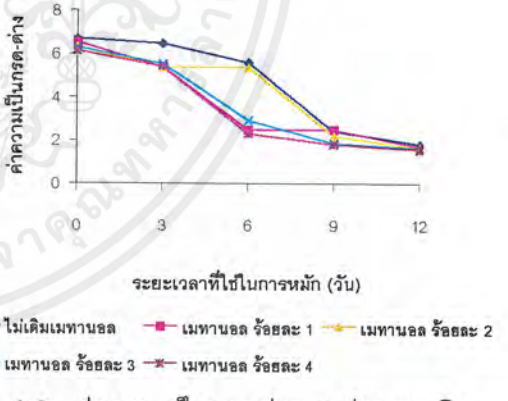
รูปที่ 4-5 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-6 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน

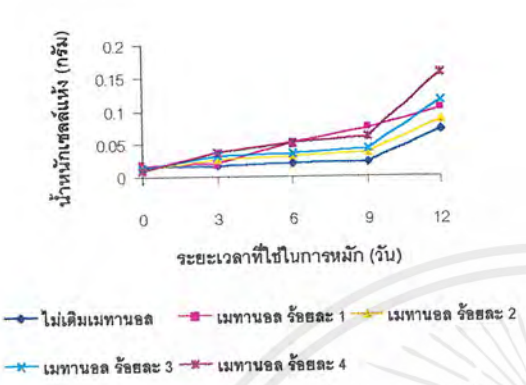


รูปที่ 4-7 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน

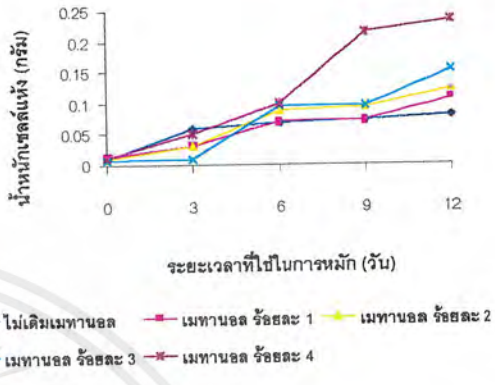


รูปที่ 4-8 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน

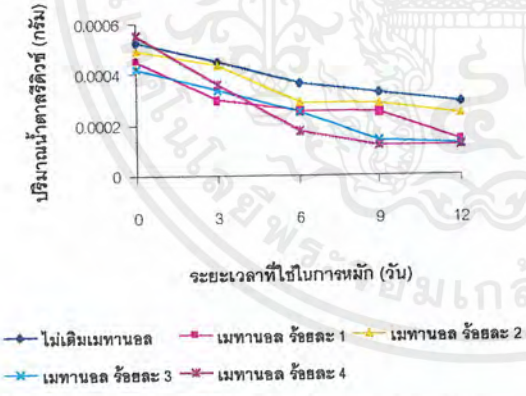
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



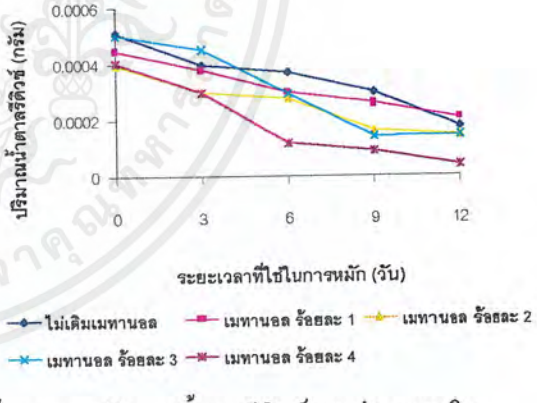
รูปที่ 4-9 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-10 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Andrew (1952) รายงานว่า แหล่งของคาร์โบไฮเดรตต่างๆ สามารถนำมาใช้ในการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ *A. niger* ได้ ทั้งแบบให้เชื้อเจริญที่ผิวหน้าและซับเมอร์จโดยการเติมแอลกอฮอล์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น เมทานอล ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1-4 (โดยปริมาตรของอาหาร) Chaudhary และคณะ (1978) กล่าวว่า การเติมเมทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4.0 ลงในอาหารที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกจะทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น เนื่องจากเมทานอลทำให้การเจริญ การสร้างสปอร์เกิดช้าลงและทำให้เชื้ออยู่ในช่วงที่เป็นเส้นใยนานขึ้นแต่การเติมเมทานอลหลังจากใส่กล้าเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง จะไม่ทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น Ingram และ Buttke (1984) กล่าวว่า เมทานอลมีผลต่อการผลิตกรดซิตริกคือมีผลต่อ membrane fluidity ของเชื้อราโดยมีผลต่อองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดของ cytoplasmic membrane ทำให้ปริมาณกรดซิตริกเพิ่มสูงขึ้น

3.2 การศึกษาการเติมแร่ธาตุ

3.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของ Fe^{2+}

โดยเติม $FeSO_4.7H_2O$ ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เข้มข้นร้อยละ 25 ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 50.0 75.0 100.0 125.0 และ 150.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน ในการเติม $FeSO_4.7H_2O$ ที่แตกต่างกัน พบว่า ที่ความเข้มข้น $FeSO_4.7H_2O$ 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร *A. niger* TISTR 3089 จะผลิตกรดซิตริกได้สูงถึงร้อยละ 2.3040 ในวันที่ 12 ของการหมักและเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกับการใช้ความเข้มข้นอื่น รวมทั้งการไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$ (แสดงดังรูปที่ 4-13 และตารางภาคผนวกที่ จ-1) ในขณะที่การเติม $FeSO_4.7H_2O$ เริ่มต้น 75.0 100.0 125.0 และ 150.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะผลิตกรดซิตริกสูงสุดได้ร้อยละ 1.4400 1.5040 1.4720 และ 1.5040 ตามลำดับ สำหรับการผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3106 ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นแตกต่างกัน พบว่า การเติม $FeSO_4.7H_2O$ เริ่มต้น เป็น 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดในวันที่ 12 ซึ่งจะผลิตกรดซิตริกได้สูงถึงร้อยละ 2.0160 ในขณะที่การเติม $FeSO_4.7H_2O$ เริ่มต้น 75.0 100.0 125.0 และ 150.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะผลิตกรดซิตริกสูงสุดได้ร้อยละ 2.0160 1.7280 1.8240 และ 1.7920 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการใช้ $FeSO_4.7H_2O$ เริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่มีความแตกต่างกับการใช้ความเข้มข้นอื่นแต่จะแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$ (แสดงดังในรูปที่ 4-14 และตารางภาคผนวกที่ จ-2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นแตกต่างกันมีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมักและปริมาณกรดซิตริกที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าการเติม $FeSO_4.7H_2O$ เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 1.90 (แสดงดังรูปที่ 4-15 และตารางภาคผนวก ที่ จ-3) ในขณะที่การเติม $FeSO_4.7H_2O$ เริ่มต้น 75.0 100.0 125.0 และ 150.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 2.02 1.92 2.01 และ 1.93 ตามลำดับ สำหรับ *A. niger* TISTR 3106 พบว่า การเติม $FeSO_4.7H_2O$ เริ่มต้น 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 1.65 (แสดงดังรูปที่ 4-16 และตารางภาคผนวกที่ จ-4) ในขณะที่การเติม $FeSO_4.7H_2O$ เริ่มต้น 75.0 100.0 125.0 และ 150.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 1.68 1.78 1.69 และ 1.74 ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การเติม $FeSO_4.7H_2O$ เริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่แตกต่างกับการใช้ $FeSO_4.7H_2O$ ที่ความเข้มข้นอื่น

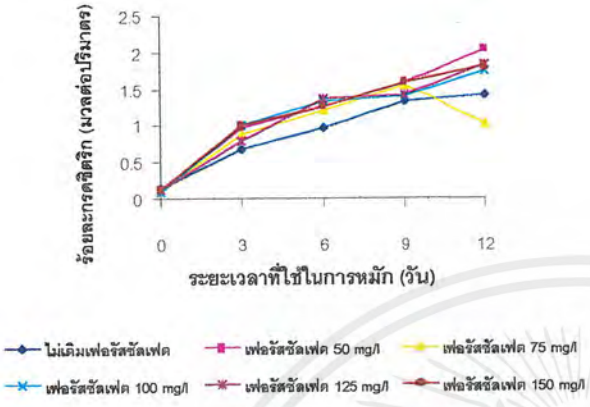
น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3089 มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมัก โดยพบว่า การเติม $FeSO_4.7H_2O$ 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 12 คือ 0.2869 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-17 และตารางภาคผนวกที่ จ-5) ในขณะที่การเติม $FeSO_4.7H_2O$ เริ่มต้น 75.0 100.0 125.0 และ 150.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 0.1693 0.2719 0.1810 และ 0.2008 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก สำหรับ *A. niger* TISTR 3106 พบว่า การเติม $FeSO_4.7H_2O$ 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 12 คือ 0.2636 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-18) ในขณะที่การเติม $FeSO_4.7H_2O$ เริ่มต้น 75.0 100.0 125.0 และ 150.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 0.2474 0.2194 0.2262 และ 0.2213 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติจากการใช้เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่าการเติม $FeSO_4.7H_2O$ 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งไม่แตกต่างกับการใช้ความเข้มข้นอื่นๆ (แสดงดังตารางภาคผนวกที่ จ-6)

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของ *A. niger* TISTR 3089 มีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมัก โดยพบว่า การเติม $FeSO_4.7H_2O$ 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 0.000059 กรัม เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการเติม $FeSO_4.7H_2O$

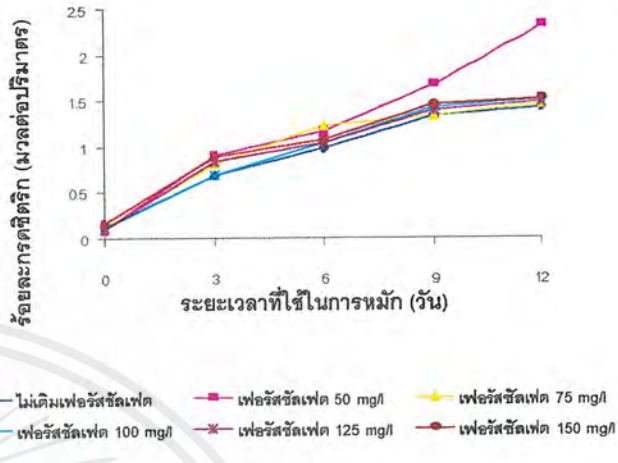
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

50.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างทางสถิติกับเติม $FeSO_4.7H_2O$ 75.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะแตกต่างทางสถิติกับการเติม $FeSO_4.7H_2O$ ความเข้มข้นอื่นรวมทั้งไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$ (แสดงดังรูปที่ 4-19 และตารางภาคผนวกที่ จ-7) ในขณะที่การเติม $FeSO_4.7H_2O$ เริ่มต้น 75.0 100.0 125.0 และ 150.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 0.000093 0.000078 0.000081 และ 0.000092 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก สำหรับ *A.niger* TISTR 3106 พบว่า การเติม $FeSO_4.7H_2O$ 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 0.000029 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-20 และตารางภาคผนวกที่ จ-8) ในขณะที่การเติม $FeSO_4.7H_2O$ 75.0 100.0 125.0 และ 150.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 0.000054 0.000060 0.000057 และ 0.000057 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การเติม $FeSO_4.7H_2O$ 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างทางสถิติกับการเติม $FeSO_4.7H_2O$ 75.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตรแต่จะแตกต่างทางสถิติกับการเติม $FeSO_4.7H_2O$ 125.0 และ 150.0 มิลลิกรัมต่อลิตรรวมทั้งการไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$

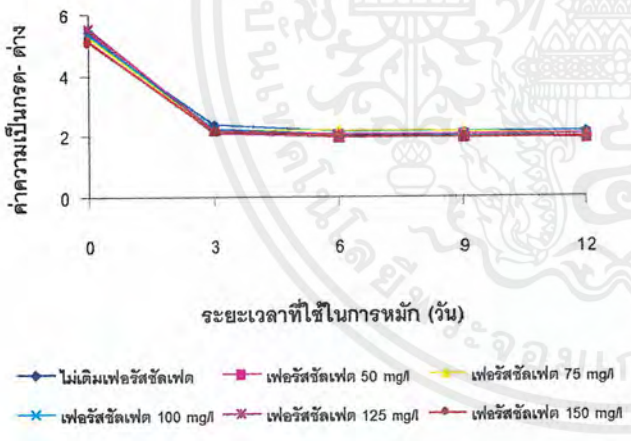
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



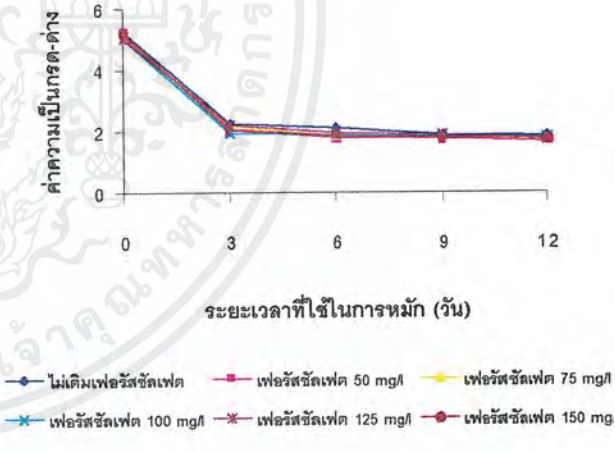
รูปที่ 4-13 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A.niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-14 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A.niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน

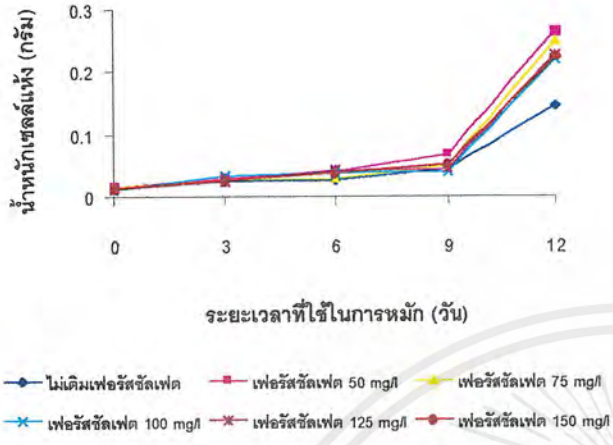


รูปที่ 4-15 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A.niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน

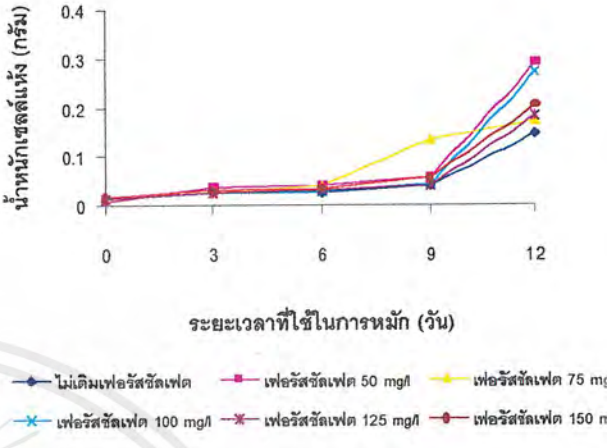


รูปที่ 4-16 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A.niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน

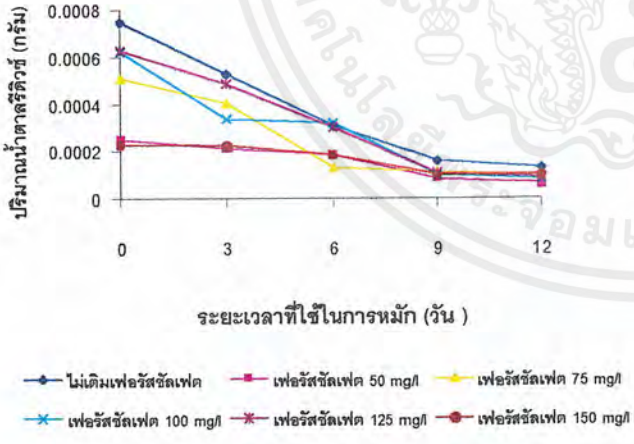
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



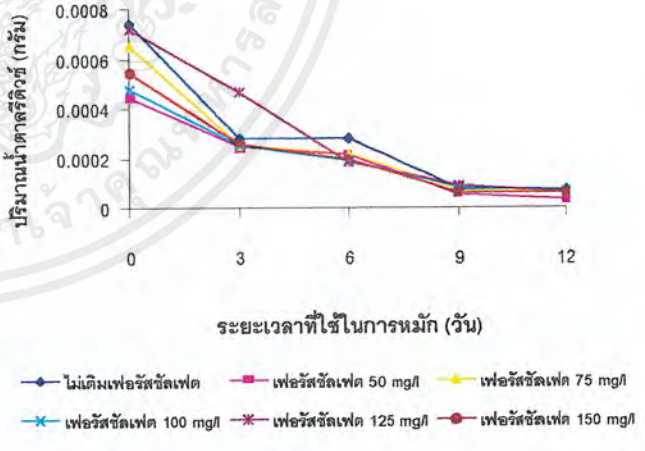
รูปที่ 4-17 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-18 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A.niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A.niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของ Cu^{2+}

โดยเติม $CuSO_4.5H_2O$ ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เข้มข้นร้อยละ 25 ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 6.0 12.0 18.0 24.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน ในการเติม $CuSO_4.5H_2O$ ที่แตกต่างกัน พบว่า ที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร *A. niger* TISTR 3089 จะผลิตกรดซิตริกได้สูงถึงร้อยละ 1.4080 ในวันที่ 12 ของการหมัก (ดังแสดงดังรูปที่ 4-21 และตารางภาคผนวกที่ จ-9) ในขณะที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ เริ่มต้น 6.0 12.0 18.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะผลิตกรดซิตริกสูงสุดได้ร้อยละ 1.1580 1.1840 1.2480 และ 1.1840 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการใช้ $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ $CuSO_4.5H_2O$ 18.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะแตกต่างทางสถิติกับการใช้ความเข้มข้นอื่นรวมทั้งการไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$ สำหรับการผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3106 พบว่า ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ เริ่มต้น 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดในวันที่ 12 ซึ่งจะผลิตกรดซิตริกได้สูงถึงร้อยละ 1.3760 (ดังแสดงดังรูปที่ 4-22 และตารางภาคผนวก ที่ จ-10) ในขณะที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 6.0 12.0 18.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะผลิตกรดซิตริกได้ร้อยละ 1.0880 1.2160 1.2480 และ 1.2800 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการใช้ $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ความเข้มข้นอื่น แต่จะแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ แตกต่างกันมีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมักและปริมาณกรดซิตริกที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้น 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 1.45 (แสดงดังรูปที่ 4-23 และตารางภาคผนวกที่ จ-11) ในขณะที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้น 6.0 12.0 18.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 1.61 1.58 1.57 และ 1.58 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการใช้ $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างทางสถิติกับความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและการไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$ แต่ที่ความเข้มข้นอื่นไม่มีความแตกต่าง สำหรับ *A.niger* TISTR 3106 พบว่า ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้น 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 1.54 (แสดงดังรูปที่ 4-24) ในขณะที่ความเข้ม $CuSO_4.5H_2O$ 6.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12.0 18.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 1.66 1.65 1.57 และ 1.54 ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการใช้ $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้ความเข้มข้นอื่น แต่จะมีค่าแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$ (แสดงดังตารางภาคผนวกที่ จ-12)

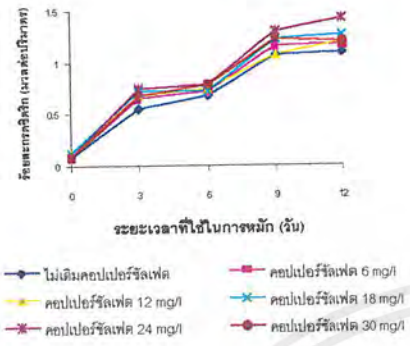
น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3089 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมัก โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 12 คือ 0.1849 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-25) ในขณะที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 6.0 12.0 18.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 0.1295 0.1305 0.1607 และ 0.1494 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีน้ำหนักเซลล์แห้งไม่แตกต่างทางสถิติกับ $CuSO_4.5H_2O$ 18.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตรแต่จะแตกต่างทางสถิติกับ $CuSO_4.5H_2O$ 6.0 และ 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตรรวมทั้งการไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$ (แสดงดังตารางภาคผนวกที่ จ-13) สำหรับ *A. niger* TISTR 3106 พบว่า ที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 12 คือ 0.1557 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-26) ในขณะที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 6.0 12.0 18.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 0.1175 0.1286 0.1411 และ 0.1461 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีน้ำหนักเซลล์แห้งไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้ความเข้มข้นอื่นแต่จะแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$ (แสดงดังตารางภาคผนวกที่ จ-14)

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของ *A. niger* TISTR 3089 มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมัก โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 0.000070 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-27 และตารางภาคผนวกที่ จ-15) ในขณะที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 6.0 12.0 18.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 0.000089 0.000086 0.000074 และ 0.000080 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างจากความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตรแต่จะแตกต่างทางสถิติกับ $CuSO_4.5H_2O$ ความเข้มข้นอื่นรวมทั้งการไม่เติม

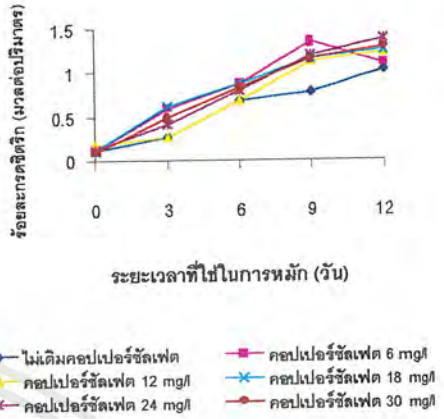
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$CuSO_4.5H_2O$ สำหรับ *A. niger* TISTR 3106 พบว่า ที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 0.000045 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-28 และตารางภาคผนวกที่ จ-16) ในขณะที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 6.0 12.0 18.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 0.000070 0.000075 0.000051 และ 0.000047 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการใช้ $CuSO_4.5H_2O$ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ความเข้มข้นอื่นรวมทั้งการไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$

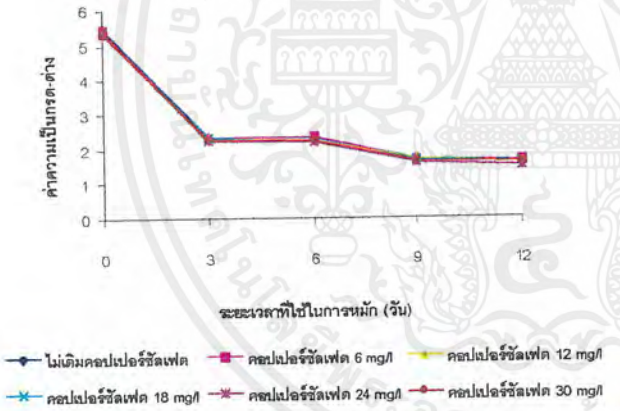
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



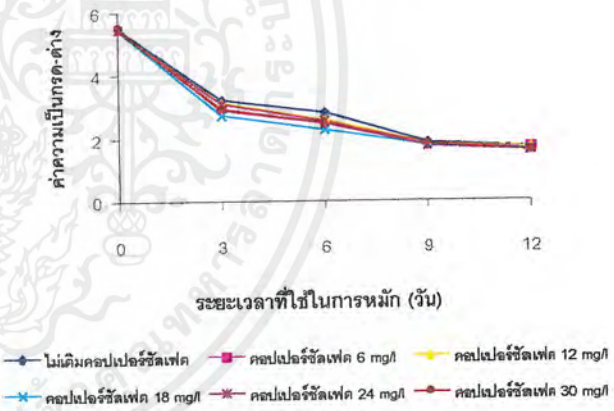
รูปที่ 4-21 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-22 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน

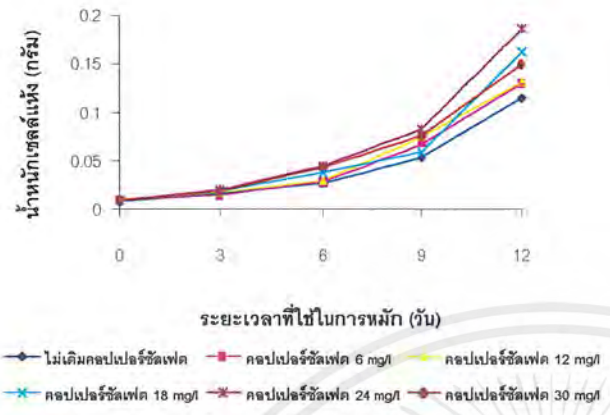


รูปที่ 4-23 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน

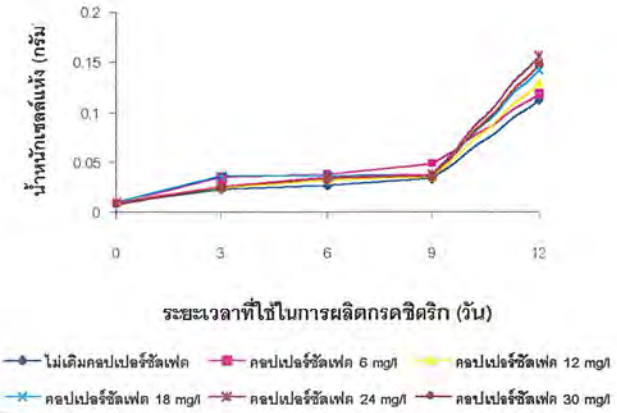


รูปที่ 4-24 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน

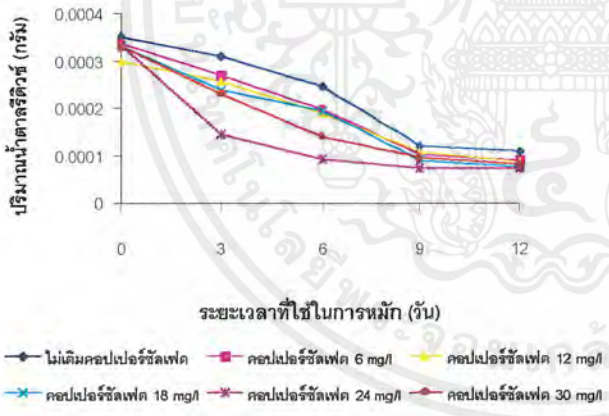
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



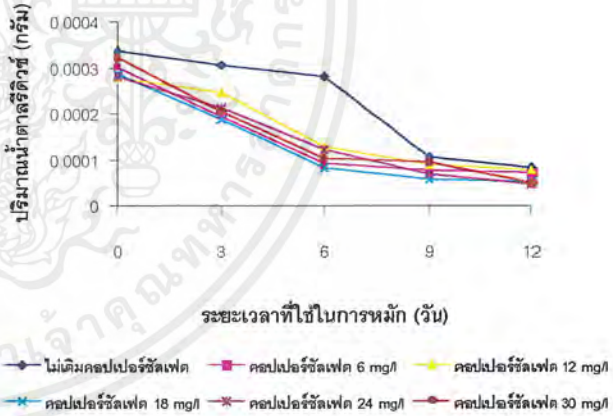
รูปที่ 4-25 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A.niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-26 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A.niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-27 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A.niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-28 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A.niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของ Zn^{2+}

โดยการเติม $ZnSO_4.7H_2O$ ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เข้มข้นร้อยละ 25 ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 20.0 40.0 60.0 80.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน ที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ แตกต่างกัน พบว่า ที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ เป็น 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตร *A. niger* TISTR 3089 จะผลิตกรดซิตริกได้สูงถึงร้อยละ 1.6640 ในวันที่ 12 ของการหมัก (ดังแสดงดังรูปที่ 4-29 และตารางภาคผนวกที่ จ-17) ในขณะที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 20.0 60.0 80.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะผลิตกรดซิตริกสูงสุดได้ร้อยละ 1.6320 1.5360 1.5040 และ 1.4400 ตามลำดับ สำหรับการผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3106 พบว่า ที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตร *A. niger* TISTR 3089 จะผลิตกรดซิตริกได้สูงถึงร้อยละ 1.5360 ในวันที่ 12 ของการหมัก (ดังแสดงดังรูปที่ 4-30 และตารางภาคผนวกที่ จ-18) ในขณะที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 20.0 60.0 80.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะผลิตกรดซิตริกสูงสุดได้ร้อยละ 1.5040 1.4400 1.5040 และ 1.4400 ตามลำดับ จากการใช้เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อนำปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ความเข้มข้นอื่นรวมทั้งการไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ แตกต่างกันมีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมักและปริมาณกรดซิตริกที่เพิ่ม โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 1.36 (แสดงดังรูปที่ 4-31 และตารางภาคผนวกที่ จ-19) ในขณะที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 20.0 60.0 80.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 1.37 1.38 1.43 และ 1.46 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของการใช้ $ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีความแตกต่างกับการใช้ความเข้มข้นอื่นยกเว้นที่ความเข้มข้น 60.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับ *A. niger* TISTR 3106 พบว่า ที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 1.40 (แสดงดังรูปที่ 4-32 และตารางภาคผนวกที่ จ-20) ในขณะที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 20.0 60.0 80.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 1.45 1.53 1.45 และ 1.53 ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมักเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างไม่แตกต่างกับการใช้ความเข้มข้นอื่นรวมทั้งการไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$

น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3089 มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมัก โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงสุดในวันที่ 12 คือ 0.1461 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-33 และตารางภาคผนวกที่ จ-21) ในขณะที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 20.0 60.0 80.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.1346 0.1120 0.1091 และ 0.1014 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก สำหรับ *A. niger* TISTR 3106 พบว่า ที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 12 คือ 0.1658 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-34 และตารางภาคผนวกที่ จ-22) ในขณะที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 20.0 60.0 80.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.1385 0.1131 0.1459 และ 0.0972 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก จากการใช้เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์เมื่อนำน้ำหนักแห้งมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับที่ความเข้มข้นอื่นรวมทั้งการไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$

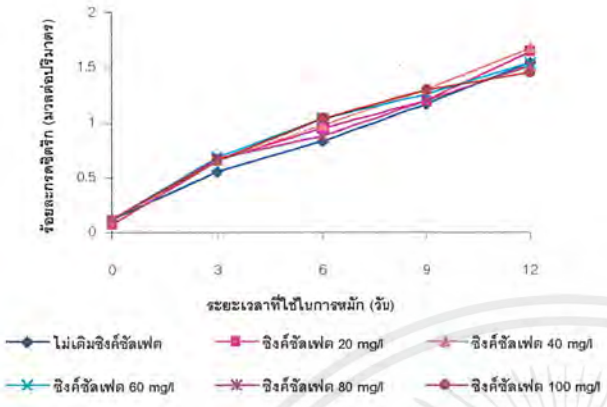
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของ *A. niger* TISTR 3089 มีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการหมัก โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 0.000057 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-35) ในขณะที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 20.0 60.0 80.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.000081 0.000082 0.000092 และ 0.000076 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างทางสถิติที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 20.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและการไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$ ส่วนที่ความเข้มข้นอื่นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (แสดงดังตารางภาคผนวกที่ จ-23) สำหรับ *A. niger* TISTR 3106 พบว่า ที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดในวันที่ 12 คือ 0.000057 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4-36) ในขณะที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 20.0 60.0 80.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.000060 0.000079 0.000067 และ 0.000061 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40.0 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

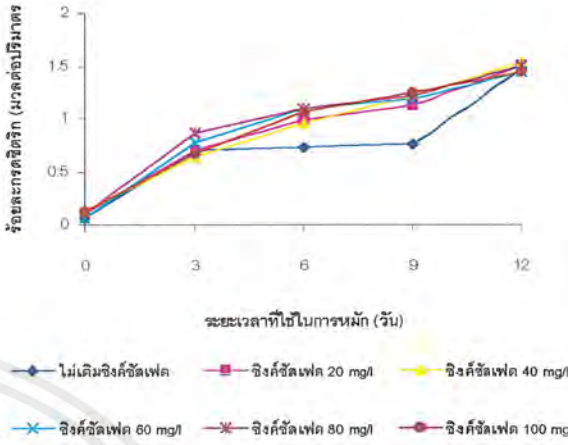
ต่อลิตรจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างทางสถิติที่ความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและการไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$ ส่วนที่ความเข้มข้นอื่นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (แสดงดังตารางภาคผนวกที่ จ-24)

จากการทดลองพบว่าในบรรดาแร่ธาตุหลายชนิดเหล่านี้ แร่ธาตุที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการหมัก คือ เฟอรัสไอออน (Fe^{2+}) และ ซิงค์ไอออน (Zn^{2+})โดยทั่วไปแล้วแร่ธาตุทั้งสองชนิดนี้ต้องมีความเข้มข้นต่ำจึงจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริก แต่ถ้าความเข้มข้นสูงจะทำให้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตยืดยาวออกไปอีก Schweiger (1961) รายงานว่าความเข้มข้นของ เฟอรัสไอออน (Fe^{2+}) เพียง 0.2 พีพีเอ็ม (หนึ่งส่วนในล้านส่วน) ภายใต้สภาวะการหมักในสภาพอาหารเหลว ก็ส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อการหมัก อย่างไรก็ตาม ถ้าเติมคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) ความเข้มข้น 0.1-500 พีพีเอ็มลงไปในน้ำจะไปช่วยลดความรุนแรงของเฟอรัสไอออน (Fe^{2+}) ลงมาได้มาก และจากการศึกษาของ Feddoseev (1970) พบว่าถ้าเติม $CuSO_4$. ในระดับ 4.7 มิลลิกรัมต่อกากน้ำตาล 100 กรัม จะช่วยทำให้การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลให้เป็นกรดซิตริกสูงขึ้น ส่วนความเข้มข้นซิงค์ไอออน (Zn^{2+}) ต่อการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อ *A. niger* มีลักษณะเช่นเดียวกับเฟอรัสไอออน ถ้าความเข้มข้นของซิงค์ไอออน (Zn^{2+}) อยู่ในระดับ 1-2 ไมโครโมล จะทำให้ช่วงการเจริญเติบโตของเชื้อราเกิดอย่างต่อเนื่องแต่ถ้าใช้ความเข้มข้นต่ำกว่า 1 ไมโครโมลกลับยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริกด้วยเช่นกัน

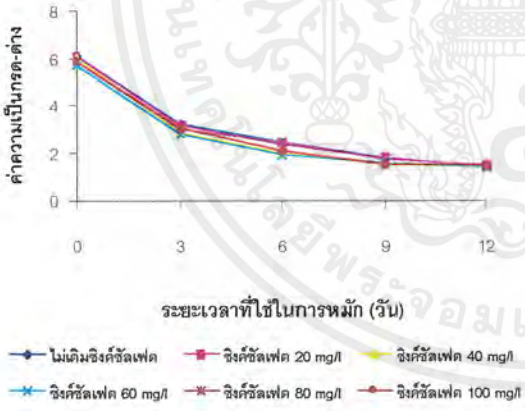
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



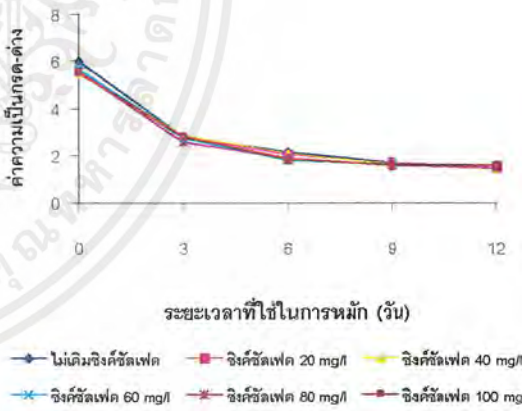
รูปที่ 4-29 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-30 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+}

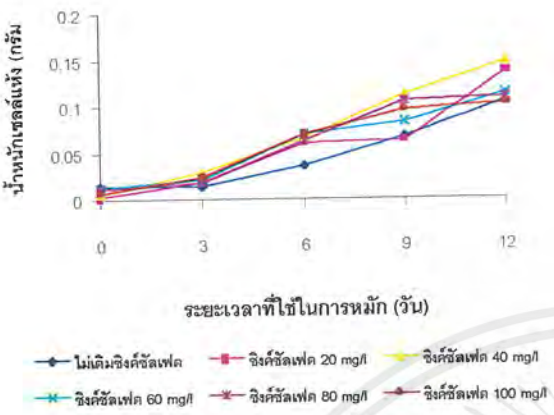


รูปที่ 4-32 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน

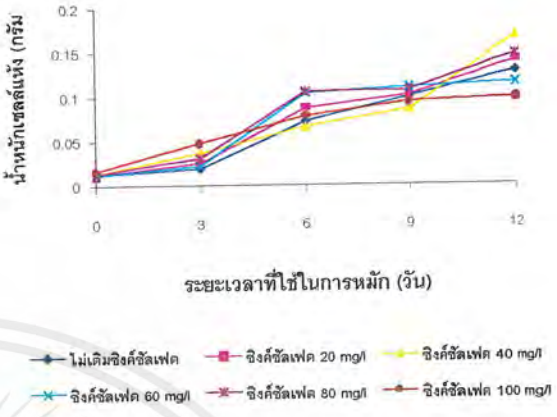


รูปที่ 4-32 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน

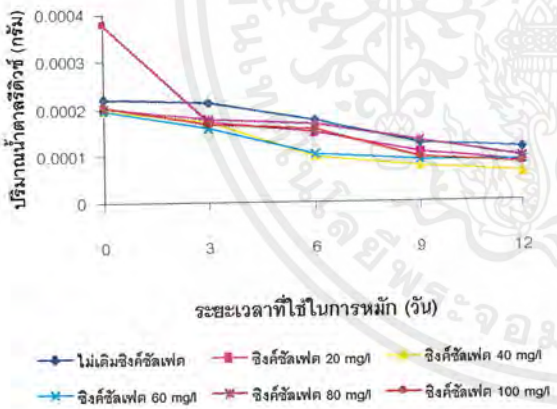
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



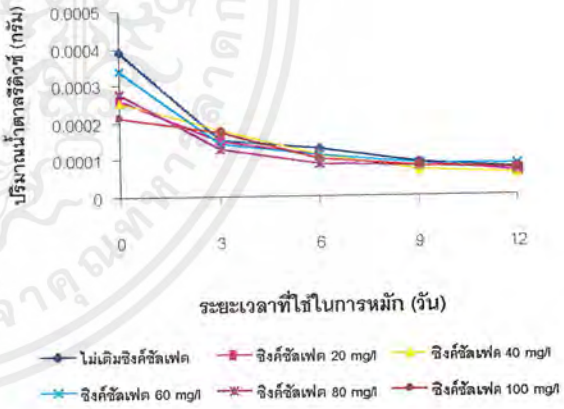
รูปที่ 4-33 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-34 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-35 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 4-36 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่า ลักษณะของเหลวที่สกัดได้จะมีสีเขียวอ่อนนุ่มหนืดเล็กน้อย มีรสเปรี้ยวอมหวาน มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ น้ำสกัดที่ได้มีความเป็นกรด โดยทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างก่อนการหมักพบว่ามีความเป็นกรด-ด่างประมาณ 3.2 ค่าซีโอดี 3.8×10^{6} มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 0.168 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 1.05 ปริมาณของแข็งทั้งหมด 285.81 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งแขวนลอย 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 1.945 ปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 0.969 และปริมาณกรดซิตริกเริ่มต้นร้อยละ 0.749 รวมทั้งแร่ธาตุบางชนิด เช่น ทองแดง 0.075 พีพีเอ็ม เหล็ก 1.032 พีพีเอ็ม แมกนีเซียม 0.138×10^{2} พีพีเอ็ม แคลเซียม 0.924×10 พีพีเอ็ม แมงกานีส 0.333 พีพีเอ็ม และสังกะสี 0.385 พีพีเอ็ม

ในการศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger* ซึ่งสายพันธุ์ที่ศึกษา คือ *Aspergillus niger* TISTR 3089, *Aspergillus niger* TISTR 3106, *Aspergillus niger* TISTR 3245, *Aspergillus niger* TISTR 3349, และ *Aspergillus niger* TISTR 3350 จากการทดลองพบว่า *Aspergillus niger* TISTR 3089 จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงกว่าสายพันธุ์อื่น คือ ให้ปริมาณกรดซิตริกร้อยละ 0.27 ในวันที่ 12 ของการหมัก รองลงมาเป็น *Aspergillus niger* TISTR 3106 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า *Aspergillus niger* ทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณกรดซิตริกแตกต่างจากการใช้สายพันธุ์อื่นๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักแห้งควบคู่ไปด้วย ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อสร้างขึ้น โดยพบว่าจากการใช้ *Aspergillus niger* TISTR 3089 จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดคือ 1.47 รองลงมาเป็น *Aspergillus niger* TISTR 3106 มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 1.56 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยการใช้ *Aspergillus niger* TISTR 3089 ในวันที่ 12 ของการหมักจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยที่สุด รองลงมาเป็น *Aspergillus niger* TISTR 3106 สำหรับน้ำหนักเซลล์แห้งจะมีค่าเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตลอดระยะเวลาการหมัก 12 วันโดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดคือ 0.5320 กรัม รองลงมาเป็น *Aspergillus niger* TISTR 3106 ซึ่งมีน้ำหนัก เซลล์แห้ง 0.3405 กรัม เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักเซลล์แห้งของการใช้ *A. niger* สายพันธุ์ต่างๆ พบว่า *A. niger* TISTR 3089 และ *A. niger* TISTR 3106 มีค่าเหล่านี้ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่จะแตกต่างทางสถิติกับการใช้ *A. niger* TISTR 3245 *A. niger* TISTR 3349 และ *A. niger* TISTR 3350 จึงได้คัดเลือก *A. niger* TISTR 3089 และ *A. niger* TISTR 3106 ใช้ในการศึกษาต่อไป

ผลของการเติมสารกระตุ้นเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจาก *A. niger* สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้โดยใช้ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 1.0 2.0 3.0 4.0 และการไม่เติมเมทานอล พบว่าที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 4.0 ให้ปริมาณกรดซิตริกสูงกว่าที่ใช้ความเข้มข้นอื่นคือ ให้ปริมาณกรดซิตริกร้อยละ 1.600 และร้อยละ 0.9600 จากการใช้ *A. niger* TISTR 3089 และ *A. niger* TISTR 3106 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการใช้ *A. niger* ทั้งสองสายพันธุ์ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการใช้ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 4.0 ไม่มีความแตกต่างกับการใช้ความเข้มข้นอื่นแต่จะแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติมเมทานอล สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างจากการใช้ *A. niger* ทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลสอดคล้องกับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อผลิตขึ้น ขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นโดยพบว่าการใช้ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 4.0 น้ำหนักเซลล์แห้งจะมีค่าสูงสุดในวันที่ 12 คือ 0.1566 กรัม เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้นนี้น้ำหนักเซลล์แห้งจะไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติกับการใช้เมทานอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 1.0 2.0 และ 3.0 แต่จะมีความแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติมเมทานอล สำหรับ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นร้อยละ 4.0 จะมีน้ำหนักแห้งสูงสุดเช่นกัน เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 4.0 จะมีค่าแตกต่างทางสถิติที่ความเข้มข้นเมทานอลร้อยละ 1.0 2.0 3.0 และไม่เติมเมทานอล สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรดิวซ์ที่ลดลงก็ให้ผลทำนองเดียวกันกับน้ำหนักเซลล์แห้ง

ศึกษาความเข้มข้นของเฟอรัสไอออน (Fe^{2+}) โดยเติมในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในรูป $FeSO_4.7H_2O$ พบว่า จากการใช้ *A. niger* TISTR 3089 และ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นของ $FeSO_4.7H_2O$ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีปริมาณกรดซิตริกสูงสุดคือร้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละ 2.304 และ 2.0160 ในวันที่ 12 ของการหมักตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าส่วนใหญ่จะไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้ $FeSO_4.7H_2O$ ที่ความเข้มข้น 75 100 125 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตรแต่จะแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$ สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงและน้ำหนักเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมีการเปลี่ยนแปลงสอดคล้องกับปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดยพบว่าที่ความเข้มข้น $FeSO_4.7H_2O$ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำสุดคือ 1.90 และ 1.65 ในวันที่ 12 ของการใช้ *A. niger* TISTR 3089 และ *A. niger* TISTR 3106 ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็ลดลงต่ำสุดที่ความเข้มข้นนี้ ขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุด

ศึกษาความเข้มข้นของคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) โดยเติมในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในรูป $CuSO_4.5H_2O$ พบว่าการใช้ *A. niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24 มิลลิกรัมจะมีปริมาณกรดซิตริกสูงสุด คือร้อยละ 1.4080 ในวันที่ 12 ของการหมัก รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 18 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งให้ปริมาณกรดซิตริกร้อยละ 1.2480 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีปริมาณกรดซิตริกไม่แตกต่างกับที่ความเข้มข้น 18 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะแตกต่างทางสถิติเมื่อใช้ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 6 12 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตรรวมทั้งการไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$ สำหรับการใช้ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น $CuSO_4.5H_2O$ 24 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดคือร้อยละ 1.3760 ในวันที่ 12 ของการหมัก และปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากความเข้มข้นนี้ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้ $CuSO_4.5H_2O$ 6 12 18 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$ สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงและน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นก็สัมพันธ์กับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อสร้างขึ้น เมื่อนำค่าเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้นของ $CuSO_4.5H_2O$ 24 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีค่าไม่แตกต่างกับการใช้ $CuSO_4.5H_2O$ ที่ความเข้มข้นอื่นๆ แต่จะแตกต่างทางสถิติกับการไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$

ศึกษาความเข้มข้นของซิงค์ไอออน (Zn^{2+}) โดยการเติมในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในรูป $ZnSO_4.7H_2O$ พบว่าการใช้ *A. niger* TISTR 3089 และ *A. niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น $ZnSO_4.7H_2O$ 40 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดคือร้อยละ 1.6640 และ 1.5360 ในวันที่ 12 ของการหมัก ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณกรดซิตริกที่ความเข้มข้นนี้ไม่แตกต่างกับที่ความเข้มข้น 20 60 80 และ 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อลิตรรวมทั้งการไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$ สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงและน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นก็สัมพันธ์กับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อผลิตขึ้นเช่นเดียวกัน

ข้อเสนอแนะ

- จากการศึกษาที่พบว่าแร่ธาตุแต่ละชนิดมีผลต่อการผลิตกรดซิตริกจึงน่าจะคาดการณ์ได้ว่าหากแร่ธาตุเหล่านี้โดยเฉพาะเหล็กและทองแดงเป็นองค์ประกอบในอาหารที่ใช้ผลิตกรดซิตริกก็อาจทำให้การผลิตกรดซิตริกเปลี่ยนแปลงไปอีก ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาผลร่วมของเหล็กและทองแดงที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริกเพื่อให้ผลการทดลองที่ได้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กำเนิด สุภัณวงษ์. 2534. จุลชีวอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่, กรุงเทพฯ.

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

จิราภรณ์ โล่วงศ์วัฒนะ. 2525. การผลิตกรดซิตริกจากกากมันสำประหลังโดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ฉัตร ช่ำชอง และ วุฒิ หวังวัชรกุล. 2528. การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพและศักยภาพการผลิตและ การใช้กรดอินทรีย์ รวมทั้งความต้องการในงานวิจัยและพัฒนาในประเทศ ไทย. ศูนย์พันธุวิศวกรและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, กรุงเทพ. 40 น.

ชัยวัฒน์ บรรใดเพ็ชร. 2536. การผลิตกรดมะนาวโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

เทวี โพธิผละ. 2536. การใช้วัตถุเจือปนในอาหาร. โครงการส่งเสริมการแต่งตำรา. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช, กรุงเทพฯ.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กรุงเทพฯ. 2526. มาตรฐานอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริก. (มอก. 464-2526)

อรพิน ภูมิภร. 2526. ระบบชีวภาพที่สำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพ เล่มที่ 1. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. 2529. กรดซิตริก วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์. 5(3) : 405-423.

Al-Obaidi, Z.S. and Berry, D.R. 1979. Extenden production of citric acid using an exchange filtration technique. Biotechnol. Leit. I, 221-224.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 method for the examination of water and waste water. 18th ed. American public health association, Inc., New York.

Aravan tinos-Zafiris, G., Tzia, C., Oreopoulon, V., Thomopoulos, C.D. 1994. Fermentation of orange processing waste for citric acid production. Journal of the Science of Food and Agriculture. 65(1) : 117-120.

Banik, A.K. 1975. Fermentative production of citric acid by *Asppergillus niger* strain selection and optimum cultural conditions for improved citric acid production. J. Fd. Sci. and Technol. India. 12 : 111-114.

C. Cameselle, J.T. Bohlmann, M.J. Nunez, J.M. 1998. Lema : Oxalic acid production by *Aspergillus niger*, Part I : Influence of sucrose and milk whey as carbon sucrose, Bioprocess Engineering. 19 : 247-252.

Chaudhary, K., Kakshminarayana, K., Dev., I.K. and Vyes, S.R. 1974. Nitrosoguanidine induced mutation of *Aspergillus niger* for obtaining high citric acid producing mutant. Ind. J. Microbiol. 14 : 42-43.

Chaudhary, K., S. Ethiraj, K. Lakshminarayama and P. Tauro. 1978. Citric acid production from Indian cane molasses by *Aspergillus niger* under solid state fermentation conditions. J. Ferment. Technol. 56(5) : 554-557.

Cleland, W.W. and M.J. Johnson. 1954. Tracer experiments on the mechanism of citric acid fermentation by *Aspergillus niger* . J. Biol. Chem. 208 : 679-689.

Crueger, W. and A. Crueger. 1982. Biotechnology : A text book of Industrial Microbiology. Sinauer Associates, Sunderland. 308 p.

Currie, J.N. 1917. The citric acid fermentation of *Aspergillus niger* . J. Biol. Chem. 31 : 15-37.

Das, A. 1972. Strain selection in Citric acid fermentation. Current Sci. 41 : 593-596.

Department of Customs. 1984. Foreign Trade Statistie of Thailand. Technique and Statistic Division, Department of Customs, Bangkok.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dittmar, E.K. 1956. A composcicao da polpa diferents variedades de cacau da Bahai. Instiituto de Technologia da Bahia. Boletim 14 : 9 p.

Doelger, W.P., and Prescott, S.C. 1934. Citric acid fermentation. Ind. Eng. Chem. 26 : 1142. El-Samragy, Y.A., Khorshid, M.A., Foda, M.I., Shehata, A.E. 1996. Effect of fermentation condition on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger*. Internationl Journal of Food Microbiology. 29(2/3) : 411-416.

El-sharkawy, Y.A., Abdul Karim, M.I. and Yin, W.S. 1995. Production of citric acid from Cocoa juice waste. Journal of ASEAN Food. 10 : 112-114.

Flores, J.L., Gutierrez-Correa, M., Tengerdy, R.P. 1994. Citric acid product by solid state fermentation of prickiy pear peel with *Aspergillus niger*. Agro Food Industrial hi-tech. 5(1) : 18-20.

Forster, J.W., Carson, S.F., Ruben, S. and kamen, M.D. 1941. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 27 , 590 . *In* Industrial microbiology. (ed. S.C. Prescott, and C.G. Dunn), Srd. pp. 533-577, McGraw-Hill Book Comp. Inc., N.Y., Toronto, London. 1959.

Frazier, W.C. 1967. Food microbiology. 2nd ed. McGraw-hill Book Comp., N.Y.,537 p. Gaden, E.L. 1955. Fermentation Kimetics and productivity. Chem. Ind. 12 : 154-165.

Hanna, M.A., Sarwar, M.G., Baten, A. and Chaudhury, N. 1976. Stepwise mutatinal improvement of *Aspergillus niger* for citric acid productivity in cane molasses. Folia Microbiologica. 21 : 409-412.

Hossain, M., Brooks, J.D. and Maddox, I.S. 1983. Production of citric acid from whey peameate by fermentation using *A. niger*. J. Dairy Sci. Technol. 18 : 161-168.

Hossain, M., Brocks, J.D. and Maddox, I.S. 1984. The effect of the sugar source on citric acid production by *A. niger* . Appl. Microbiol. Biotechnol. 19 : 393-394.

Khare, S.K., Jha, K., Gandhi, A.P. 1994. Use of agarose-entrapped *Aspergillus niger*. cells for the production of citric acid from soy whey. Applied Microbiology and Biotechnology. 45(5) : 571-573.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kirk, O. 1964. Encyclopedia of Chemical Technology. Vol5. New York. 857 p.

Kubicek, C.P. and M.Rohr. 1986. Citric acid fermentation. CRC. Reviews in biotechnol. 3 : 331-373.

Miall, L. M. 1978. Organic acids. *In* : Economic micbiology. (Ed. A.H. Rose), vol. 2, pp. 47-119, Academic Press, London.

Milsom, P.E. and J.L. Meers. 1985. Citric acid pp. 665-680. *In* M.Moo-Young (ed.). Comprehensive Biotechnology Vol. 3 : The Practice of Biotechnology : Current Commodity Products. Pergamon Press, New York.

Noyes, R. 1969. Citric acid production process. New Jessy, U.S.A.

Porgers, n. 1932. Am. J. Botany. 19 : 559-567. *In*: Industrial. Microbiology. (ed. S.C. Prescott, and C.G. Dunn), 3 rd ed., pp. 533-577, McGraw-Hill Book Comp. Inc., N.Y., Toronoto, London. 1959.

Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. Industrial Microbiology. 3 rd ed., McGraw-Hill Book Comp. Inc., N.Y., toronto, London. pp. 533-577.

Rohr, M. and C.P. kubicek. 1981. Regulatory Aspects of citric acid by *Aspergillus niger*. Proc. Biochem. 16 : 34-37.

Satta, M.L, Sakai, Y and Takahachi, F. 1999. Citric acid fermentation by magnetic drum Contactor : Use of methanol and ethanol for higher production. Journal of bioscience and Bioengineering. 87(3) : 394-396.

Sarangbin, S., Kirimura, K., Usami, S. 1993. Citric acid production from cellobiose by 2-deoxyglucose-resistant mutant strain of *Aspergillus niger*. in semi solid culture. Applied Microbiology and Biotechnology. 40(2/3) : 206-210.

Shakaranand, V.S. and Lonsane, B.K. 1994. Coffee husk : an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger*. In solid state frementation system. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 10(2) : 165-168.

Shepard., M.W. 1963. U.S. Patent. 3, 083, 144.

Shu, P., A. Fung and A.C. Neish. 1954. Mechanism of citric acid formation from glucose by *Aspergillus niger*. Can. J. Biochem. Physiol. 32 : 68-80.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Smell, R.L. and Schweiger, L.B. 1949. Production of citric acid by fermentation. U.S. Patent. 2, 492, 667.

Steel, R., S.M. Martin and C.P. Lentz. 1954. A standard inoculum for citric acid production in submerged culture. Can. J. Microbiolo. 1:150-157.

Verhoff, F.H. and J.E. Spradlin. 1976. Mass and Energy balance analysis of metabolic pathways applied to citric acid production by *A. niger*. Biotechnol. Bioeng. 18 : 425 p.

Wehmer., C. 1893. Note sur la fermentation citrique. Bull. Soc. Chim. Fr. 9: 728-730.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

<u>อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ</u>

potato Dextose Agar (PDA)

มันฝรั่งปอกเปลือกและหั่น	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	กรัม

1. ต้มมันฝรั่งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
2. กรองเอาน้ำใส เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร
3. เติมกลูโคสและ agar แล้วต้มให้ละลาย
4. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

ก. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Somgyi Nelson's method

สารละลาย Copper reagent ประกอบด้วย

1. 10% $CuSO_4.5H_2O$ 100 มิลลิลิตร (10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)
2. Phosphate-tartrate solution เตรียมโดยสารละลาย Na_2HPO_4 28 กรัม (หรือ $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ 70.5495 กรัม) ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Sodium potassium tartrate (Tetrayhdrat) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติม 1 N NaOH 100 มิลลิลิตร ตามด้วย Na_2SO_4 (Anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษ Whatman no. 4
3. ผสมสารละลายในข้อ 1 (100 มิลลิลิตร) และข้อ 2 (900 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน)

Nelson' Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

1. ละลาย Ammoniummolybdate $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O]$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. Disodium arsenate ($Na_2HasO_4.7H_2O$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร
3. ผสมสารละลายในข้อ 1 และข้อ 2 เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง และควรเก็บในขวดสีชา

<u>วิธีการ</u>

1. เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้ว เติม 1 มิลลิลิตร Copper reagent แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดแก้วเพื่อลดการระเหยของน้ำ
2. ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ เติม Arsenomolybdate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2นาที จะเห็นสีเขียว หรือ น้ำเงินเขียว ขึ้นกับปริมาณน้ำตาล
3. เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

คำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐานกลูโคส}} \times 10^{-6}$$

ข. การหาน้ำหนักแห้ง : ดำเนินงานตามวิธีของ Miller Method ดังนี้

วิธีการ

1. นำกระทงอะลูมิเนียมและกระดาษ Whatman อบที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำไปตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง (desicator) แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งที่แน่นอน (W_1)

2. นำตัวอย่างที่ทำการแยกโดยผ่านกระดาษกรอง Whatman นำตะกอนที่ได้พร้อมกระดาษกรองไปใส่ในกระทงอลูมิเนียมที่อบไว้

3. อบที่ 80 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ประมาณ 24-48 ชั่วโมง

4. นำมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก (W_2)

5. นำค่าน้ำหนักมาทำการคำนวณก็จะได้ค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ในอาหารต่อปริมาตรตัวอย่าง

คำนวณ

$$\text{น้ำหนักแห้ง} = \frac{(W_2 - W_1)}{\text{ปริมาตร ตัวอย่างที่ใช้}}$$

ค. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดซิตริก

วิธีการ

1. นำน้ำตัวอย่างที่กรองด้วยกระดาษ Whatman เพื่อนำเอาตะกอนออก นำส่วนใสที่ได้มา 5 มิลลิลิตร

2. นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. นำมาไทเทรตด้วย NaOH 0.1 นอร์มอล เติม phenopthalene เป็น indicator pH ประมาณ 8.5

4. จดปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ นำไปคำนวณ จะได้ปริมาณกรดซิตริกในตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณกรดกรดซิตริก (ร้อยละ) = ปริมาตร NaOH x ความเข้มข้นของ NaOH x 64 x 100
มิลลิลิตรของสารตัวอย่าง x 1,000

ง. การวิเคราะห์หาระดับความเป็นกรด-ด่าง

วิธีการ

ใช้เครื่อง pH meter ในการวัดจากตัวอย่าง ทำการอ่านค่าที่ได้

จ. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (โดยวิธีกรดบอริก)

สารเคมี

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4,000 กรัมในน้ำกลั่น 10 ลิตร

- กรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 ผสมกับบรอมครีซอล กรีน และเมทิลเรด

ละลายกรดบอริก 400 กรัม ในน้ำกลั่น 6 ลิตร นำไปตั้งบน hot plate ต้มจนสารละลายหมดเติมน้ำกลั่นที่ร้อน 3 ลิตร ทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง เติมบรอมครีซอล กรีน 100 มิลลิลิตร และเมทิลเรด 70 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 ลิตร คนให้เข้ากันดี

ดูดสารละลายกรดบอริกมา 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ถ้าสารละลายในขวดรูปชมพู่ยังคงมีสีแดง ให้ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งกลายเป็นสีม่วงเทา คำนวณปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่จำเป็นต้องเติมลงในกรดบอริก 10 ลิตร

มิลลิตร ของ 1.0 โมลาร์ Alkaoi = มิลลิตรของการไทเทรต x 40

เติมปริมาณที่คำนวณได้ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ลงในสารละลายกรดบอริกผสมให้เข้ากัน

- กรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล

เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 17 มิลลิลิตรใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร หาความเข้มข้นที่แน่นอนโดยไทเตรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล หรือ Na_2CO_3 0.2 นอร์มอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Na_2CO_3 0.2 นอร์มอล

นำ anhydrous Na_2Co_3 ประมาณ 10 กรัม บดด้วยครกให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 265 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง หรืออุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์

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

คำนวณ

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

- การทำ standarize กรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล (เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอน)

1. ปิเปต สารละลาย Na_2CO_3 ที่เตรียมไว้ 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร
2. หยดเมทิล ออเรนจ์ 2 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ จะได้สารสีเหลือง
3. ใส่กรดไฮโดรคลอริกที่ต้องการทราบความเข้มข้นในบิวเรต
4. นำสารละลาย Na_2CO_3 ที่อยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่มาไตรเตรตกับกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอลจนถึงจุดยุติ สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีจำปา จดปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้
5. นำไปให้ความร้อน จนเดือดน้อยๆ เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเหลือง ให้ทิ้งไว้จนเย็นแล้วนำมาไตเตรตต่อจนถึงจุดยุติอีก
6. นำปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ได้ไตเตรตได้มารวมกัน
7. ทำซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตรเขย่าเบาๆ

4. นำ digestion tube วางลงในเครื่องย่อย ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 องศาเซลเซียส แล้วเปิดเครื่องดูดควัน

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

6. เปิดก๊อกน้ำเพื่อหล่อเย็นเครื่องควบแน่นและเปิด power ของเครื่องกลั่น (Kjeltec)

7. กดปุ่ม Alkali = 2-3 จนแน่ใจว่าในท่อต่างๆ ไม่มีฟองอากาศเหลืออยู่

8. warm เครื่องกลั่น โดยใช้ขวดแก้วรูปชมพู่และ digestion tube เปล่า 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 จุ่มลงในสารละลายปิด Safty door เครื่องจะทำงานโดยมีน้ำกลั่นลงมาเจือจางสารตัวอย่าง แล้วตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้น steam จะทำงาน

12. เมื่อกลั่นจนเสร็จแล้วนำขวดแก้วรูปชมพู่และ digestion tube ออกจากเครื่องแก้วทำการกลั่นตัวอย่างใหม่ต่อไป

13. นำขวดแก้วรูปชมพู่ซึ่งมี distillate เป็นสารละลายสีเขียวไปไตเตรตกับกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล จนถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเทา

<u>คำนวณ</u>

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ. สารแขวนลอย (Suspened Solid)

อุปกรณ์

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

วิธีวิเคราะห์

1. อบกระดาษกรองใยแก้วในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง
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. ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองที่เพิ่มขึ้น

คำนวณ

$$\text{ปริมาณสารแขวนลอย (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักตะกอน(มิลลิกรัม)} \times 1,000}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่าง}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช. ของแข็งทั้งหมด (Total Solids)

อุปกรณ์

1. จานระเหย
2. เครื่องอังน้ำ
3. เตาอบน้ำ
4. เดซิเคเตอร์
5. เครื่องชั่งอย่างละเอียด

วิธีวิเคราะห์

1. นำจานระเหยไปอบให้แห้งและมีน้ำหนักคงที่ในตู้อบอุณภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์แล้วชั่งหาน้ำหนักของจานระเหย
2. เลือกใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำที่เหมาะสม (50.0-100.0 มิลลิลิตร)
3. ค่อยๆ รินตัวอย่างน้ำที่ต้องการลงในจานระเหย นำไปอังบนเครื่องอังไอน้ำเมื่อน้ำระเหยหมด นำจานไปอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์
4. ชั่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือน้ำหนักของของแข็งทั้งหมด

คำนวณ

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

ซ. 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 ($AgSO_4$) 5.5 กรัม ต่อกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 กิโลกรัม (ต้องใช้เวลาในการละลายประมาณ 1-2 วัน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$) 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 ตั้งทิ้งให้ไว้เย็น นำมาไตเตรตด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้เฟอโรอินเป็นอินดิเคเตอร์ (2-3 หยด)

คำนวณ

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

4. สารละลายเฟอโรอินดิเคเตอร์

5 เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดผง ใช้กำจัดหมู่คลอไรด์

6 กรดซัลฟามิกชนิด เออาร์ (Sulfamic acid) ใช้กำจัดไนไตรท์

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งเมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$X 0.4 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม
2. เติมตัวอย่างน้ำที่ต้องการวิเคราะห์ 20.0 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างน้ำที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10.0 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่มีซิลเวอร์ซัลเฟตเจือปนอยู่ลงไป 30.0 มิลลิลิตร

4. เขย่าสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันดี นำขวดต่อเข้ากับเครื่องควบแน่น กลั่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ล้างเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่นก่อนที่จะถอดเครื่องควบแน่นออกจากขวดก้นกลม

5. เติมน้ำกลั่นลงในขวดก้นกลมจนปริมาตรประมาณ 140-150 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ไตเตรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เหลือด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้เฟอโรอินดิเคเตอร์ (2-3 หยด) จนกระทั่งสีของส่วนผสมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง แสดงว่าถึงจุดยุติ

7. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างและดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทุกประการ

คำนวณ

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

เมื่อ A = มิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้กับ blank

B = มิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้กับตัวอย่างน้ำ

C = โมลาริตีของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ค-1 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้โดยเชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ต่างๆ ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (%)				
	Aspergillus niger TISTR 3089	*Aspergillus niger* TISTR 3106	*Aspergillus niger* TISTR 3245	*Aspergillus niger* TISTR 3349	*Aspergillus niger* TISTR 3350
0	0.0120i	0.0090i	0.0099j	0.0090j	0.0120l
3	0.1020g	0.0890g	0.0585h	0.0150h	0.0750g
6	0.1170dg	0.1455dg	0.0660fh	0.0240fh	0.1740dg
9	0.2070ad	0.2025ad	0.0930bf	0.0300bf	0.1965ad
12	0.2700a	0.2100a	0.1320b	0.0390b	0.1950a

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ค-2 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้โดยเชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ต่างๆ ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง				
	Aspergillus niger TISTR 3089	*Aspergillus niger* TISTR 3106	*Aspergillus niger* TISTR 3245	*Aspergillus niger* TISTR 3349	*Aspergillus niger* TISTR 3350
0	5.165o	5.040o	5.165np	5.390n	5.285op
3	2.620l	2.875l	3.095km	3.480k	2.960lm
6	1.850if	1.745if	2.390dhj	3.745dh	1.890gij
9	1.685fb	1.635fb	2.335dga	2.050da	1.705fgc
12	1.470b	1.565b	2.295ac	2.005a	1.575cb

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-3 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ต่างๆ เก็บตัวอย่างของวันที่ 12 มาทำการวิเคราะห์ โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)				
	Aspergillus niger TISTR 3089	*Aspergillus niger* TISTR 3106	*Aspergillus niger* TISTR 3245	*Aspergillus niger* TISTR 3349	*Aspergillus niger* TISTR 3350
12	0.5320a	0.3405ab	0.0740b	0.0220b	0.1750b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ค-4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดยเชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ต่างๆ ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม)				
	Aspergillus niger TISTR 3089	*Aspergillus niger* TISTR 3106	*Aspergillus niger* TISTR 3245	*Aspergillus niger* TISTR 3349	*Aspergillus niger* TISTR 3350
0	0.000341d	0.000456ab	0.000391bc	0.000362abc	0.000365ad
3	0.000324hd	0.000359aef	0.000346bfg	0.000337cefg	0.000341deh
6	0.000285hl	0.000288eij	0.000336fjk	0.000327gijk	0.000317ihl
9	0.000198p	0.000246mn	0.000296no	0.000321mno	0.000233mp
12	0.000144t	0.000201qr	0.000283rs	0.000261qrs	0.000148qt

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (%)				
	เมทานอล ร้อยละ 1	เมทานอล ร้อยละ 2	เมทานอล ร้อยละ 3	เมทานอล ร้อยละ 4	ไม่เติม เมทานอล
0	0.1280gh	0.0960gh	0.1280gh	0.0640g	0.1280h
3	0.5440ef	0.3840ef	0.4480ef	0.4800e	0.3840f
6	0.7040cd	0.7360cd	0.7680cd	0.7680c	0.5440d
9	0.8000cd	0.7680cd	0.7680cd	0.8960c	0.7040d
12	1.1200ab	1.1520ab	1.1840ab	1.6000a	0.6720b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ง-2 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (%)				
	เมทานอล ร้อยละ 1	เมทานอล ร้อยละ 2	เมทานอล ร้อยละ 3	เมทานอล ร้อยละ 4	ไม่เติม เมทานอล
0	0.1280h	0.0960gh	0.0960g	0.1280g	0.0640h
3	0.1280f	0.1600ef	0.1280e	0.1600e	0.1280f
6	0.1280d	0.3520cd	0.4800c	0.5440c	0.1920d
9	0.1920d	0.3520cd	0.5760c	0.6720c	0.2240d
12	0.3840b	0.6720ab	0.8640a	0.9600a	0.3520b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ง-3 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง				
	เมทานอล ร้อยละ 1	เมทานอล ร้อยละ 2	เมทานอล ร้อยละ 3	เมทานอล ร้อยละ 4	ไม่เติม เมทานอล
0	6.23b	6.64a	6.34b	6.55b	6.72a
3	5.58d	5.91c	5.53d	5.68d	5.84c
6	3.6f	5.60e	4.37f	4.98f	5.66e
9	3.37h	4.06g	2.59h	2.55h	4.15g
12	2.55h	3.43g	1.96h	1.73h	3.87g

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ง-4 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง				
	เมทานอล ร้อยละ 1	เมทานอล ร้อยละ 2	เมทานอล ร้อยละ 3	เมทานอล ร้อยละ 4	ไม่เติม เมทานอล
0	6.48ab	6.29ab	6.27bc	6.13bc	6.66a
3	5.34ab	5.36ab	5.48bc	5.37bc	6.42a
6	2.46de	5.32de	2.90ef	2.29ef	5.58d
9	2.42gh	2.16gh	1.83hi	1.76hi	2.38g
12	1.69gh	1.61gh	1.59hi	1.53hi	1.76g

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ง-5 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)				
	เมทานอล ร้อยละ 1	เมทานอล ร้อยละ 2	เมทานอล ร้อยละ 3	เมทานอล ร้อยละ 4	ไม่เติม เมทานอล
0	0.0138lmo	0.0090ln	0.0109kmn	0.0068mj	0.0128nk
3	0.0180gjl	0.0244hkl	0.0301gjk	0.0351gj	0.0147hk
6	0.0500fgi	0.0287fhi	0.0335egh	0.0495dg	0.0189eh
9	0.0707df	0.0346ef	0.0410de	0.0578d	0.0197e
12	0.1001ac	0.0845bc	0.1133ab	0.1566a	0.0693b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ง-6 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)				
	เมทานอล ร้อยละ 1	เมทานอล ร้อยละ 2	เมทานอล ร้อยละ 3	เมทานอล ร้อยละ 4	ไม่เติม เมทานอล
0	0.0125h	0.0083h	0.0065h	0.0096g	0.0082h
3	0.0287h	0.0297h	0.0087h	0.0481g	0.0573h
6	0.0687df	0.0857df	0.0936df	0.0972ce	0.0663df
9	0.0698bd	0.0917bd	0.0943bd	0.2134ac	0.0707bd
12	0.1053b	0.1212b	0.1516b	0.2324a	0.0784b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ง-7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม)				
	เมทานอล ร้อยละ 1	เมทานอล ร้อยละ 2	เมทานอล ร้อยละ 3	เมทานอล ร้อยละ 4	ไม่เติม เมทานอล
0	0.000442a	0.000485b	0.000416a	0.000547a	0.000519b
3	0.000291c	0.000430d	0.000329c	0.000354c	0.000444d
6	0.000249e	0.000283f	0.000248e	0.000172e	0.000359f
9	0.000244eg	0.000281fh	0.000132eg	0.000115eg	0.000320fh
12	0.000131gi	0.000235hj	0.000119gi	0.000113gi	0.000284hj

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ง-8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้นเมทานอลเริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม)				
	เมทานอล ร้อยละ 1	เมทานอล ร้อยละ 2	เมทานอล ร้อยละ 3	เมทานอล ร้อยละ 4	ไม่เติม เมทานอล
0	0.000442a	0.000391c	0.000498ac	0.000398b	0.000505a
3	0.000373d	0.000292f	0.000448df	0.000295e	0.000390d
6	0.000295g	0.000274i	0.000288gi	0.000116h	0.000366g
9	0.000256j	0.000157l	0.000139jl	0.000085k	0.000293j
12	0.000202j	0.000140l	0.000137jl	0.000032k	0.000169j

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ จ-1 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (%)					
	$FeSO_4.7H_2O$ 50 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 75 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 125 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 150 mg/l	ไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$
0	0.0960g	0.1120gh	0.1120h	0.0960h	0.1470gh	0.1280h
3	0.8960e	0.8000ef	0.6720f	0.8320f	0.8800ef	0.6720f
6	1.1520c	1.2160cd	1.0240d	1.0240d	1.0560cd	0.9600d
9	1.6640a	1.3120ab	1.4080b	1.3760b	1.4400ab	1.3120b
12	2.3040a	1.4400ab	1.5040b	1.4720b	1.5040ab	1.4080b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ จ-2 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (%)					
	$FeSO_4.7H_2O$ 50 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 75 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 125 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 150 mg/l	ไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$
0	0.1120i	0.1120i	0.0800ij	0.1120ij	0.1120i	0.1120j
3	0.9600g	0.8640g	0.9920gh	0.7680gh	0.9820g	0.7360h
6	1.2480e	1.1840e	1.3120ef	1.3440ef	1.2480e	1.0880f
9	1.5680c	1.5360c	1.3760cd	1.4080cd	1.5680c	1.5040d
12	2.0160a	2.0160a	1.7280ab	1.8240ac	1.7920a	1.5680b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-3 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง					
	$FeSO_4.7H_2O$ 50 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 75 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 125 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 150 mg/l	ไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$
0	5.40ab	5.24ab	5.30ab	5.49ab	5.09ab	5.23ab
3	2.05ab	2.16ab	2.22ab	2.14ab	2.10ab	2.33ab
6	1.94ab	2.14ab	2.01ab	2.02ab	1.95ab	2.12ab
9	1.93ab	2.12ab	1.98ab	2.01ab	1.94ab	2.12ab
12	1.90ab	2.02ab	1.92ab	2.01ab	1.93ab	2.12ab

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ จ-4 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง					
	$FeSO_4.7H_2O$ 50 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 75 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 125 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 150 mg/l	ไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$
0	5.19b	5.02b	4.98b	4.99b	5.14b	5.25a
3	2.01b	2.12b	1.89b	2.19b	2.03b	2.25a
6	1.77d	1.83d	1.85d	1.89d	1.82d	2.10c
9	1.71df	1.78df	1.80df	1.88df	1.77df	1.87ce
12	1.65f	1.68f	1.78f	1.69f	1.74f	1.81ec

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-5 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)					
	$FeSO_4.7H_2O$ 50 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 75 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 125 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 150 mg/l	ไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$
0	0.0065c	0.0132c	0.0114c	0.0102c	0.0156c	0.0148c
3	0.0352bc	0.0237bc	0.0219bc	0.0243bc	0.0295bc	0.0219bc
6	0.0380bc	0.0377bc	0.0248bc	0.0294bc	0.0308bc	0.0244bc
9	0.0560b	0.1335b	0.0412b	0.0387b	0.0539b	0.0372b
12	0.2869a	0.1693a	0.2719a	0.1810a	0.2008a	0.1441a

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ จ-6 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)					
	$FeSO_4.7H_2O$ 50 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 75 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 125 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 150 mg/l	ไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$
0	0.0136hj	0.0129kmj	0.0084kmj	0.0116kmj	0.0119kmj	0.0126mi
3	0.0273eh	0.0237khi	0.0309khi	0.0231khi	0.0245khi	0.0225gi
6	0.0385ec	0.0275efgk	0.0354efgk	0.0398efgk	0.0355efgk	0.0243dg
9	0.0663c	0.0481fcd	0.0389fcd	0.0426fcd	0.0487fcd	0.0437d
12	0.2636a	0.2474ab	0.2194ab	0.2262ab	0.2213ab	0.1446b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม)					
	$FeSO_4.7H_2O$ 50 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 75 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 125 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 150 mg/l	ไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$
0	0.000242b	0.000504bc	0.000614ac	0.000623ac	0.000227b	0.000741a
3	0.000208e	0.000399ef	0.000330df	0.000479df	0.000222e	0.000522d
6	0.000178h	0.000124hi	0.000314gi	0.000296gi	0.000180h	0.000300g
9	0.000075k	0.000104kl	0.000093jl	0.000101jl	0.000094k	0.000156j
12	0.000059k	0.000093kl	0.000078jl	0.000081jl	0.000092k	0.000126j

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ จ-8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Fe^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม)					
	$FeSO_4.7H_2O$ 50 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 75 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 125 mg/l	$FeSO_4.7H_2O$ 150 mg/l	ไม่เติม $FeSO_4.7H_2O$
0	0.000441b	0.000647abc	0.000475ab	0.000716c	0.000542abc	0.000739ac
3	0.000240f	0.000250dfg	0.000248df	0.000461g	0.000254dfg	0.000278dg
6	0.000210l	0.000213hij	0.000185hi	0.000181j	0.000190hij	0.000275hj
9	0.000052l	0.000065klm	0.000081kl	0.000084m	0.000059klm	0.000075km
12	0.000029l	0.000054klm	0.000060kl	0.000057m	0.000057klm	0.000068km

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-9 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (%)					
	$CuSO_4.5H_2O$ 6 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 12 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 18 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 24 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 30 mg/l	ไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$
0	0.0800kl	0.1120kl	0.1120jk	0.0800j	0.0800k	0.0800l
3	0.6400hi	0.6720hi	0.7040gh	0.7360g	0.6720h	0.5440i
6	0.7040ef	0.7360ef	0.7040de	0.7680d	0.7680e	0.6720f
9	1.1520bc	1.0560bc	1.2160ab	1.2800a	1.2160b	1.0560c
12	1.1580bc	1.1840bc	1.2480ab	1.4080a	1.1840b	1.0880c

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ จ-10 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (%)					
	$CuSO_4.5H_2O$ 6 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 12 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 18 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 24 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 30 mg/l	ไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$
0	0.0960jl	0.1600kl	0.0960jl	0.1120jl	0.0800jl	0.0960k
3	0.5760gi	0.2560hi	0.6080gi	0.4000gi	0.4800gi	0.2560h
6	0.8640df	0.6720ef	0.8640df	0.7840df	0.8160df	0.6720e
9	1.3440ac	1.1200bc	1.1520ac	1.1840ac	1.1520ac	0.7680b
12	1.0880ac	1.2160bc	1.2480ac	1.3760ac	1.2800ac	1.0240b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-11 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง					
	$CuSO_4.5H_2O$ 6 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 12 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 18 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 24 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 30 mg/l	ไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$
0	5.39ac	5.32bc	5.32bc	5.36b	5.33bc	5.44a
3	2.27df	2.28ef	2.29ef	2.22e	2.25ef	2.32d
6	2.31df	2.21ef	2.17ef	2.16e	2.23ef	2.27d
9	1.65gi	1.67hi	1.64hi	1.57h	1.63hi	1.67g
12	1.61jl	1.58kl	1.57kl	1.45k	1.58kl	1.63j

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ จ-12 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง					
	$CuSO_4.5H_2O$ 6 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 12 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 18 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 24 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 30 mg/l	ไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$
0	5.47ac	5.41bcd	5.44a	5.42ad	5.48ad	5.47b
3	2.86eg	3.09fgh	2.67e	3.08eh	2.89eh	3.20f
6	2.43ik	2.56jkl	2.22l	2.53il	2.47il	2.78j
9	1.68mo	1.78nop	1.73m	1.71mp	1.77mp	1.83n
12	1.66qs	1.65rst	1.57q	1.54qt	1.54qt	1.67r

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-13 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)					
	$CuSO_4.5H_2O$ 6 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 12 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 18 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 24 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 30 mg/l	ไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$
0	0.0074no	0.0097no	0.0083nop	0.0077mp	0.0082mo	0.0072n
3	0.0131no	0.0163no	0.0176nop	0.0186mp	0.0179mo	0.0150n
6	0.0273jk	0.0280jk	0.0364jkl	0.0436il	0.0412ik	0.0257j
9	0.0660fg	0.0732fg	0.0583fgh	0.0816eh	0.0755eq	0.0525f
12	0.1295bc	0.1305bc	0.1607bcd	0.1849ad	0.1494ac	0.1138b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ จ-14 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)					
	$CuSO_4.5H_2O$ 6 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 12 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 18 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 24 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 30 mg/l	ไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$
0	0.0075hi	0.0101hi	0.0088gi	0.0093gi	0.0070hi	0.0077h
3	0.0345ef	0.0234ef	0.0353df	0.0247df	0.0247ef	0.0223e
6	0.0364ef	0.0308ef	0.0353df	0.0340df	0.0328ef	0.0260e
9	0.0466ef	0.0336ef	0.0361df	0.0370df	0.0357ef	0.0328e
12	0.1175bc	0.1286bc	0.1411ac	0.1557ac	0.1461bc	0.1113b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม)					
	$CuSO_4.5H_2O$ 6 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 12 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 18 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 24 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 30 mg/l	ไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$
0	0.000335ac	0.000296c	0.000329c	0.000331b	0.000329bc	0.000349a
3	0.000267df	0.000256f	0.000236f	0.000142e	0.000228ef	0.000306d
6	0.000195gi	0.000185l	0.000193l	0.000091h	0.000137hi	0.000245g
9	0.000098jl	0.000104l	0.000087l	0.000071k	0.000092kl	0.000119j
12	0.000089jl	0.000086l	0.000074l	0.000070k	0.000080kl	0.000108j

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ จ-16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Cu^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม)					
	$CuSO_4.5H_2O$ 6 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 12 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 18 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 24 mg/l	$CuSO_4.5H_2O$ 30 mg/l	ไม่เติม $CuSO_4.5H_2O$
0	0.000299b	0.000277b	0.000284b	0.000280b	0.000322b	0.000335b
3	0.000192d	0.000245d	0.000185d	0.000210d	0.000204d	0.000303d
6	0.000089f	0.000127f	0.000082f	0.000120f	0.000101f	0.000280f
9	0.000075h	0.000087h	0.000056h	0.000067h	0.000093h	0.000103h
12	0.000070h	0.000075h	0.000051h	0.000045h	0.000047h	0.000081h

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-17 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (%)					
	$ZnSO_4.7H_2O$ 20 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 40 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 60 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 80 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	ไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$
0	0.0640klm	0.0960klm	0.9600m	0.0960klm	0.0960klm	0.0960l
3	0.6400hij	0.6400hij	0.6720j	0.6590hij	0.6400hij	0.5440l
6	0.9280hij	0.9600hij	1.0240j	0.8640hij	1.0240hij	0.2240l
9	1.1840dfg	1.2800dfg	1.2480g	1.1840dfg	1.2800dfg	1.1520f
12	1.6320abc	1.6640abc	1.5360c	1.5040abc	1.4400abc	1.5360b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ จ-18 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (%)					
	$ZnSO_4.7H_2O$ 20 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 40 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 60 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 80 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	ไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$
0	0.1120klm	0.1150klm	0.0640m	0.1120klm	0.1280klm	0.0640l
3	0.7040hij	0.6400hij	0.7680j	0.8640hij	0.6720hij	0.7040l
6	0.9920hij	0.9600hij	1.0880j	1.0880hij	1.0560hij	0.7330l
9	1.1200dfg	1.2160dfg	1.1840g	1.2160dfg	1.2480dfg	0.7520f
12	1.5040abc	1.5360abc	1.4400c	1.5040abc	1.4400abc	1.4720b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-19 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง					
	$ZnSO_4.7H_2O$ 20 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 40 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 60 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 80 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	ไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$
0	6.05a	5.97b	5.64b	5.82ac	5.81bc	6.04a
3	3.13d	2.77e	2.74e	2.96df	3.02ef	3.20d
6	2.32g	1.94h	1.86h	2.39gi	2.05hi	2.43g
9	1.74j	1.49k	1.54k	1.72jl	1.47kl	1.75j
12	1.37m	1.36n	1.38n	1.43mo	1.46mo	1.39m

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ จ-20 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง					
	$ZnSO_4.7H_2O$ 20 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 40 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 60 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 80 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	ไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$
0	5.51ab	5.47ab	5.61b	5.54b	5.45b	5.94a
3	2.77cd	2.81cd	2.69d	2.56d	2.78d	2.77c
6	1.96fg	2.06fg	1.78g	1.80g	1.84g	2.09f
9	1.65hi	1.59hi	1.61l	1.57l	1.56l	1.65h
12	1.45kl	1.40kl	1.53l	1.45l	1.53l	1.46k

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-21 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)					
	$ZnSO_4.7H_2O$ 20 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 40 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 60 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 80 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	ไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$
0	0.0014ac	0.0048ab	0.0106a	0.0101a	0.0058a	0.0123a
3	0.0172a	0.0277ab	0.0191a	0.0168a	0.0227a	0.0128a
6	0.0588c	0.0644abc	0.0689c	0.0619c	0.0697c	0.0348c
9	0.0625d	0.1119abd	0.0812d	0.1045d	0.0945d	0.0665d
12	0.1346f	0.1461abf	0.1120f	0.1091f	0.1014f	0.1045f

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ จ-22 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)					
	$ZnSO_4.7H_2O$ 20 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 40 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 60 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 80 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	ไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$
0	0.0108ad	0.0115ad	0.0101ad	0.0112ad	0.0147ad	0.0101ad
3	0.0228ad	0.0351ad	0.0212ad	0.0293ad	0.0464ad	0.0182ad
6	0.0846ad	0.0649ad	0.1034ad	0.1043ad	0.0768ad	0.0709ad
9	0.0999ad	0.0837ad	0.1095ad	0.1058ad	0.0927ad	0.0988ad
12	0.1385ad	0.1658ad	0.1131ad	0.1459ad	0.0972ad	0.1266ad

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-23 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม)					
	$ZnSO_4.7H_2O$ 20 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 40 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 60 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 80 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	ไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$
0	0.000375c	0.000192a	0.000193ad	0.000198abcd	0.000201abcd	0.000219bcd
3	0.000169g	0.000168e	0.000155eh	0.000173efgh	0.000164efgh	0.000211fgh
6	0.000145g	0.000095ei	0.000099eh	0.000164efgh	0.000153efgh	0.000171fghi
9	0.000103k	0.000073l	0.000085il	0.000128ijklp	0.000090ijklp	0.000121fghi
12	0.000081o	0.000057m	0.000082mp	0.000092mnop	0.000076mnop	0.000111nop

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ จ-24 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดย *Aspergillus niger* TISTR 3106 ที่ความเข้มข้น Zn^{2+} เริ่มต้นต่างกัน ใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม)					
	$ZnSO_4.7H_2O$ 20 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 40 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 60 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 80 mg/l	$ZnSO_4.7H_2O$ 100 mg/l	ไม่เติม $ZnSO_4.7H_2O$
0	0.000258abc	0.000253abc	0.000337abc	0.000277abc	0.000211a	0.000389b
3	0.000147 def	0.000179def	0.000139def	0.000126def	0.000171d	0.000150e
6	0.000109ghi	0.000109ghi	0.000107ghi	0.000083ghi	0.000098g	0.000126h
9	0.000085ijk	0.000068ijk	0.000083ijk	0.000077ijk	0.000076jg	0.000089kh
12	0.000060lmno	0.000057lmno	0.000079lmno	0.000067lmno	0.000061mj	0.000069nk

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้