สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3089

นางสาวปริมประภา คณารักษ์
นางสาวสุปรีชา ฉัตรทอง

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2542

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 35867
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2543

บทคัดย่อและเนื้อหาวิทยานิพนธ์นี้ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Optimum Condition for Production of Citric Acid from Cocoa Pulp Extract by *Aspergillus niger* TISTR 3089

Miss Primprapha Kanaraks

Miss Supreecha Chattong

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

1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงงานพิเศษ	สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ โดยเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3089
นักศึกษา	นางสาวปริมประภา คณารักษ์
	นางสาวสุปรีชา ฉัตรทอง
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล
	อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

กรรมการสอบโครงงานพิเศษ

(รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์) ประธานกรรมการ

(ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล) กรรมการ

(อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3089

นักศึกษา นางสาวปริมประภา คณารักษ์
นางสาวสุปรีชา ฉัตรทอง
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล
อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา 2542

บทคัดย่อ

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3089 พบว่าน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 25 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 9 คือ ร้อยละ 1.7088 การไม่เติมแหล่งไนโตรเจนจะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงกว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร โดยจะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดร้อยละ 1.8366, 1.5804, 1.7280 และ 1.600 ตามลำดับ ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณกรดซิตริก โดยให้ปริมาณกรดซิตริกร้อยละ 1.7920 ในวันที่ 9 และไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ความเร็วรอบ 100 และ 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Optimum Condition for Production of Citric Acid from Cocoa Pulp Extract by *Aspergillus niger* TISTR 3089
Name	Miss Primprapha Kanaraks
	Miss Supreecha Chattong
Special Project Advisors	Assit. Prof. Duangjai Ochaikul
	Miss Kulwadee Tongpubesra
Department	Applied Biology
Academic year	1999

Abstract

Optimum condition for citric acid production by *Aspergillus niger* TISTR 3089 using cocoa pulp extract as a substrate was studied. The result showed that 25% of cocoa pulp extract at initial pH 7.0 and incubation temperature of 30 ° C was optimum for citric acid production which gave the highest yield of 1.7088% citric acid on day 9. The medium without the addition of nitrogen source gave higher yield of citric acid than the medium with the addition of 1.5 g/l ammoniumsulphate, 0.5 g/l ammoniumchloride and 1.0 g/l yeast extract with the maximum yield of 1.8266%, 1.5804%, 1.7280% and 1.600% respectively. When three different shaking speeds were compared, it was found that the highest yield of citric acid was at 300 rpm (1.7920%). However, there was no significant different from 100 and 200 rpm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตและสามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี นั้นคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล และอาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์สิทธิชัย เจริญเศรษฐศิลป์ ที่ให้คู่มือและคำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ทางสถิติ

ขอกราบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษตลอดมา และขอบคุณเพื่อน ๆ และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษให้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
2. ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	3
1. โกโก้	3
2. คุณสมบัติของกรดซิตริก	4
3. ชีวเคมีในการผลิตกรดซิตริก	7
4. การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม	9
5. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก	16
6. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก	19
7. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก	22
8. การใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม	32
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	35
1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต	35
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ	35
3. เครื่องมือและอุปกรณ์	35
4. วิธีการทดลอง	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย 38

1. ผลการศึกษาและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ 38
2. การศึกษาความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3089 39
3. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3089 41
4. การศึกษาความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3089 45

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 46

1.สรุปผลการทดลอง 46

2. ข้อเสนอแนะ 47

เอกสารอ้างอิง 48

ภาคผนวก 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	3
2-2 แสดงความสามารถในการละลายน้ำของกรดซิตริก	5
2-3 แสดงคุณลักษณะทางเคมีของกรดซิตริก	6
2-4 การผลิตกรดซิตริกโดย *Candida lipolytica* จากวัตถุดิบต่าง ๆ	17
2-5 องค์ประกอบของกากน้ำตาล	24
2-6 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger*	29
4-1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2-1. โครงสร้างทางเคมีของกรดซิตริก	4
2-2. แนวทางในการผลิตกรดซิตริกผ่านทางไตรคาร์บอกซิลิกไซเคิล	7
2-3. แผนภูมิแสดงการผลิตกรดซิตริกโดยวิธี surface culture	11
2-4. ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก	15
4-1. ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่างกันที่ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที	40
4-2. ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่างกันที่ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที	40
4-3. ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่างกันที่ความ เข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0	42
4-4. ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่างกันที่ความ เข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0	43
4-5. ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัด ต่างกันที่ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0	44
4-6. ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า ต่างกันที่ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

กรดซิตริก (citric acid) หรือกรดมะนาว เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในธรรมชาติมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผลไม้ประเภทส้ม สับปะรด ลูกพีช และผลไม้อื่น ๆ กรดซิตริกจะใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นตัวปรับความเป็นกรด-ด่าง ใช้เพิ่มรสเปรี้ยวในเครื่องดื่ม น้ำผลไม้ ผลไม้กระป๋อง และไวน์ เนื่องจากเป็นสารที่ละลายในน้ำได้ดี และสามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์มีรสเปรี้ยว มีกลิ่นหอม ความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายได้ง่าย ราคาถูกและหาได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดซิตริกในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ อุตสาหกรรมอาหารและยา และอุตสาหกรรมอื่น ๆ อีกด้วย แต่การสังเคราะห์กรดซิตริกโดยวิธีทางเคมีมีข้อเสียหลายอย่าง คือ วัตถุดิบมีราคาแพงหรือวัตถุดิบที่ใช้เป็นอันตราย จึงมีผู้ศึกษาการผลิตกรดซิตริกโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดผลิตกรดซิตริกได้ เช่น เชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ส่วนใหญ่นิยมใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ในการผลิตกรดซิตริก จากอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ ซึ่งเชื้อนี้สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณสูง (Qazi *et al.*,1990) โดยสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดซิตริกได้ร้อยละ 90 (Rohr and Kubicek , 1981; Panda *et al.*, 1984) ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเชื้อยีสต์ พบว่าสามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณสูงเช่นเดียวกัน เช่น *Candida tropicalis* , *Saccharomyces cerevisiae* , *Endomycopsis sp.* โดยใช้วัตถุดิบชนิดต่างๆ เช่น กลูโคส (glucose) อะซิเตต (acetate) แอลกอฮอล์ (alcohol) ไฮโดรคาร์บอน (hydorcarbon) โมลาส (molass) และน้ำมัน (oil) แบคทีเรียบางชนิดมีส่วนช่วยในการผลิตกรดซิตริก เช่น *Bacillus subtilis*

โกโก้เป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกมากในจังหวัดแถบภาคใต้ จากการศึกษาพบว่า น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบร้อยละ 10-15 จึงสามารถนำน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มาเป็นวัตถุดิบเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดซิตริกได้ ซึ่งการใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มาผลิตกรดซิตริกนั้นถือว่า เป็นการนำเอาวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกทางหนึ่ง

1. วัตถุประสงค์ของโครงงาน

1.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ของแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แขวนลอย ของแข็งทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคส ปริมาณกรดซิตริกเริ่มต้น รวมทั้งแร่ธาตุบางชนิด (ทองแดง แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม แมงกานีส และสังกะสี)

1.2 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก

1.3 นำผลจากการศึกษานี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2. ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3089

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 สามารถผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้

3.2 เป็นการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์

3.3 เป็นแนวทางสำหรับงานวิจัยเพื่อพัฒนาการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

3.4 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) ในกระบวนการหมักเมล็ดโกโก้ส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นส่วนสำคัญในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์ต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ และกรดแอซิติก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารเหล่านี้มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ ระหว่างการหมักมีการสูญเสียเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ประมาณร้อยละ 5-7 โดยสลายกลายเป็นของเหลวออกไปจากกองหมัก

เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10-15 เพคตินร้อยละ 1 และกรดซิตริกร้อยละ 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. คุณสมบัติของกรดซิตริก

กรดซิตริกหรืออาจเรียกว่ากรดมะนาว (รูปที่ 2-1) เป็นกรดไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid) ชนิดหนึ่ง ซึ่งพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1784 โดย Scheele ตกผลึกออกจากน้ำมะนาว กรดซิตริกนี้นอกจากจะพบในมะนาวแล้วยังพบในผลไม้อีกหลายชนิด กรดซิตริกที่ได้จากผลไม้เหล่านี้จึงเรียกว่า "กรดซิตริกธรรมชาติ" (natural citric acid) นอกจากนี้กรดซิตริกยังสามารถผลิตได้โดยอาศัยการหมักด้วยเชื้อรา (fungal fermentation) ดังที่ Wehmer (1893) พบว่ากรดซิตริกนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อราสายพันธุ์ *Penicillium sp.* และ *Mucor sp.* ในปัจจุบันการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม จึงอาศัยหมักด้วยเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ ถึงแม้ว่าวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อผลิตกรดซิตริก จะมีแนวโน้มที่เป็นไปได้ก็ตาม แต่ให้ผลที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจต่ำกว่าที่ได้รับจากการหมัก (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

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

กรดซิตริกมีลักษณะเป็นผลึกขุ่นมัวหรือสีขาว มีลักษณะเป็นผงคล้ายแป้ง มีรสเปรี้ยวมีกลิ่นหอม มีความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายได้ง่าย คุณสมบัติสำคัญของกรดซิตริกมีดังนี้ คือ สูตรเคมี $C_6H_8O_7$ น้ำหนักโมเลกุล 192.13 ความถ่วงจำเพาะ 1.665 จุดหลอมเหลว 153 องศาเซลเซียส พีเอช ในสารละลาย 0.1 นอร์มัล เท่ากับ 2.2 การละลายในน้ำที่ 25 องศาเซลเซียส 162 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร (อาภรณ์, 2529)

เนื่องจากกรดซิตริกเป็นสารที่มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอมย่อยสลายได้ง่าย มีความเป็นพิษต่ำและกำจัดได้ง่าย ละลายได้ดีโดยขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ (ตารางที่ 2-2) จึงมีการใช้กรดซิตริก เกลือ และเอสเทอร์ของกรดนี้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-3 แสดงคุณลักษณะทางเคมีของกรดซิตริก

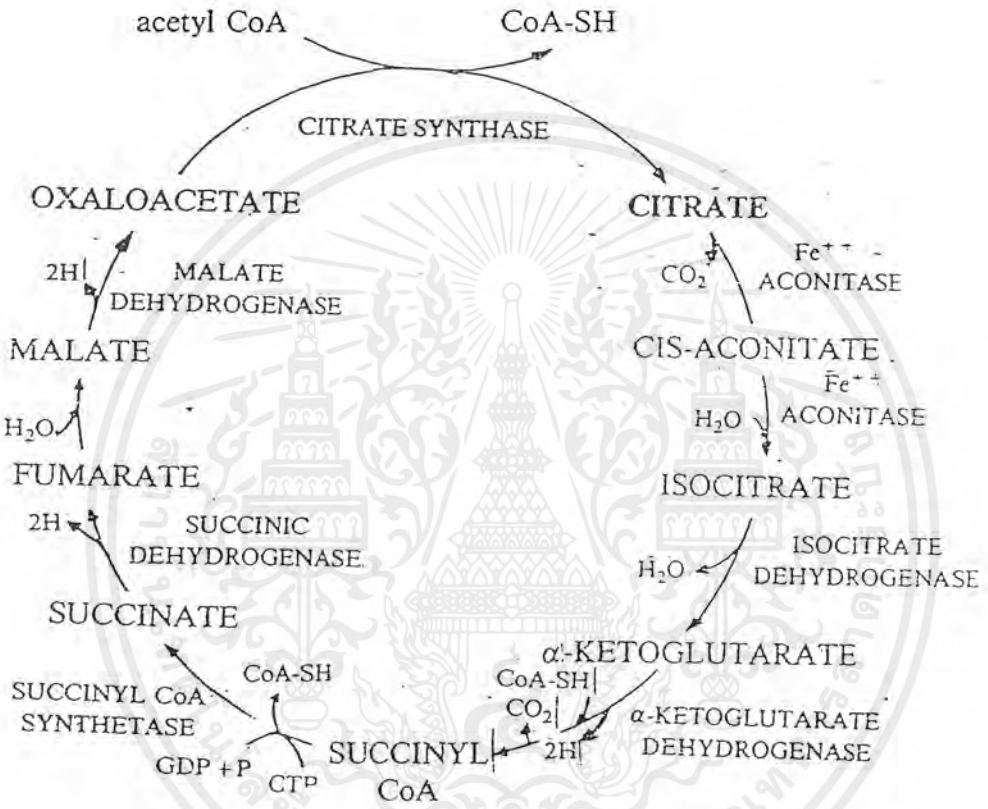
รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด	
		กรดซิตริก โมโนไฮเดรต	กรดซิตริก แอนไฮดรัส
1	ความบริสุทธิ์ $C_6H_8O_7$ คำนวณในสภาพแห้งร้อยละ	99.5 ถึง 101.0	99.5 ถึง 101.0
2	น้ำ ร้อยละ	7.5 ถึง 8.8	ไม่เกิน 0.5
3	กากที่เหลือจากการเผา ร้อยละ ไม่เกิน	0.05	0.05
4	ออกซาเลต	สารละลายต้องไม่ขุ่น	สารละลายต้องไม่ขุ่น
5	ซัลเฟต	สารละลายต้องไม่ขุ่น	สารละลายต้องไม่ขุ่น
6	สารหนู มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมไม่เกิน	3	3
7	โลหะหนัก ยกเว้นเหล็ก (เทียบเป็นตะกั่ว) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมไม่เกิน	10	10
8	แบเรียม	สารละลายต้องไม่ขุ่น	สารละลายต้องไม่ขุ่น
9	แคลเซียม มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมไม่เกิน	200	200
10	เหล็ก มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมไม่เกิน	50	50
11	คลอไรด์ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมไม่เกิน	50	50
12	สารที่สลายให้คาร์บอนได้ง่าย (readily carbonizable substance)	สีต้องไม่เข้มกว่าสีของสารละลายสีมาตรฐาน	สีต้องไม่เข้มกว่าสีของสารละลายมาตรฐาน

ที่มา : มอก. (2526)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. <u>ชีวเคมีในการผลิตกรดซิตริก</u>

กรดซิตริกเป็นสารที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายปฐมภูมิ (primary metabolite) ของกระบวนการ TCA cycle (Tricarboxylic acid cycle) หรือ Kreb's cycle โดยปฏิกิริยาการรวมกันระหว่าง acetyl CoA และ oxaloacetate ดังรูปที่ 2-2



รูปที่ 2-2 แนวทางในการผลิตกรดซิตริกผ่านทาง Tricarboxylic acid cycle

ที่มา : วราวุฒิ และ รุ่งนภา (2532)

น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนจะถูกใช้โดยเชื้อราผ่านกระบวนการEmbden-Meyerhof Parnas(EMP) pathway ประมาณร้อยละ 80 และอีกร้อยละ 20 จะผ่านกระบวนการ pentose phosphate cycle โดยเอนไซม์ใน EMP pathway จะมีอยู่ตลอดกระบวนการหมัก ส่วนสาร oxaloacetate ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดซิตริก ถูกสร้างขึ้นมาโดยอาศัยแนวทางในการสร้างหลายรูปแบบดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. อาศัยปฏิกิริยา dehydrogenation (ดึงไฮโดรเจน) ของ malate โดยอาศัยเอนไซม์ malate dehydrogenase ดังสมการ

$$\text{malate} + NAD^+ \longrightarrow \text{oxaloacetate} + NADH + H^+$$

2. อาศัยปฏิกิริยา carboxylation (เติมกลุ่มคาร์บอกซิล) ของ pyruvate โดยอาศัยการรวมตัวของ pyruvate กับคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งถูกเร่งด้วยเอนไซม์ pyruvate carboxylase ดังสมการ

$$\text{pyruvate} + CO_2 + H_2O + ATP \longrightarrow \text{oxaloacetate} + ADP + Pi$$

3. อาศัยปฏิกิริยา carboxylation ของ phosphoenol pyruvate โดยอาศัย phosphoenol pyruvate carboxylase kinase system ซึ่งพบได้ในยีสต์ ทั้งนี้จะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวของ phosphoenol pyruvate กับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยไม่ต้องอาศัยพลังงานหรือ ATP ดังสมการ

$$\text{phosphoenol pyruvate} + ADP + CO_2 \longrightarrow \text{oxaloacetate} + ATP + Pi$$

4. อาศัย glyoxylate cycle โดยที่เกิดการรวมตัวของ glyoxylate กับ acetyl CoA ซึ่งถูกเร่งด้วยเอนไซม์ malate synthetase ดังสมการ ทั้งนี้ malate ที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น oxaloacetate อีกต่อหนึ่ง

$$\text{glyoxylate} + \text{acetyl CoA} \longrightarrow \text{malate} + \text{coenzyme A}$$

สำหรับ glyoxylate ที่ใช้นี้สามารถสังเคราะห์ได้ โดยอาศัยเอนไซม์ isocitritase ดังนี้

$$\text{isocitritase} \longrightarrow \text{succinate} + \text{glyoxylate}$$

อะซิทิล โค เอ (acetyl Co A) และออกซาโลอะซิเตด (oxaloacetate) รวมตัวเป็นกรดซิตริก โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ citrate synthase (condensing enzyme) ใน TCA cycle ประสิทธิภาพของเอนไซม์นี้จะเพิ่มมากขึ้นในระหว่างการผลิตกรดซิตริก การศึกษาผลของเอนไซม์ต่อการผลิตกรดซิตริกพบว่าการขาดหายไปของเอนไซม์ aconitate hydratase (aconitase) และ isocitrate dehydrogenase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการที่สลายกรดซิตริกในกระบวนการ TCA cycle ทำให้เกิดการสะสมของกรดซิตริก แต่จากการศึกษาในภายหลังพบว่าเอนไซม์ทั้งสองนี้ยังคงมีอยู่ในระหว่างการสังเคราะห์กรดซิตริกแต่มีประสิทธิภาพต่ำ นอกจากนี้คาดว่าการเติมไอออนของทองแดงหรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ได้ การเติมไอออนของแมกนีเซียมจะไปยับยั้งการทำงานของ condensing enzyme ในขณะที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ aconitate hydratase และ isocitrate dehydrogenase แทน ส่วนเหล็กและทองแดงมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ aconitate hydratase

โดยการทำงานของเอนไซม์นี้ต้องอาศัยเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ ส่วนทองแดงจะลดประสิทธิภาพของเหล็ก จึงขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ aconitate hydratase ได้ ดังนั้นการใส่ทองแดงลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปในวัตถุที่มีเหล็กก็จะมีผลต่อการสร้างกรดซิตริกซึ่งการเติมทองแดงลงไปในปริมาณสูงจะไปลดประสิทธิภาพของเหล็กทำให้มีการสังเคราะห์กรดซิตริกเพิ่มขึ้น

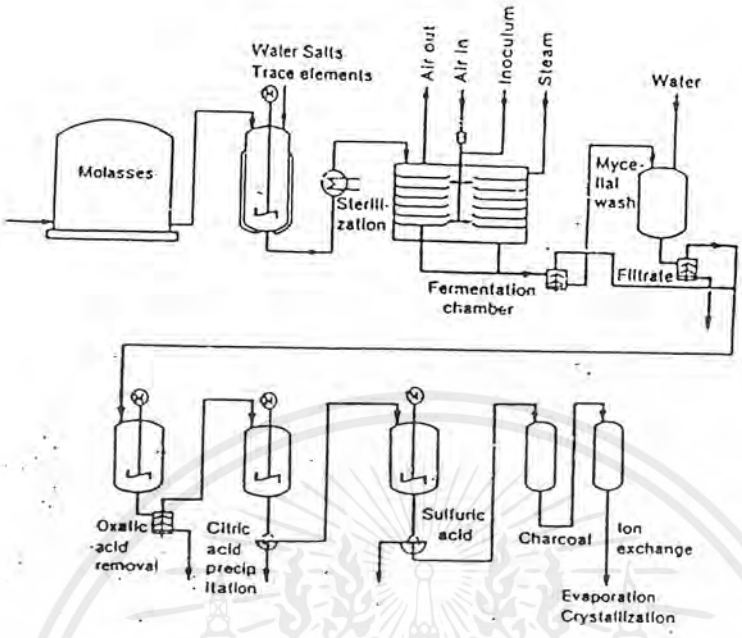
จากการศึกษาในอีกแง่หนึ่งคาดว่าการเกิดกรดออกซาลิกจะมีผลยับยั้ง TCA cycle ซึ่งกรดออกซาลิกเกิดได้จากการรวมตัวของออกซาโลอะซิเตต และไกลออกซิเลต (glyoxylate) ใน glyoxylate pathway แต่ในสภาวะที่มี $NADH+H^+$ สูงจะทำให้กรดออกซาลิกที่เกิดจากไกลออกซิเลตลดลง เป็นผลทำให้เกิดกรดซิตริกจากออกซาโลอะซิเตตและอะซิเตตได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าการผลิตกรดซิตริกจะถูกยับยั้งโดยแอมโมเนียมไอออนที่มีอยู่ภายในเซลล์ในปริมาณมาก และในทางทฤษฎีจะพบว่าการใช้น้ำตาลซูโครส 100 กรัม จะให้ผลผลิตของกรดซิตริก (โมโนไฮเดรต) 123 กรัม หรือกรดซิตริกในรูปปราศจากน้ำ (แอนไฮดรัส) 112 กรัมโดยน้ำตาลส่วนหนึ่งจะถูกใช้ไปในกระบวนการหายใจของเชื้อราได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และส่วนที่เหลือจะใช้ไปในกระบวนการผลิตกรดอินทรีย์ซิตริกผ่านทาง tricarboxylic acid cycle

4.<u>การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม</u> (อรพิน, 2526)

กรดซิตริกที่ผลิตเป็นการค้าในปัจจุบัน จะใช้กรรมวิธีการหมักเป็นส่วนใหญ่ และกรรมวิธีในการผลิตของแต่ละโรงงานจะถือเป็นความลับ ดังนั้นจึงมีรายละเอียดที่รายงานออกมาไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามจากรายงานสั้นๆ ที่ทางโรงงานได้จดลิขสิทธิ์ไว้ ทำให้ทราบเรื่องราวการผลิตกรดซิตริกบางส่วน กรรมวิธีการผลิตที่สำคัญมีอยู่ 3 วิธีด้วยกัน คือ

1. การผลิตกรดซิตริกแบบ Koji fermentation process (surface culture method) ขบวนการผลิตกรดซิตริกด้วยวิธี Koji นั้น ได้เริ่มทำกันในประเทศญี่ปุ่น โดยที่ได้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากพวกของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ใส่อาหารลงในถาดแล้วทำการฆ่าเชื้อในอาหาร ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ประมาณ 1 – 8.0 ซม. หลังจากอาหารเย็นลงจึงใส่สปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* ลงในถาดอาหาร ถาดอาหารเหล่านี้จะเก็บไว้บนชั้นในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ในขณะเดียวกันก็ให้อากาศส่วนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผ่านเข้าไปบนถาดเลี้ยงเชื้อ เชื้อราก็จะเจริญ ซึ่งจะเห็นเส้นใยของเชื้อรา ในระยะหลังกรรมวิธีการให้อากาศเข้าไปนั้น อาจจะเป่าค่อยๆ ตลอดเวลา หรืออาจจะให้อากาศเข้าไปเป็นระยะๆ ก็ได้ ตัวอย่างของวัตถุดิบที่จะนำมาใช้เลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริกเช่น พวกรำข้าวต่างๆ เศษเหลือของมันเทศ ในกรณีที่วัตถุดิบที่ใช้เป็นเศษเหลือของมันเทศ (sweet potato) หรือรำข้าวสาลี จะมีโลหะบางชนิดที่จะไปป้องกันการสะสมกรดซิตริกในขบวนการหมัก โลหะเหล่านี้ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส โคบอลท์ หรือนิเกิ้ล ดังนั้นจึงควรจะต้องคัดเลือกสายพันธุ์ *A. niger* ที่ทนต่อโลหะเหล่านี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2-3 แผนภูมิแสดงการผลิตกรดซิตริกโดย surface culture
ที่มา : ดุษณี (2537)

สำหรับหัวเชื้อที่ใช้นั้นโดยทั่วไปมักจะเตรียมโดยใช้ surface liquid medium เพื่อการเลี้ยงสปอร์ของเชื้อราโดยเฉพาะ จะทำการเลี้ยงโดยใช้เวลาประมาณ 9 วัน แล้วจึงถ่ายไปยังสารละลายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อทำการหมัก (steriie fermentation solution) แล้วทำสปอร์นั้นกระจายอยู่ในสารละลายดังกล่าว หลังจากนั้นจึงถ่าย inoculum medium ที่มีสปอร์ของเชื้อราอยู่กระจายนั้นไปยังถาดหมัก (fermentation pan.) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสำหรับการผลิตกรดซิตริก ในบางครั้งอาจจะไม่ต้องเตรียม inoculum medium แต่จะใช้วิธีเป่าให้สปอร์ของเชื้อราลงไปยังถาดหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกโดยตรงก็ได้

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดซิตริกด้วยวิธี surface liquid culture นั้นแหล่งคาร์บอนที่ใช้มักจะเป็นพวกการน้ำตาลจากอ้อยหรือจากหัวบีท แต่น้ำตาลบริสุทธิ์ ก็นำมาใช้ได้เช่นเดียวกัน การเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตกรดซิตริกที่จะให้ได้ปริมาณกรดซิตริกสูง ความเข้มข้นของน้ำตาลที่จะให้ผลิตผลของกรดซิตริกสูงนั้น ควรจะใช้น้ำตาลประมาณร้อยละ 14 – 20 นอกจากนี้พวกแร่ธาตุ หรือ ฟอสเฟตก็มีความจำเป็นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ใช้ อาหารที่ใช้ควรจะมีฟอสเฟตเพียงพอ โลหะอื่นๆ ก็มี เหล็ก สังกะสี ทองแดง ซึ่งโลหะเหล่านี้ไม่จำเป็นต้องมีครบทุกชนิด อาจจะมีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิด โดยทั่วไป fermentation medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะประกอบด้วยกากน้ำตาล (molasses) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ในระหว่างร้อยละ 10 – 20 , NH_4NO_3 , $MgSO_4$ และ KH_2PO_4 และพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะปรับให้อยู่ในช่วงพีเอช 2.5 – 4.0 โดยใช้กรด H_2SO_4 สำหรับแร่ธาตุชนิดอื่นๆ มักจะมีมากในวัตถุดิบที่ใช้บ้างแล้ว และมีอยู่ในปริมาณเพียงพอ แต่ในบางครั้งแร่ธาตุจะมีปริมาณสูงเกินไปในวัตถุดิบที่ใช้ เช่น beet molasses ในกรณีนี้จำเป็นต้องทำการลดปริมาณโลหะก่อน โดยการทำ pretreatment กับ ferricyanide หรือ ferricyanide เพื่อจะ form complex กับโลหะ Fe หรืออาจจะ pretreat invert molasses ด้วย cation – exchange resin ก็ได้ ซึ่งมักจะใช้กับการผลิตกรดซิตริกโดยวิธี submerged-aerated citric acid fermentation

ความสมดุลย์ของโลหะในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดซิตริกในปริมาณสูงนั้นมีความสำคัญยิ่ง ดังนั้นในบางครั้งจึงอาจจะมีการเติมแมงกานีสลงไปด้วย ตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตกรดซิตริกประกอบด้วย molasses 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 มล. และปรับพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย HCL หรือ H_2SO_4 ให้อยู่ในช่วงพีเอช 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 ปริมาณน้ำตาลที่อยู่ใน culture solution จะลดลงจากระยะเริ่มต้นไปประมาณร้อยละ 20 ระดับความเข้มข้นของกรดจะสูงสุดในช่วงนี้ จะทำให้ได้ปริมาณกรดซิตริกความเข้มข้นสูงขึ้น จะทำได้สองวิธีคือ การใช้ขบวนการการหมักที่เหมาะสม (fermentation process) และใช้วิธีการระเหย (evaperation process)

ในระหว่างขบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริก ถ้าหากพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็นพีเอช 3.5 ก็จะต้องคิดว่าอาจมีกรดชนิดอื่นปนมาในขบวนการหมัก เช่น อาจจะเป็นกรดออกซาลิก กรดกลูโคนิค ซึ่งจะไปทำให้กรดซิตริกที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเหล็กปนมาด้วยในปริมาณไม่เหมาะสมนั้น จะทำให้เกิดกรดออกซาลิก เกิดเม็ดสี (pigment) และการงอกของสปอร์ (sporulation) สำหรับการงอกของเส้นใยจะเกิดการสะสมกรดซิตริกได้น้อย เชื้อรา *Aspergillus niger* ส่วนใหญ่จะให้เม็ดสีสีเขียว หรือสีเหลืองในเส้นใยเมื่อเกิด sporulating pigment เหล่านี้จะขับออกจากเซลล์มาใน culture solution เป็นการเพิ่มความยุ่งยากต่อการทำให้กรดซิตริกบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณของกรดซิตริกที่ผลิตขึ้นได้ แบบ surface liquid จะได้ประมาณร้อยละ 80 ถึง 85 ของน้ำหนักคาร์โบไฮเดรตที่เริ่มต้นใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยว มีประมาณร้อยละ 90 ของปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตขึ้น

3. การผลิตกรดซิตริกแบบ Submerged fermentation process ปัจจุบันได้พยายามที่จะพัฒนาการผลิตกรดซิตริก โดยใช้วิธี Submerged fermentation process ซึ่งกรรมวิธีการผลิตในขั้นอุตสาหกรรม ขบวนการผลิตโดยทั่วไปก็อาศัยหลักการเลี้ยงเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus niger* ในถังลึกที่มีอาหารสำหรับการผลิตกรดซิตริก วิธีการผลิตกรดซิตริกโดยใช้ถังหมักนี้ได้ใช้ผลิตเป็นอุตสาหกรรมในหลายๆ ประเทศ เช่น บริษัท Miles Laboratories ในประเทศอเมริกา ในประเทศอิสราเอลและบริษัท John E. Sturge Ltd. ในประเทศอังกฤษ

สำหรับวัตถุดิบที่ใช้ผลิตกรดซิตริกแบบ Submerged fermentation process ได้ดีนั้น สามารถใช้น้ำเชื่อมเข้มข้นที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง น้ำอ้อยเข้มข้นที่มีเข้มข้นของ sucrose inverted ประมาณ 2/3 นอกจากนี้ยังอาจจะใช้ enzyme hydrolyzate ของธัญญาพืชพวกข้าวโพด ข้าวฟ่าง หรือแป้งมันเทศ (Swartove, 1996) ในกรณีที่เป็น enzyme hydrolyzate วัตถุดิบที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ จะต้องมีปริมาณของน้ำตาลอยู่ระหว่าง 15 – 20 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นน้ำเชื่อมที่ใช้ต้องกำจัดประจุบวกต่าง ๆ โดยให้น้ำเชื่อมผ่าน sulphonate ion exchange resin ที่อยู่ในรูปของ hydrogen form สารละลายที่ผ่าน ion exchange resin แล้วจะมีลักษณะเป็นกรดมากขึ้น ดังนั้นจึงต้องเติมแอมโมเนียเพื่อปรับพีเอชให้อยู่ในระหว่างพีเอช 2 – 4 ในขณะเดียวกันจะมีการเติม copper sulphate เพื่อการเจริญของเชื้อรา และเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์เพื่อให้เกิดการสะสมกรดซิตริก หลังจากนั้นจึงจะถ่าย inoculum culture ลงในอาหาร สำหรับผลิตกรดซิตริกแบบปลอดเชื้อ inoculum culture นั้นจะเป็นแบบของแข็งหรือของเหลวก็ได้ ส่วนอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจะให้ผ่านเข้าไปใน fermentation solution และให้ขบวนการหมักเกิดขึ้นจนได้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด ในการหมักนี้ปริมาณออกซิเจนที่ต้องการนั้นมีน้อยมาก แต่ถ้าหากได้มีการหยุดการให้อากาศระยะหนึ่ง การผลิตกรดซิตริกก็จะหยุดชะงักด้วย และอาจจะผลิตกรดซิตริกขึ้นมาใหม่แบบช้า และจะผลิตมากขึ้นต่อไปอีกได้ต่อเมื่อได้มีการปรับพีเอชใหม่และเติมแหล่งอาหารจำพวกไนโตรเจน

หลังจากที่เชื้อราเจริญใน fermentation solution พีเอช ในนั้นไม่ควรจะเกินพีเอช 3.5 เพราะนั่นแสดงว่ามีกรดชนิดอื่นปะปนมาด้วย สำหรับเรื่องการคน (agitation) เพื่อให้ออกซิเจนกระจายอย่างเพียงพอนั้นก็ไม่จำเป็นในกรณีนี้ เพราะช่วงระยะเวลาของขบวนการหมักนั้น ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลในตอนต้นที่ใช้ แต่ในบางครั้งก็อาจจะมีการเติมน้ำตาล จุลินทรีย์และตัวยับยั้งเอนไซม์ ส่วนเวลาของขบวนการหมักจะใช้ประมาณ 5-14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

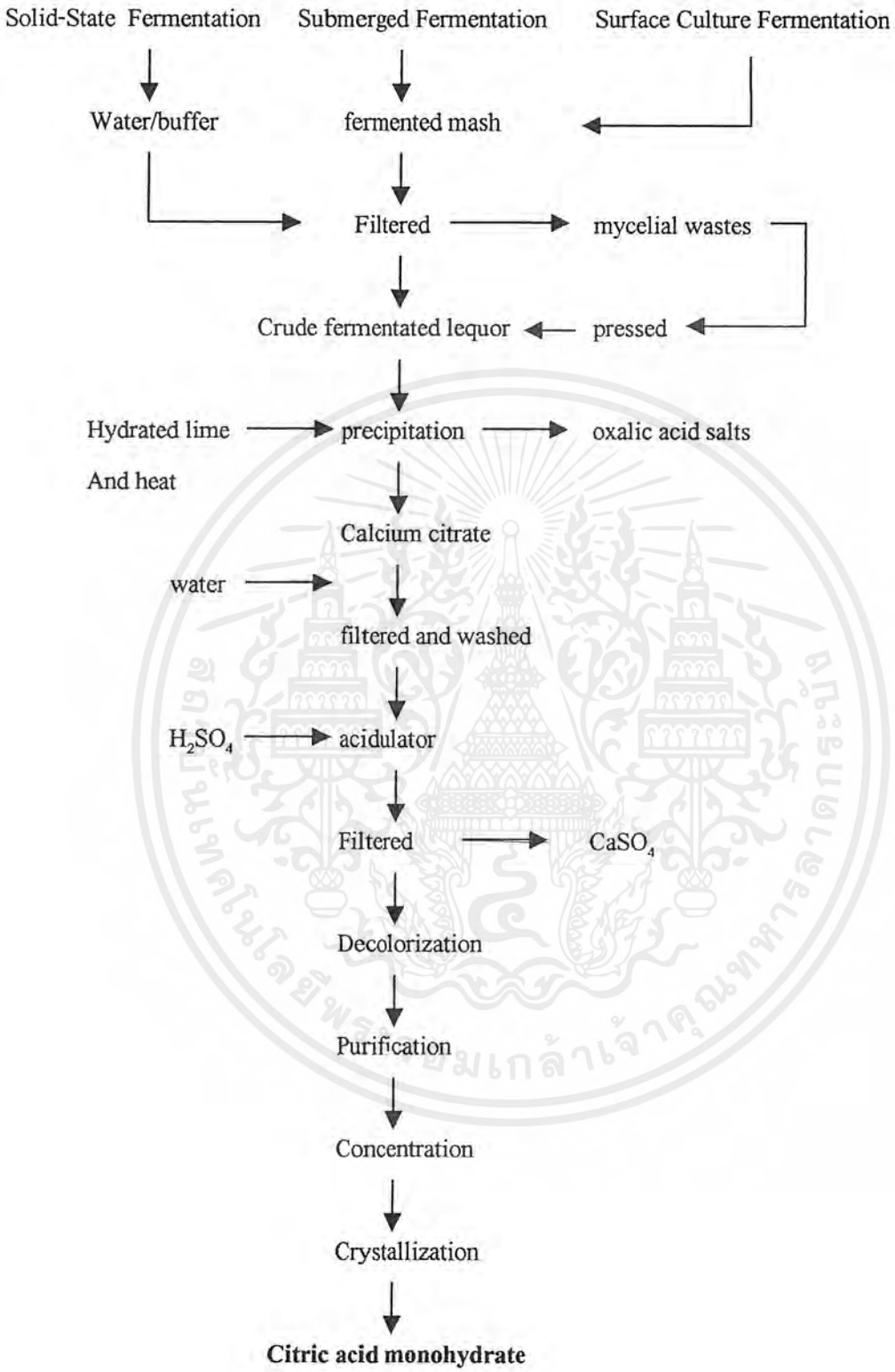
ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตขึ้นได้โดยวิธี submerged fermentation process สามารถผลิตกรดได้ถึงร้อยละ 95 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ในทางการค้านั้นก็ไม่ทราบว่าจะสามารถผลิตได้ถึงขั้นนี้หรือไม่ โดยทั่วไปแล้วปริมาณการผลิตจะอยู่ในช่วงร้อยละ 70-90 ในเวลา 8-10 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Schierholt, 1977)

<u>การแยกกรดซิตริก</u> (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

ตามปกติในกระบวนการหมักมีขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอน ซึ่งประกอบด้วยการเตรียมวัตถุดิบ การหมัก และการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ตามธรรมดาแล้วถ้าทำการหมักจนได้ผลผลิตสูง แต่ถ้าวิธีการที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวไม่เหมาะสม ก็จะทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตลดต่ำลงอีกเช่นกัน

ในกรณีการเก็บเกี่ยวกรดซิตริกออกมาจากน้ำหมักแสดงในรูปที่ 2-4 เริ่มต้นด้วยการแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกมาจากน้ำหมักก่อน (ในกรณีที่ใช้การหมักในกระบวนการหมักที่เชื้อเจริญที่ผิวของอาหารและกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว) หรือต้องทำการสกัดเอากรดซิตริกด้วยน้ำหรือบัฟเฟอร์ออกมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักโดยกระบวนการหมักในสภาพอาหารแห้ง แล้วจึงกรองแยกเอาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ออกก่อน จากนั้นจึงนำน้ำหมักที่ได้มาผ่านกระบวนการการตกตะกอน (precipitation) โดยในช่วงแรกทำการตกตะกอนกรดออกซาลิกออกมาด้วยน้ำปูนใส (hydrated-lime) ปริมาณเล็กน้อยและปรับอุณหภูมิประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมน้ำปูนขาวลงไปอีกในอัตราส่วนน้ำปูนขาว 1 ส่วนต่อน้ำหมัก 2 ส่วน โดยใช้เวลาในการเติมมากกว่า 1 ชั่วโมง ในขณะเดียวกันเพิ่มอุณหภูมิให้สูงถึง 95 องศาเซลเซียส การเติมน้ำปูนขาวในช่วงนี้จะทำให้กรดซิตริกตกตะกอนออกมาในรูปของเกลือแคลเซียมซิเตรท (calcium citrate) ซึ่งจะถูกกรองและล้างด้วยน้ำหลายๆ ครั้ง ก่อนที่จะส่งเข้าเครื่องเติมกรด (acidulators) โดยเติมกรดซัลฟูริค (H_2SO_4) เข้าไปเพื่อแยกเกลือแคลเซียมออกไปในรูปของแคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$) แล้วกรองออกไป ส่วนสารละลายที่มีกรดซิตริกละลายอยู่ จะถูกนำไปกำจัดสี (decolourized) โดยใช้ถ่าน charcoal แล้วจึงนำไปผ่านคอลัมน์เรซินแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange.resin columns) เพื่อทำให้กรดซิตริกที่ได้บริสุทธิ์ปราศจากสิ่งเจือปน (impurities) ก่อนที่จะนำไปทำให้เข้มข้น (concentrated) ภายในสภาพสุญญากาศ แล้วจึงผ่านขั้นตอนการตกผลึก (crystallization) และขั้นตอนทำให้แห้ง ซึ่งจะได้กรดซิตริกในรูป citric acid monohydrate ออกมาในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2-4 ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก

ที่มา : ดัดแปลงมากจาก Lakshminarayans และคณะ (1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อยีสต์ (เช่น *Candida*) นอกจากกรดซิตริกที่ถูกสร้างขึ้นมาแล้ว มักจะมีกรดไอโซซิตริกปนออกมาด้วยเสมอ ดังนั้นในการเก็บเกี่ยวผลผลิต จึงจำเป็นต้องแยกกรดทั้งสองออกจากกัน ทั้งนี้สามารถทำได้โดยการเติมปูนขาว (ในรูปของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ : $Ca(OH)_2$) ในอัตราส่วน 3 : 3 ส่วนของน้ำหมักที่แยกเชื้อออกไปแล้ว และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 85-90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะทำให้กรดซิตริกถูกตกตะกอนออกมา หลังจากนั้นจึงเติมน้ำปูนขาวเพิ่มขึ้นอีก2 ส่วนลงไปในน้ำหมักที่แยกเอากรดซิตริกออกไปแล้ว และควบคุมอุณหภูมิที่ 85-90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะทำให้กรดไอโซซิตริกตกตะกอนลงมา จากนั้นจึงนำทั้งเกลือซิเตรทและเกลือไอโซซิเตรทไปผ่านกระบวนการการเก็บเกี่ยวดังที่กล่าวมาแล้ว

ในกรณีที่ต้องการให้กรดซิตริกอยู่ในรูปของเกลือโซเดียมหรือโพแทสเซียมซิเตรทสามารถทำได้โดยการเติมร้อยละ 15 ของ NaOH หรือร้อยละ 15 ของ KOH ในปริมาณที่มากเกินพอในช่วงอุณหภูมิ 95-98 องศาเซลเซียส แล้วจึงผ่านกระบวนการต่างๆ จนถึงการตกผลึกก็จะได้เกลือซิเตรตทั้งสองรูปออกมา

5.<u>วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก</u>

การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่วัตถุดิบที่ใช้จะเป็นประเภท น้ำตาล และแป้ง สำหรับแป้งจะใช้ใน 2 รูปแบบคือ solid state และย่อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคสในการหมักในอาหารเหลว แป้งที่นำมาผลิตกรดซิตริกอาจจะเป็นแป้งจากธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง แป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลัง รำข้าว แกลบ สำหรับน้ำตาล อาจใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ซูโครส มอลโทส หรืออาจใช้กากน้ำตาลที่มาจากอ้อยและหัวบีท และใช้น้ำผลไม้ เช่น สับปะรด น้ำมะพร้าว และน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (Atsusni et al., 1996; El-Sharkawy *et al.*, 1995 ; Hang *et al.* 1989; Somsak *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังมีการผลิตกรดซิตริกจากวัตถุดิบอื่นๆ เช่น เปลือกแข็งของเมล็ดกาแฟ (coffee husk) โดยใช้กระบวนการหมักแบบ solid-state ด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* (Shankaranand and Lonsane, 1994) เปลือกของลูกแพร์ (pear peel) หมักแบบ solid-state ด้วย *Aspergillus niger* (Gutierrez-Correa *et al.*, 1994) ใช้รำข้าวสาลี (wheat bran) โดยหมักแบบ solid- state โดยเชื้อ *Aspergillus niger* (Shankaranand and Lonsane, 1992) ใช้เปลือกส้ม (orange peel) (Lombardi and Zarizky, 1996) ผลิตจากไซแลน และไซแลนไฮโดรไลซิส โดยหมักแบบ semi-solid โดยเชื้อ *Aspergillus niger* (Kohtaro kirimura *et al.*, 1999) ผลิตจาก soy whey โดยเชื้อ *Aspergillus niger* (Khare *et al.*, 1994) ผลิตจาก cellobiose โดยใช้เชื้อ *Aspergillus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

niger สายพันธุ์มิวแตนท์ที่ต้านทาน 2-deoxyglucase โดยหมักแบบ semisolid (Sarangbin *et al.*,1993) ซึ่งการผลิตกรดซิตริกจากวัตถุดิบต่าง ๆ แสดงดังในตารางที่ 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
Soyabean oil	4	115.0
Linseed oil	4	97.2
Rapeseed oil	4	48.8
Glyceral	4	58.8
N-Paraffin	4	161.0

ที่มา : จิระนันท์ (2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
35867

แอลกอฮอล์หลายชนิด เช่น methanol, butanol, ethanol และ C12-16 alcohols สามารถใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน สำหรับการผลิตกรดซิตริกโดย *C.fibrae, C.subtropicalis, Pichia farinosa, C.lipolytica* และ *Torulopsis xylinus* ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะใช้ร้อยละ 1-2 และเติมแอลกอฮอล์เรื่อยๆ ในระหว่างการหมัก นอกจากแอลกอฮอล์แล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วยแหล่งของไนโตรเจน แหล่งของฟอสเฟต และ trace elements เช่น Fe^{++}, Mg^{++}, Zn^{++}, Mn^{++} และ Cu^{++} Ikeno และคณะ (1975) ทำการหมักแอลกลฮอล์เป็นเวลา 7 วัน พบว่าจะผลิตกรดซิตริกได้ 27.9 กรัมต่อลิตร

C. zeylanoides, C.parapsilosis, C.fibrae และ *C. subtropicalis* สามารถใช้ acetate ในการผลิตกรดซิตริกได้โดยจะใช้ acetic acid หรือ calcium acetate เป็นแหล่งของคาร์บอน

ยีสต์หลายจีนัส เช่น *Candida*, *Hansenula* และ *Pichia* สามารถผลิตกรดซิตริกจากกรดไขมัน natural oils และ fats ได้ นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้ ไข, น้ำมันมะพร้าว, น้ำมันปาล์ม, น้ำมันมะกอก, น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันต้นแฟล็กซ์, น้ำมันปลา, น้ำมันข้าวโพด และกรดไขมันอิสระ มีการผลิตกรดซิตริกโดย Ikeno (1975) ผลิตกรดซิตริกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะพร้าว และส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้

น้ำมันมะพร้าวร้อยละ	5.0
$(NH_4)_2SO_4$ ร้อยละ	0.2
น้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ	0.26
KH_2PO_4 ร้อยละ	0.0125
$MgSO_4.7H_2O$ ร้อยละ	0.01
$CaCO_3$ ร้อยละ	0.5
Antifoam ร้อยละ	0.5
Thiamine hydrocholride	100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าเป็นเวลา 84 ชั่วโมง จะผลิตกรดซิตริกจากน้ำมันปาล์มได้ร้อยละ 146 โดยใช้มิวแตนท์ ของ *C.lipolytica*

นอกจากนี้ *C.lipolytica* สามารถผลิตกรดซิตริกจาก hydrocarbon เช่น n-paraffins,n-alkanes และ alkenes Tabuchi และคณะ (1969) รายงานส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดซิตริกจาก n-paraffins ไว้ดังนี้คือ n-paraffins 40-60 กรัม, NH_4Cl 2 กรัม, KH_2PO_4 0.5 กรัม, $MgSO_4$ 0.5 กรัม, น้ำแช่ข้าวโพด 1 กรัม และ $CaCO_3$ 30 กรัมต่อลิตร ทำการหมักโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการหมักกรดซิตริกโดย *A.niger* พบว่าความเข้มข้นของ Fe^{++} ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อปริมาณกรดซิตริก และ isocitric acid ถ้าปรับปริมาณ Fe^{++} ให้มีความเข้มข้นต่ำมากๆ จะสามารถเพิ่มกรดซิตริกและลด isocitric acid ได้ แต่การทำให้ความเข้มข้นของ Fe^{++} ใน complex media มีค่าต่ำทำได้ยาก ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้ *C.lipolytica* สายพันธุ์ที่ไวต่อ fluoroacetate ซึ่งมี aconitase activity ต่ำจะสามารถเพิ่มการผลิตกรดซิตริก จาก n-paraffin ได้

ในบางครั้งจะตรวจพบ polyhydric alcohols เช่น mannitol, sorbitol หรือ erythritol ในระยะเริ่มต้นของกระบวนการหมัก n-paraffin culture medium ที่มี neutralizing agent เช่น $CaCO_3$ Tabuchi และ Hara (1973) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี neutralizing agent ปริมาณของ citrate จะลดลง และพบว่าความเข้มข้นของ thiamine ในอาหารที่ใช้ในการผลิตจะมีผลต่อการผลิตกรดซิตริกและ isocitric acid ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมี thiamne ในปริมาณที่เพียงพอจะมีการผลิตกรดซิตริกมากแต่ถ้าขาด thiamine จะทำให้มีการผลิต ketoglutarate มากและมี citrate ลดลง

การผลิตกรดซิตริกจาก n-alkanes จะเหมือนกับการผลิตจาก n-paraffins Tabuchi และคณะ (1969) รายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดซิตริกจาก alkanes โดยเชื้อ *C. lipolytica* ประกอบด้วย hydrocarbon ร้อยละ 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 3 เมื่อหมักเป็นเวลา 6-8 วัน โดยมีการเขย่าจะผลิตกรดซิตริกได้ร้อยละ 17-56 ขึ้นอยู่กับชนิดของ alkane

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

6. <u>จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดซิตริก</u> (วราวุฒิ และ รุ่งนภา, 2532)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้มีดังนี้

6.1 การผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อรา

ปัจจัยในการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรามีดังนี้

1. สายพันธุ์ของเชื้อรา
2. ชนิดของกระบวนการหมัก
3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ของราที่สามารถผลิตกรดซิตริกในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ *Aspergillus niger, A. awamori, A. fonsecaens, A. luchensis, A. wentii, A. saitoi, A. usami, A. fumaricus, A.phoenicus; A. flavus, Penicillium restrictum, Penicillium janthinellum, Trichoderma viride, Mucor piriformis, Ustulina vulgaris* และเชื้อราสายพันธุ์ *Botrytis, Ascochyta, Absidia, Talaromyces, A cremonium* และ *Eupenicillium* เป็นต้น

เชื้อราสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม คือ *A. niger* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ใช้ในการผลิตมาตั้งแต่อดีตจวบจนกระทั่งถึงปัจจุบัน ทั้งนี้จะต้องเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบและปรับพีเอชให้อยู่ในระดับกรด ในการใช้เชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริกนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการ ดังนี้คือ

1. การปฏิบัติงานสามารถทำได้ง่าย
2. วัตถุดิบที่เชื้อราสามารถใช้เพื่อผลิตกรดซิตริกมีราคาถูก
3. ผลิตผลที่ได้มีปริมาณสูงและมีความคงตัว

6.2 การผลิตกรดซิตริกโดยยีสต์

ถึงแม้ว่าการผลิตกรดซิตริกโดยส่วนใหญ่จะใช้เชื้อรา *A. niger* และเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆ อีกก็ตาม แต่ยังมีเชื้อยีสต์อีกหลายชนิดที่พบว่ามีการสะสมกรดซิตริกในระหว่างการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อยีสต์ดังกล่าวนี้ได้แก่ *Brettanomyces, Candida fibriae, C. guilliermondii, C. intermedia, C. lipolytica, C. oleophila, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. subtropicalis, C. zeykanoides, Endomycopsis, Hansenula, Nemetospora, Pichia, Saccharomyces, Sporobolomyces, Torulopsis* และ *Zygosaccharomyces* (คุษณี, 2537) Oh และคณะ (1973) รายงานว่าการผลิตกรดซิตริกโดย *Hansenula anomala* ในร้อยละ 10 ของ glucose medium ที่มี $CaCO_3$ ร้อยละ 3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที และเติม potassium dihydrogen phosphate ร้อยละ 0.05 magnesium sulfate ร้อยละ 0.025 และ ammonium chloride ร้อยละ 0.1 หมักเป็นเวลา 6 วัน จะผลิตกรดซิตริกได้ร้อยละ 46

Ishi และคณะ (1972) ผลิตกรดซิตริกจาก waste glucose (glucose ร้อยละ 32.6 และ fructose ร้อยละ 3) ที่ได้หลังจากแยก fructose ออกจาก fructose-glucose mixture แล้วเติม urea, corn steep liquor, KH_2PO_4, $MnSO_4$ และ $CaCO_3$ หมักโดยเชื้อ *C. oleophila* ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยให้อากาศเป็นเวลา 5 วัน จะผลิต calcium citrate ได้ร้อยละ 70.5

Miall และ Parker (1975) ผลิตกรดซิตริกจากกากน้ำตาลโดยใช้กระบวนการแบบต่อเนื่องและใช้เชื้อ *C. guilliermondii* และ *C. lipolytica* อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ประกอบด้วย sugarcane หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

beet molasses 50-250 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน คือ $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl หรือ NH_4NO_3 เกลือแร่ และ vitamin B complex ทำการหมักเป็นเวลา 189 ชั่วโมงให้อากาศ 0.3-1.5 vvm พีเอช เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5-6.5 และพีเอชจะคงที่ที่ 2.8-4.0 ในระหว่างที่มีการผลิตกรดซิตริก พบว่ากาก น้ำตาล 3145 กิโลกรัม จะผลิต citrate monohydrate ได้ 119 กิโลกรัม.

มีรายงานว่า *Candida lipolytica* สามารถใช้วัตถุดิบเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซิตริกได้หลายชนิด โดยได้มีรายงานว่าเชื้อ *C. lipolytica 281* (ATCC 20346) และสลายพันธุ์ที่กลายพันธุ์นั้นเมื่อเลี้ยงในอกหารที่มีกลูโคสร้อยละ 17.3 , เอ็น-พารานิน และ น้ำมะพร้าวร้อยละ 5 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส *C. lipolytica 281* มีอัตราการผลิตกรดซิตริกและกรดไอโซซิตริกเป็น 2 ต่อ 1 เมื่อใช้น้ำมันมะพร้าวและเอ็น-พาราฟิน ถ้าใช้สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ N-5704 จะมีอัตราการผลิตกรดซิตริก และกรดไอโซซิตริกเป็น 44 ต่อ 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเอ็น-พารานิน และถ้าใช้สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ N-2484 จะมีอัตราการผลิตกรดซิตริก และกรดไอโซซิตริกเป็น 62 ต่อ 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกลูโคส สำหรับผลผลิตของสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ N-5704 จากวัตถุดิบอื่นๆ แสดงดังตาราง 4 นอกจากนี้ยังสามารถใช้แอลกอฮอล์หลายชนิด เช่น เอทานอล เมทานอล บิวทานอล รวมถึงแอลกอฮอล์ที่มี 12-16 คาร์บอน ซึ่งเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนรูปนี้ เช่น *Candida fibrae, C. subtropicalis, Torulopsis xylinus* เป็นต้น โดยทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลกอฮอล์ประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ จะได้กรดซิตริกประมาณ 28 กรัมต่อลิตรภายใน 7 วัน (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

ข้อดีของการใช้ยีสต์ในการผลิตกรดซิตริก เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโดย aspergilli คือ สามารถใช้กระบวนการแบบต่อเนื่องในการผลิตได้

6.3 การผลิตกรดซิตริกโดยแบคทีเรีย (กำเนิด, 2534)

แบคทีเรียบางชนิด เช่น Bacillus *licheniformis, Bacillus subtilis* และ *Brevibacterium flavum* สามารถผลิตกรดซิตริกจาก glucose,isocitric acid หรือ hydrocarbons ได้ Sardinas (1972) ผลิตกรดซิตริกโดย *B. licheniformis* จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอน และแหล่งของไนโตรเจน คือ urea, ammonium sulfate หรือ glutamate และมี $CaCO_3$ ทำการหมักภายใต้สภาวะที่มีอากาศที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36-120 ชั่วโมง และ พีเอช 7.0 จะผลิตกรดซิตริกได้ 42 กรัมต่อลิตร Kyowa Fermentation Industries ผลิตกรดซิตริกโดย *Arthrobacter paraffinens* จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี dodecane หรือส่วนผสมของ C_{12}-C_{14} paraffins และ salts ใช้เชื้อตั้งต้นร้อยละ 5 และให้อากาศ 3 vvm ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลิตกรดซิตริกได้ 28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ *Corynebacterium* sp. และ *Brevibacterium* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถผลิตกรดซิตริกจาก n-paraffins ได้ 41.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้เวลาในการหมัก 64 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

Klebsiella, Aerobacter, Pseudomonas, Micrococcus, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium และ *Arthrobacter* สามารถผลิตกรดซิตริกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี isocitric acid ร้อยละ 5.6 พีเอช 5-8 ใช้เวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 32-37 องศาเซลเซียส และมีการเขย่า

มิวแตนท์ของ *Brevibacterium flavum* ที่ต้องการ L-glutamate สำหรับเจริญ สามารถผลิตกรดซิตริกได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสร้อยละ 3.6 , ยูเรียร้อยละ 0.2 , KH_2PO_4 ร้อยละ 0.01 , $MgSO_4$ ร้อยละ 0.04 , Sodium L-glutamate ร้อยละ 0.05 , $CaCo_3$ ร้อยละ 1 , soybean hydrolysate 3 มิลลิลิตรต่อลิตร และ vitamin B_{12} , $FeSO_4$ และ $MnSO_4$ ปริมาณเล็กน้อยหลังจาก บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พีเอช 7.4 จะผลิตกรดซิตริกได้ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

การผลิตกรดซิตริก โดยแบคทีเรีย แม้ว่าจะมีการศึกษาน้อยกว่าการผลิตจากเชื้อรา แต่เป็นหนทางใหม่ของการผลิตกรดซิตริก

7. <u>สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก</u> (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา โดยเฉพาะในสภาพการหมักในอาหารเหลว จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. ธาตุอาหาร (Nutrient)
2. การแปรสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment of raw materials)
3. พีเอช (pH)
4. หัวเชื้อ (Inoculum)
5. การควบคุมสภาพการหมัก (Fermentation control)
6. สารกระตุ้น (Stimulants)

1. ธาตุอาหาร

ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริกนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราและชนิดของการหมัก ซึ่งตามปกติแล้วเชื้อราสายพันธุ์ที่ใช้จะมีความจำเพาะต่อกระบวนการที่ใช้เท่านั้น ดังเช่นถ้าใช้เชื้อราสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกด้วยกระบวนการหมักที่ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ จะให้ประสิทธิภาพในการผลิตลดต่ำลงถ้านำไปใช้กับกระบวนการหมักในอาหารเหลวเป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริกพอจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1.1 คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส (carbon, nitrogen and phosphorus)

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

ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *A.niger* (สายพันธุ์ที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน) จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม ซึ่งโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงร้อยละ 15-18 อย่างไรก็ตาม ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงกว่าร้อยละ 15-18 จะทำให้มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการหมัก (residual sugars) สูง ซึ่งจะเป็นการสิ้นเปลือง แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่ำเกินไปจะส่งผลให้ผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้ลดน้อยลง และในขณะเดียวกันจะเกิดการสะสมของกรดออกซาลิกด้วย (Kovats, 1960)

ตามปกติแล้วการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา มักต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อ (synthetic media) ที่มีองค์ประกอบง่ายไม่ซับซ้อนอย่างเช่น แหล่งคาร์บอนที่ใช้กันได้แก่ น้ำตาลซูโครส , น้ำอ้อย , แป้งจากแหล่งต่างๆ , กากน้ำตาลจากอ้อย เป็นต้น ทั้งนี้น้ำตาลซูโครส หรือกากน้ำตาล เป็นวัตถุดิบที่นิยมใช้กันมากที่สุด กากน้ำตาลหรืออาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าน้ำเหลือง เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย ประมาณกันว่าน้ำตาลทรายที่ผลิตขึ้นมาทุก 3 ตัน จะให้กากน้ำตาลประมาณ 1 ตัน แต่คุณสมบัติของกากน้ำตาลจะดีหรือไม่ดีขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของโรงงานน้ำตาลเป็นสำคัญ กากน้ำตาลแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ blackstrap molasses (กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 50-60) refinery molasses (กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 48) และ hightest molasses หรือ invert molasses (กากน้ำตาลผลิตขึ้นมาโดยนำน้ำอ้อยมาเปลี่ยนรูปหรือ invert บางส่วนแล้วจึงนำไประเหยให้ข้นเป็นน้ำเชื่อม ดังนั้น hightest molasses จึงไม่ใช่กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทราย มีน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 70) โดยส่วนใหญ่ตามโรงงานนิยมใช้กากน้ำตาลชนิดแรกเป็นวัตถุดิบ ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2-5 จะเห็นได้ว่าในกากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลซูโครสอยู่สูงและเหมาะสมในการใช้เป็นวัตถุดิบ อย่างไรก็ตาม ในการใช้กากน้ำตาลนี้อาจเกิดข้อเสียต่อการหมักทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณของเถ้า (ash) สูงซึ่งจะส่งผลยับยั้งประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริกได้ ในการหมักที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบนี้ เริ่มต้นด้วยการนำเอากากน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 15-20 และปรับพีเอชเท่ากับ 5.5-6.5 ด้วยกรดซัลฟูริคเจือจาง จากนั้นจึงเติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที ทำการถ่ายสปอร์ของเชื้อรา *A.niger* เพื่อทำการหมักต่อไป

ตารางที่ 2-5 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 กรดอะโคนิติก	3.0
กรดซิตริก กรดมาลิก กรดซักซินิก เป็นต้น	trace
แวกซ์ , สเตอรอล , เม็ดสี และ วิตามิน	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)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งไนโตรเจน ที่จำเป็นต่อการผลิตกรดซิตริกอยู่ในรูปของเกลืออนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) และยูเรีย เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ชนิดของแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ จะส่งผลกระทบต่อเชื้อราอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ ถ้าใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อรากินเวลานาน ในขณะที่ถ้าใช้แอมโมเนียมไนเตรตจะทำให้ระยะดังกล่าวกินเวลาน้อย อย่างไรก็ตามถ้าใช้แอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 0.25 จะก่อให้เกิดการสะสมของกรดออกซาลิกขึ้นอีก

ในกลุ่มของเกลือไนเตรตจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรตและโพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้ผลในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *A. niger* ได้สูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรต จากการศึกษาต่อมาพบว่าโซเดียมไนเตรตในระดับความเข้มข้นเพียงร้อยละ 0.4 ก็ให้ผลผลิตของกรดซิตริกสูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตแล้ว ดังนั้นในการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนเพื่อให้ผลผลิตของกรดซิตริกสูงสุดแล้ว ยังจำเป็นต้องพิจารณาถึงความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้นั้นอีกด้วย ทั้งนี้เพราะถ้าความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สูงเกินไป จะทำให้ระยะการเจริญเติบโตกินเวลานาน และทำให้ขั้นตอนของการผลิตเกิดขึ้นได้ช้าตามไปด้วย อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมนี้จะต้องขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา และกระบวนการหมักที่ใช้เป็นสำคัญ

นอกจากคาร์บอนและไนโตรเจนแล้ว ฟอสเฟต เป็นธาตุหลักชนิดที่สามที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา นอกจากนี้ยังมีรายงานแสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดซิตริกออกมา จะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อราเกิดการสะสมของสารประกอบฟอสฟอรัสในปริมาณที่มากเพียงพอแล้ว อย่างไรก็ตาม ปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการหมัก จะส่งผลต่อปริมาณของกรดซิตริกที่ถูกสร้างขึ้นมา กล่าวคือ ถ้าฟอสเฟตมีความเข้มข้นสูงจะทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อราเกิดขึ้นได้ดี แต่ขณะเดียวกันทำให้การผลิตกรดซิตริกลดต่ำลงด้วย ปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมอยู่ในช่วงร้อยละ 0.1-0.2

1.2 แร่ธาตุ

เชื้อรา *A.niger* สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกต้องการแร่ธาตุหลายชนิด ได้แก่ Fe^{++}, Cu^{++}, Zn^{++}, Mn^{++}และ Mg^{++} เป็นต้น สำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิตริก อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะส่งผลกระทบต่อการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกอย่างมากจนอาจกล่าวได้ว่า ถ้าต้องการจะให้การผลิตกรดซิตริกประสบความสำเร็จ เราจะต้องสามารถควบคุมความเข้มข้นของแร่ธาตุนี้เสียก่อน แร่ธาตุดังกล่าวพอจะแบ่งออกได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมกนีเซียมไอออน (magnesium ion: Mg^{++}) มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาเอนไซม์หลายชนิดภายในเซลล์ ในขณะเดียวกันก็ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริกด้วย สำหรับความเข้มข้นของ $MgSO_4$ ที่เหมาะสมเพื่อผลิตกรดซิตริกให้ได้สูงสุดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.02-0.025

ในบรรดาแร่ธาตุหลายชนิดเหล่านี้ แร่ธาตุที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการหมักคือ Fe^{++} และ Zn^{++} โดยทั่วไปแล้วแร่ธาตุทั้งสองชนิดนี้ต้องมีความเข้มข้นต่ำจึงจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริก แต่ถ้าความเข้มข้นสูงจะทำให้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตยืดยาวออกไป

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ เฟอรัสไอออน (ferrous ion: Fe^{++}) สำหรับการผลิตกรดซิตริกสูงสุดขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อรา ดังที่ Schweiger (1961) รายงานว่าการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อ *A. niger* ภายใต้สภาะการหมักในสภาพอาหารเหลว โดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบพบว่าความเข้มข้นของ Fe^{++}เพียง 0.2 พีพีเอ็ม (หนึ่งส่วนในล้านส่วน) ก็ส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อการหมัก แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าเติมทองแดงไอออน (copper ion: Cu^{++}) ความเข้มข้น 0.1-500 พีพีเอ็ม ลงไปในน้ำหมักในระหว่างการถ่ายสปอร์เชื้อหรือในช่วง 50 ชั่วโมงแรก Cu^{++} จะไปช่วยลดความรุนแรงของ Fe^{++} ลงมาได้มาก และจากการศึกษาของ Fedoseev(1970) พบว่าถ้าเติม $CuSO_4$ ในระดับ 4.7 มิลลิกรัมต่อกากน้ำตาล 100 กรัม จะช่วยทำให้การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลให้เป็นกรดซิตริกสูงขึ้น

ความเข้มข้นของ ซิงค์ไอออน (zinc ion: Zn^{++}) ต่อการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อ *A. niger* มีลักษณะเช่นเดียวกับ Fe^{++} ถ้าความเข้มข้นของ Zn^{++} อยู่ในระดับ 1-2 ไมโครโมล จะทำให้ช่วงของการเจริญเติบโตของเชื้อราเกิดอย่างต่อเนื่อง แต่ถ้าความเข้มข้นต่ำกว่า 1 ไมโครโมลจะกลับยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริกด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ในการติดตามการหมักยังอาศัยความเข้มข้นของ Zn^{++} เข้ามาเกี่ยวข้องได้อีก กล่าวคือในระหว่างช่วงการเลี้ยงเชื้อรา เมื่อเกิดการขาด Zn^{++} ขึ้นมาช่วงใดย่อมเป็นสัญญาณแสดงให้เห็นว่า จะเกิดการเปลี่ยนสภาพจากช่วงการเจริญเติบโตไปสู่ช่วงการผลิตกรดซิตริกต่อไป

ส่วนแร่ธาตุชนิดอื่นๆ เช่น Mn^{++} ,Ba^{++},Al^{+++} เป็นต้น จะก่อให้ผลกระทบต่อลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริก แต่อย่างไรก็ตาม แร่ธาตุเหล่านี้ไม่ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ส่วนผลกระทบที่แน่นอนต่อการผลิตกรดซิตริกว่าเกิดขึ้นในบริเวณใดหรือช่วงใดยังไม่ปรากฏแน่ชัดในปัจจุบัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การแปรสภาพของวัตถุดิบ

จากการที่แร่ธาตุที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลกระทบต่อการผลิตกรดซิตริก ดังนั้นจึงได้มีการค้นคว้าหาเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ลดความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านั้นให้อยู่ในระดับต่ำที่สุด อย่างไรก็ตามความเป็นไปได้ในเชิงปฏิบัติเพื่อกำจัดแร่ธาตุดังกล่าวอย่างสมบูรณ์ทำกันได้ยากมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ

สำหรับเทคนิคที่ใช้ในการแก้ไขปัญหานี้เท่าที่มีการศึกษาค้นคว้า พอจะแบ่งออกได้ 2 วิธี คือ

2.1 การแปรสภาพของวัตถุดิบด้วยสารเคมีหรือเรซินที่ใช้แลกเปลี่ยนประจุ เพื่อลดความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านั้น

2.2 การปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา เพื่อให้สามารถผลิตกรดซิตริกได้ ในสภาพที่มีแร่ธาตุอยู่ในระดับความเข้มข้นสูง

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

สารเฟอโรไซยาไนด์ ในระดับความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อเชื้อรา แต่ความเข้มข้นในระดับดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยตกตะกอน Fe^{++} และ Zn^{++} ได้อย่างดี สำหรับความเข้มข้นของเฟอโรไซยาไนด์ที่ใช้นี้ขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้เป็นสำคัญ เช่น ในกรณีของกากน้ำตาล อาจใช้เฟอโรไซยาไนด์ได้ในช่วงร้อยละ 0.005-0.04 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกากน้ำตาลด้วยเช่นกัน ส่วนการเติมเฟอโรไซยาไนด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนทำการถ่ายสปอร์ของเชื้อนั้น ใช้ความเข้มข้น 20-40 พีพีเอ็มก็เพียงพอ

การเติมสารโพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณของคาร์บอน ไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัส แต่จะช่วยลดปริมาณของเถ้า (ash) และช่วยทำให้แร่ธาตุ Fe^{++} และ Zn^{++} ตกตะกอนซึ่งจะช่วยลดผลกระทบของแร่ธาตุทั้งสองต่อการหมักดังที่ได้กล่าวมา

นอกจากนี้แล้วสารเคมีที่ใช้ลดปริมาณของแร่ธาตุยังมีอีกหลายชนิด อาทิเช่น EDTA, activated charcoas, polyethylene amine และ quaternary ammonium compound (เช่น diisobutylphenoxyethyl dimethylbenzylammoniumchloride) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับในกรณี การใช้เรซินที่ใช้แลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange resins) ในการลดปริมาณของแร่ธาตุในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหรือใช้วัตถุดิบชนิดอื่นๆ ปรากฏว่าวิธีการนี้ให้ประสิทธิภาพในการลดปริมาณแร่ธาตุสูงกว่าวิธีการที่ใช้ในการเติมสารเคมี ดังนั้นจึงน่าที่จะนำเรซินมาใช้ แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นจะต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

3. พีเอช

ตามปกติเชื้อราที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกสามารถทนต่อปริมาณกรดซิตริกที่สร้างขึ้นมาและทำให้ให้พีเอชลดลง ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมสารที่ใช้ปรับพีเอชให้เป็นกลาง (neutralizing agent) เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ลงไป

ในการหมักจำเป็นจะต้องปรับพีเอชเริ่มต้น แต่ทั้งนี้ขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ เช่น ในกรณีที่ใช้ซูโครสหรือกลูโคส รวมถึงกากน้ำตาลที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแล้ว ให้ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.0 ทั้งนี้เพราะถ้าปรับพีเอชเริ่มต้นสูง จะทำให้เกิดการสะสมกรดออกซาลิกขึ้นมาแทน ส่วนในกรณีที่ใช้กากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการแปรรูป (หรือเรียกว่า crude cane molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน จำเป็นจะต้องปรับพีเอชเริ่มต้นให้สูง เพราะถ้าพีเอชต่ำจะทำให้เชื้อรา *A.niger* ถูกยับยั้งด้วยสารต่างๆ เช่น แร่ธาตุที่มีอยู่ในกากน้ำตาลนั้น อย่างไรก็ตาม ถ้ากากน้ำตาลที่ใช้ได้ผ่านการแยกเอาประจุบวก (decationized molasses) ออกไปแล้วจะสามารถปรบพีเอชเริ่มต้นได้ถึงช่วง 1.4-2.8

การปรับพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในระดับต่ำ (ความเป็นกรดสูง) ก่อให้เกิดผลดีดังนี้

ก. ช่วยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ

ข. ช่วยยับยั้งการสร้างและ/หรือการสะสมกรดออกซาลิก

ค. ช่วยทำให้กระบวนการฆ่าเชื้อที่ใช้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

สำหรับส่วนประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A.niger* แสดงอยู่ในตารางที่ 2-6 พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครสหรือกากน้ำตาลเป็นแหล่งวัตถุดิบเท่ากับ 2.0-3.0 หรือ 5.0-6.0 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-6 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
พีเอช : อาหารเลี้ยงเชื้อจากกากน้ำตาล	5.0-6.0
อาหารเลี้ยงเชื้อจากซูโครส	2.0-3.0

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kapoor และคณะ (1982)

4. หัวเชื้อ

โดยทั่วไปเชื้อราสายพันธุ์ที่ผลิตกรดซิตริกจำเป็นต้องทำการเก็บรักษาเพื่อให้มีชีวิตอยู่ตลอดไป และคงคุณสมบัติและลักษณะเดิมให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยให้มีการเปลี่ยนแปลงให้น้อยที่สุด ทั้งนี้โดยอาศัยวิธีการต่างๆ ดังนี้

ก. การเก็บรักษาโดยเลี้ยงเชื้อราไว้บนอาหารวุ้นและทำการถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่เป็นระยะๆ ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะต้องเป็นอาหารที่เชื้อเจริญได้ดี และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อน้อยที่สุด เช่น เชื้อรา โดยทั่วไปจะใช้อาหาร potato dextrose agar (PDA) เพราะเป็นอาหารที่มีธาตุอาหารสำหรับเชื้อราครบถ้วน นอกจากนี้อาจใช้วัสดุตามธรรมชาติที่เชื้อราสามารถเจริญขึ้นได้ เช่น ดิน เมล็ดธัญพืช มันฝรั่ง ผลไม้ ซึ่งนำมานึ่งฆ่าเชื้อก่อนทำการเลี้ยงเชื้อแทนอาหารเลี้ยงเชื้อก็ได้

ข. การเก็บโดยทำให้แห้งและเก็บไว้ภายใต้สภาพไม่มีอากาศ (โดยการหลอมปิดปากหลอดหรือใช้หลอดฝาเกลียวที่ปิดสนิท) โดยทำสารละลายสปอร์ของเชื้อราโดยใช้อาหารป้องกัน (protective medium) ที่นิยมใช้คือหางน้ำนม (skim milk) นำไปใส่หลอดที่มีทรายหรือดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อราแล้ว หรือซิลิกาเจล (silica gel) ที่แห้ง ทำการดูดอากาศออกแล้วหลอมปิดปากหลอด

ค. การเก็บโดยวิธี lyophilization หรือ freeze-drying โดยทำสารละลายสปอร์ของเชื้อราด้วยอาหารป้องกัน เช่น เซรุ่ม น้ำตาลชนิดต่างๆ หรือหางน้ำนมเป็นต้น ที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือหางน้ำนมนำสารละลายใส่หลอด ampules (หลอดขนาดเล็ก มีหยักโดยรอบตรงบริเวณคอ) ทำให้แห้งในขณะที่แข็งตัวโดยดูดอากาศออก เมื่อแห้งแล้วก็ทำการหลอมปากหลอด ampules

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง. เก็บภายใต้ความเย็นยิ่งยวด (Ultra-low temperature) โดยใช้ไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิที่เก็บประมาณ –130 องศาเซลเซียส

สำหรับหัวเชื้อที่ใช้ในการหมัก อาจใช้ในลักษณะของสปอร์หรือเส้นใยในช่วงก่อนเจริญเติบโต (pregrown mycelia) สำหรับการใช้สปอร์ จำเป็นต้องเตรียมสารละลายสปอร์ด้วยน้ำกลั่นหรือ น้ำกลั่นผสม Tween 80 ที่ผ่านมาการฆ่าเชื้อแล้ว และปรับให้มีปริมาณสปอร์ประมาณ 10^8-10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร การใช้สปอร์นี้นิยมใช้ในการหมักในสภาพที่เชื้อเจริญที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อและการหมักในสภาพอาหารแข็ง โดยที่การหมักในสภาพแรกนั้น ภายหลังที่เติมสปอร์ลงไปแล้วจะเกิดเป็นเส้นใยเจริญปกคลุมที่ผิวของอาหารเหลว แล้วรวมตัวเป็นก้อนซึ่งเรียกว่า “mycelial mat” ซึ่งอาจนำไปใช้เป็นหัวเชื้อของการหมักครั้งต่อไปได้

หัวเชื้อที่ใช้ในการหมักในสภาพอาหารเหลว สามารถใช้สปอร์หรือ mycelial pellets ก็ได้ แต่ถ้าใช้ mycelial pellets จะต้องเตรียมขึ้นโดยถ่ายสปอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจริญเติบโต (growth medium) บ่มในสภาพอาหารเหลวเป็นเวลา 2-3 วัน จนเกิดเป็น pellets ขึ้นมาจึงนำไปใช้ต่อไป

สำหรับหัวเชื้อที่ใช้ในลักษณะของเส้นใยช่วงก่อนเจริญเติบโต การเตรียมหัวเชื้อนี้จะต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบที่เหมือนกันกับที่ใช้ในการหมัก ทั้งนี้เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในการหมักได้ดีและรวดเร็ว

จากที่กล่าวมาจะเห็นว่าในการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกในสภาพต่างๆ สามารถใช้หัวเชื้อในลักษณะต่างๆ ซึ่งในแต่ละลักษณะจำเป็นต้องมีการคำนึงถึงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อใช้เตรียมหัวเชื้อให้แข็งแรงและสามาถทำการหมักได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนันจึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพื่อพัฒนาการเตรียมหัวเชื้อควบคู่กับการพัฒนาทางด้านอื่นๆ ด้วย จึงจะทำให้การหมักเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์และให้ผลผลิตสูงตามที่ต้องการ

5. การควบคุมสภาพการหมัก

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

ในการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริก จัดเป็นการหมักในสภาพที่มีอากาศ (aerobic fermentation) ดังนั้นเชื้อราจึงจำเป็นต้องได้รับอากาศในปริมาณมากเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งในระหว่างการหมักสามารถควบคุมปริมาณอากาศได้ โดยอาศัยการให้อากาศ และการกวน ทั้งสองระบบนี้จะช่วยทำให้การแผ่กระจายออกซิเจนในน้ำหมักได้ดี แต่ทั้งนี้จะต้องขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และขนาดของถังหมักเป็นสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การให้อากาศลงในน้ำหมักสามารถทำได้หลายแบบดังนี้

1.การแพร่กระจายของอากาศลงสู่น้ำหมักโดยตรง กล่าวคือ อากาศหรือออกซิเจนที่อยู่ในบริเวณเหนือผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะแพร่กระจายเข้าสู่น้ำหมัก โดยส่วนใหญ่แล้วการให้อากาศแบบนี้มักใช้กับการเลี้ยงเชื้อราให้เจริญที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือ surface culture

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

3.การเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) ซึ่งวิธีการนี้สามารถใช้ได้ทั้งการหมักสภาพเลี้ยงเชื้อที่ผิวหน้าอาหาร และการหมักในสภาพอาหารเหลว แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่เหมาะสมต่อการใช้ในระดับอุตสาหกรรม

การหมักกรดซิตริกในสภาพที่เชื้อเจริญที่ผิวอาหาร (surface culture) นิยมทำในถาดซึ่งมีลักษณะคล้ายกระทะก้นแบนทรงตื้นหรือเรียกว่า shallow pans ซึ่งทำด้วยโลหะปลอดสนิม ในระหว่างการหมักจะมีเชื้อราเจริญอยู่ที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดซิตริก โดยอาศัยกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเส้นใย หลังจากนั้นจึงปล่อยออกมาสู่น้ำหมัก สำหรับอากาศได้จากการเป่าอากาศชื้น (humidified air) เข้าไปเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ อากาศจะแพร่กระจายลงไปสู่อาหารแล้วเชื้อราจึงนำไปใช้ในเมตาบอลิซึมของเชื้อต่อไป

การให้อากาศและการกวนจะช่วยทำให้มีออกซิเจนเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา และทำให้การปล่อย (excretion) กรดซิตริกจากเส้นใยสู่น้ำหมักเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพในการหมักในสภาพอาหารเหลว ส่วนการหมักในสภาพอาหารแห้งอากาศที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริก จะได้จากอากาศที่แพร่กระจายผ่านตามช่องว่างของสับสเตรท (void fraction) ในการหมักระบบนี้จะไม่สามารถใช้การกวนหรือการเขย่าได้

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *A.niger* หรือเชื้อราอื่น ๆ อยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิในระหว่างการหมักสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส จะทำให้ผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้ลดลง และในขณะเดียวกันจะเกิดสะสมกรดออกซาลิคด้วย

ระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก ขึ้นกับชนิดของเชื้อราและสภาวะของการหมักเป็นหลัก กล่าวคือ ในกรณีที่ใช้เชื้อ *A. niger* ถ้าทำการหมักโดยเลี้ยงเชื้อที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้เวลาในการบ่มเชื้อประมาณ 7-10 วัน ในขณะที่การหมักในสภาพอาหารเหลวจะใช้เวลาสั้นกว่าโดยใช้เพียง 4-5 วันเท่านั้น ส่วนในการหมักในสภาพอาหารแข็งใช้ระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมเท่ากับ 6-7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. สารกระตุ้น

สารกระตุ้นที่ใช้เพื่อปรับปรุงผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อรา *A.niger* มีหลายชนิด เช่น เมทานอล เอทานอล ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ naphthoquinone methylene blue เป็นต้น

ในบรรดาสารกระตุ้นดังกล่าว เมทานอลเป็นสารกระตุ้นที่ทำให้ผลผลิตของกรดซิตริกจากเชื้อ *A. niger* สูงขึ้นมากกว่าสารกระตุ้นชนิดอื่น ๆ จากการศึกษาของ Chaudhary และคณะ (1978) พบว่าเมทานอลความเข้มข้น 3-4 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยทำให้การเจริญเติบโตและการเกิดสปอร์ (sporulation) และในขณะเดียวกันจะส่งผลทำให้กรดซิตริกถูกสร้างมากขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมทานอลไม่ได้ทำให้เมตาบอลิซึมของเชื้อราเสียหายแต่กลับส่งผลดีต่อคุณสมบัติทางการซึมผ่านของสารเข้า-ออกเมมเบรนของเชื้อราจึงทำให้การปลดปล่อยกรดซิตริกออกมาจากเส้นใยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น

การผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อราดังที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่าถ้าต้องการทำให้การหมักเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นจะต้องคำนึงถึงปัจจัยหลัก 3 ประการคือ สายพันธุ์ของเชื้อรา กระบวนการหมักที่ใช้ รวมถึงสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา นอกจากนี้ในแต่ละปัจจัยก็มีสิ่งที่จำเป็นจะต้องคำนึงถึงอีกหลายประการ ดังนั้นในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรานี้ จึงต้องเลือกใช้กระบวนการหมักและสภาพการหมักที่เหมาะสมต่อเชื้อราสายพันธุ์ที่เลือกใช้เท่านั้น อย่างไรก็ตามในการผลิตกรดซิตริกนี้ นอกจากเชื้อราแล้วยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ยีสต์ และแบคทีเรีย ที่สามารถทำการหมักและให้ประสิทธิภาพการหมักในระดับสูง

8.<u>การใช้ประโยชน์กรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม</u> (คุษณี ,2537)

กรดซิตริกที่ผลิตขึ้นเพื่อเป็นการค้าจะผลิตในรูปปราศจากน้ำหรือในรูปโมโนไฮเดรต ซึ่งการผลิตกรดซิตริกในรูปปราศจากน้ำจะได้จากการตกผลึกของสารละลายกรดที่ร้อน ในขณะที่กรดซิตริกในรูปโมโนไฮเดรตจากการตกผลึกสารละลายที่อุณหภูมิต่ำกว่า 36.5 องศาเซลเซียส ในอุตสาหกรรมและยามีการใช้กรดซิตริกอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นสารที่ละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม มีความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายได้ง่าย ราคาถูก และหาได้ง่าย นอกจากนี้กรดซิตริกยังใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมอื่น ๆ (จิราภรณ์ , 2525) ประโยชน์ของการใช้กรดซิตริกเกลือและเอสเตอร์ของกรดซิตริกมีดังนี้

1.อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม โดยใช้เป็นส่วนผสมในการทำลูกกวาด ลูกอม ผลไม้เชื่อม แยม เยลลี ผักผลไม้ดอง น้ำหวาน น้ำเชื่อม น้ำอัดลม น้ำผลไม้ ไวน์ อาหารแช่ง อาหารกระป๋อง เนยแข็ง ไอศกรีม และอื่นๆ ซึ่งกรดซิตริกมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มกลิ่นรส ควบคุมความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นกรด ลดความฝาด ป้องกันการเปลี่ยนแปลงและกลิ่นของเครื่องดื่มและอาหารเข็ง ป้องกันการขุ่นของไวน์ เป็น emulsifier ในผลิตภัณฑ์นมต่าง ๆ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการเก็บถนอมอาหารอีกด้วย

ข้อกำหนดในการใช้กรดซิตริกเป็นวัตถุเจือปนในอาหาร ซึ่งอนุญาตเจือปนในอาหารบางชนิดเพื่อวัตถุประสงค์และปริมาณต่างกันดังนี้

ก. สำหรับปรับความเป็นกรด-ด่าง โดยการเจือปนกับผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดต่อไปนี้ด้วยปริมาณที่เหมาะสม

- น้ำมะเขือเทศเข้มข้น เพื่อให้มี พีเอช ไม่เกิน 4.3
- แยมและเยลลี่ เพื่อให้มี พีเอช ระหว่าง 2.8-3.5

ข. สำหรับปรุงแต่งกลิ่น รส และป้องกันการรวมตัวเป็นก้อนของน้ำตาล โดยการเจือปนกับผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดต่อไปนี้ด้วยปริมาณ 5,000 พีพีเอ็ม หรือ มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหารทั้งหมด 1 กิโลกรัม หรือใช้ร่วมกับกรด แอล-ตาร์ตาริก หรือใช้ร่วมกับกรดแลกติก ก็ได้ แต่ปริมาณที่ใช้ร่วมกันต้องไม่เกิน 5,000 พีพีเอ็ม

- โกโก้ผง และโกโก้ผงผสมน้ำตาลชนิดแห้ง
- อาหารเสริมสำหรับเด็กชนิดครบถ้วน
- สเตอริไลส์ฟังไจ (sterilized Fungi)

ค. สำหรับป้องกันการรวมตัวเป็นก้อน โดยการเจือปนกับผลิตภัณฑ์อาหารแห้งด้วยปริมาณ 25,000 พีพีเอ็ม ในอาหารเสริมสำหรับเด็กชนิดแป้ง

ง. สำหรับป้องกันการเปลี่ยนสี กลิ่น รส และกันเสีย ของผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกรรมวิธีแคนนิ่งดังต่อไปนี้ ด้วยการใช้เจือปนในปริมาณที่เหมาะสม คือ

- จำพวกเนื้อสัตว์ กุ้ง ปู ปลาแมคเคอเรล (Mackerel)
- จำพวกพืช ผัก ผลไม้ เกรฟฟรุต ข้าวโพด ซอสแอปเปิ้ล ทรอปิคอลฟรุตสลัด (Tropical Fruit Salad) แพร์ (Pear) มะเขือเทศ สตรอเบอรี่ สับปะรด ส้ม เห็ด หน่อไม้ฝรั่ง (Asparagus)

จ. สำหรับป้องกันการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ของผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็งต่อไปนี้ ด้วยการใช้เจือปนในปริมาณที่เหมาะสม คือ

- จำพวกเนื้อสัตว์ กุ้ง
- จำพวก ผลไม้ พีช (Peach) สตรอเบอรี่

ฉ. สำหรับป้องกันการเปลี่ยนสี กลิ่น รส และช่วยเสริมฤทธิ์วัตถุกันหืนของผลิตภัณฑ์อาหารต่อไปนี้ ด้วยการใช้เจือปนในปริมาณที่เหมาะสม คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- บูยองและคอนซูเม่ (Bouillons and Consumme) เนยเทียม ไอศกรีม และอาหารทารก
- น้ำแบลคเคอร์แรนท์ (Black Currant) ผสมน้ำ แตงกวาดอง
- ฟังไจและผลิตภัณฑ์จากฟังไจที่ใช้รับประทานได้ (Edible Fungi and Fungus Products) ยกเว้นสเตอริไลส์ฟังไจ

ช. สำหรับป้องกันการเกิดตะกอนของผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง คือ มะกอกดอง ด้วยการใช้ในปริมาณ 15,000 พีพีเอ็ม

2. อุตสาหกรรมยา ใช้เป็นส่วนผสมในการทำยาบางชนิด เป็นสารทำให้เกิดฟองฟู่เมื่อผสมกับคาร์บอเนตหรือไบคาร์บอเนตโดยใช้ในการเตรียมยาลดกรดหรือแอสไพรินที่ละลายน้ำได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็น stabilizer ในวิตามินซี(ascorbic acid) อีกด้วย การใช้ผสมกับยาจะใช้ในรูปของเกลือหรือเอสเตอร์ของกรดซิตริก

3. อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ใช้เป็นส่วนผสมของครีมนวดผมและโลชั่น โดยจะควบคุมระดับพีเอชของผลิตภัณฑ์ และช่วยเพิ่มความแวววาวและความอ่อนนุ่มของผลิตภัณฑ์ด้วย นอกจากนี้ยังเป็นวัตถุกันเสียอีกด้วย

4. อุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น ใช้ทำความสะอาดโลหะ ล้างสนิมเนื่องจากกรดซิตริกสามารถรวมตัวกับโลหะหนัก เช่น เหล็ก และทองแดงได้เป็นอย่างดี ใช้ผสมกับผงซักฟอกในรูปของไตรโซเดียมซิเตรต (trisodium citrate) แทนการใช้พอลีฟอสเฟตเพื่อช่วยในการทำความสะอาดให้ดีขึ้น ใช้เป็น plasticizer ในแผ่นฟิล์มพลาสติกที่ใช้ห่อหุ้มอาหารในรูปของไตรเอทิล (triethy) ไตรบิวทิว(tributyl) และอะซิติลไตรบิวทิลเอสเตอร์ (acetyltributly ester) เนื่องจากไม่มีความเป็นพิษ ใช้เป็นส่วนผสมของหมึกพิมพ์ น้ำและสี ใช้เป็น softener ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น

นอกจากประโยชน์ต่าง ๆ ที่กล่าวมานี้แล้ว เกลือของกรดซิตริกยังมีประโยชน์ในทางการแพทย์อีกด้วย เช่น เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรต (ferric ammonium citrate) ใช้ในการรักษาโรคโลหิตจาก หรือการใช้ไตรโซเดียมซิเตรต (trisodium citrate) ในการเก็บรักษาเลือด โดยจะป้องกันเลือดไม่ให้เกาะกันเป็นก้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต
   - *Aspergillus niger* TISTR 3089
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ
   2.1 อาหารสูตร potato dextrose agar
   2.2 น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ใช้น้ำส่วนที่ได้จากการบีบเมล็ดโกโก้สด
3. เครื่องมือและอุปกรณ์
   3.1 เครื่องมือพื้นฐานทางชีววิทยา
   3.2 เครื่องกั้นน้ำแบบบีบอัด
   3.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
   3.4 เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
   3.5 เครื่องกรองโดยใช้ความดัน
   3.6 เครื่องย่อย (digestor)
   3.7 เครื่องกลั่น (distillator)
   3.8 เครื่องควบแน่น (condenser)
   3.9 เครื่องระเหย (evaporator)
   3.10 เครื่องเขย่า (shaker)
   3.11 เครื่องอบสารร้อน (hot air oven)
   3.12 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ (autoclave)
   3.13 เดซิคเคเตอร์ (desiccator)
   3.14 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)
4. วิธีการทดลอง
   4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ โดยวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าซีโอดี ไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณโปรตีน ของแข็งแขวนลอย (suspened solid) ของแข็งทั้งหมด (total solid) ตามวิธีของ APHA , AWWA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ WPCF (1985) รวมทั้งน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดซิตริกเริ่มต้น แร่ธาตุบางชนิด เช่น ทองแดง แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม แมงกานีส และสังกะสี (วิเคราะห์ด้วยเครื่อง atomic absorbtion)

4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3089

4.2.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นและหัวเชื้อ

- การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เลี้ยง *A. niger* บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเจริญเต็มที่ จากนั้นนำสารละลายสปอร์ นำมานับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Heamacytometer) ให้มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

- การเตรียมหัวเชื้อ

นำน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ปริมาตร 90 มิลลิลิตรใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.2.2 ศึกษาความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยการเลี้ยง *A.niger* ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 และ 50 (ใช้น้ำกลั่นเจือจาง) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ซึ่งเลี้ยงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ฆ่าเชื้อแล้วเช่นเดียวกัน ฟลาสก์ละ 5 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เพื่อทำการวิเคราะห์หากรดซิตริกโดยวิธีการไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล

4.2.3 ศึกษาแหล่งไนโตรเจน

โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร (ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.212 0.318 0.424 0.53 และ 0.636 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรตามลำดับ) แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร (ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.131 0.21 0.392 0.523 และ 0.654 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรตามลำดับ) และยีสต์สกัดที่ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร (ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.049 0.098 0.147 และ 0.196 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรตามลำดับ) เป็นแหล่งไนโตรเจนเลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 4.2.2

4.2.4 ศึกษาผลของการเร็วรอบของเครื่องเขย่า

ใช้ค่าความเป็นกรด-ด่าง และแหล่งไนโตรเจนที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดไว้ใช้ในการศึกษาโดยปรับความเร็วรอบของเครื่องเขย่าเป็น 100 200 และ 300 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 4.2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปราย

1. ผลการศึกษาและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

ลักษณะของน้ำสกัดที่ได้จะมีสีขาวขุ่น มีความหนืด มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ มีรสเปรี้ยวอมหวานเล็กน้อย เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่า มีค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างเป็นกรด มีปริมาณไนโตรเจน ของแข็งแขวนลอย ของแข็งทั้งหมด และค่าซีโอดีค่อนข้างสูง ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

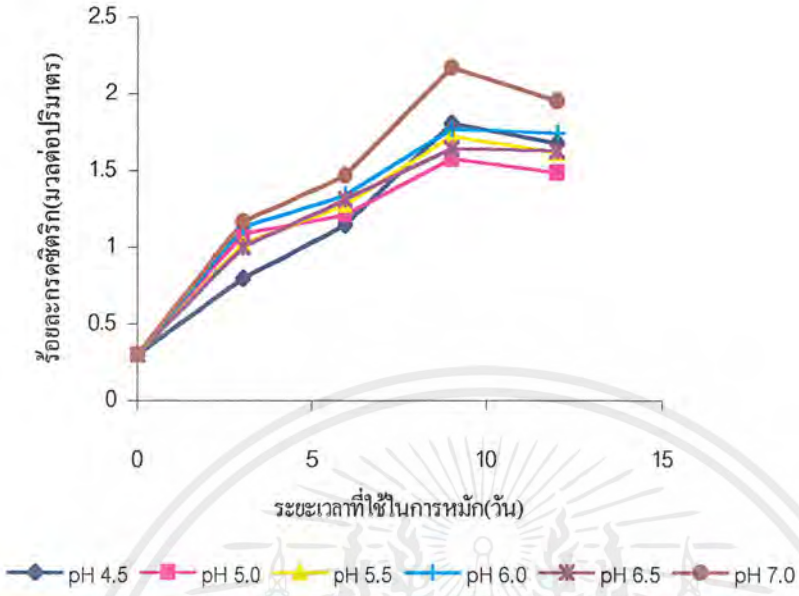
พารามิเตอร์	ความเข้มข้น
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	3.2
ค่าซีโอดี	3.8×10^6 มิลลิกรัมต่อลิตร
ไนโตรเจน	0.168 (ร้อยละ)
โปรตีน	1.05 (ร้อยละ)
ของแข็งทั้งหมด	285.81 มิลลิกรัมต่อลิตร
ของแข็งแขวนลอย	80 มิลลิกรัมต่อลิตร
น้ำตาลรีดิวซ์	1.945 (ร้อยละ)
ปริมาณกรดทั้งหมด	0.969(ร้อยละ)
กรดซิตริกเริ่มต้น	0.749 (ร้อยละ)
แร่ธาตุบางชนิด	
ทองแดง (Cu)	0.075 พีพีเอ็ม
เหล็ก (Fe)	1.032 พีพีเอ็ม
แมกนีเซียม (Mg)	0.138×10^2 พีพีเอ็ม
แคลเซียม (Ca)	0.924×10 พีพีเอ็ม
แมงกานีส (Mn)	0.333 พีพีเอ็ม
สังกะสี (Zn)	0.385 พีพีเอ็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

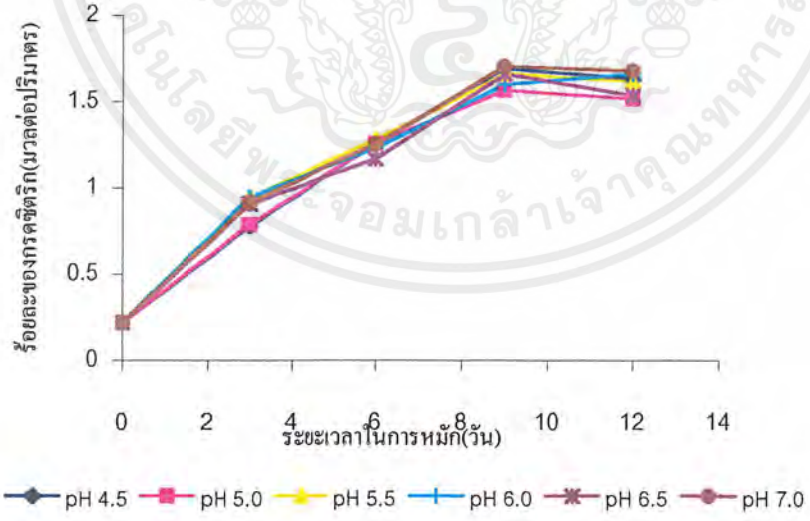
2. การศึกษาความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3089

การศึกษาความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *A. niger* .0TISTR 3089 โดยปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เข้มข้น ร้อยละ 25 และ50 ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ เป็น 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ7.0 โดยทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน พบว่า เชื้อ *A.niger* TISTR 3089 สามารถผลิตกรดซิตริกที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่แตกต่างกัน(ดังแสดงดังรูปที่ 4-1 และตารางภาคผนวกที่ ค-1) พบว่าน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เข้มข้นร้อยละ 50 จะผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดในวันที่ 9 ซึ่งที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 จะผลิตกรดซิตริกได้สูงถึงร้อยละ 2.1760 ในขณะที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 จะผลิตกรดซิตริกสูงสุดได้ร้อยละ 1.8112 1.5808 1.7280 1.7728 และ 1.6448 ตามลำดับ ในช่วงวันที่ 9-12 ซึ่งเป็นช่วงหลังการเลี้ยงเชื้อ พบว่าปริมาณกรดซิตริกจะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เข้มข้นร้อยละ 25 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเช่นเริ่มต้นเดียวกัน พบว่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 จะผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดเช่นเดียวกับที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยผลิตได้ร้อยละ 1.708 ผลิตได้สูงสุดในวันที่ 9 ซึ่งผลที่ได้พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เข้มข้นร้อยละ 25 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่าง ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (แสดงดังภาคผนวก ง-1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่4-1 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่าง ๆ กันที่ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 4-2 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่าง ๆ กันที่ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่าในอาหารที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่ำ ๆ จะผลิตกรดซิตริกได้น้อยเนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่ไม่ผ่านการแปรรูป ถ้าปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่ำ จะทำให้เชื้อรา *A. niger* ถูกยับยั้งด้วยแร่ธาตุบางชนิดที่มีในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ เช่น ทองแดง เหล็ก เป็นต้น ทำให้การผลิตกรดซิตริกลดลง (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

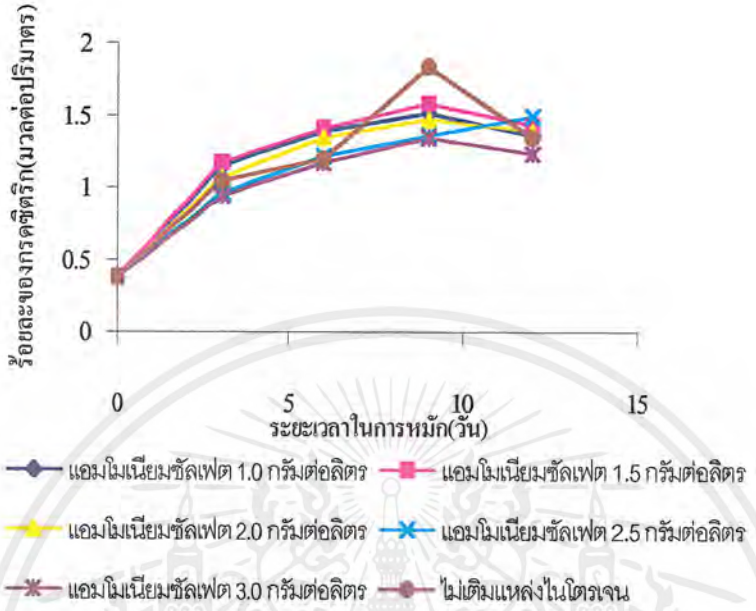
3. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3089

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *A.niger* TISTR 3089 โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 แหล่งไนโตรเจนที่นำมาศึกษา คือ แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร (ปริมาณไนโตรเจน 0.212 0.318 0.424 0.530 และ 0.636 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ) แอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร (ปริมาณไนโตรเจน 0.131 0.261 0.392 0.523 และ 0.654 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ) และยีสต์สกัดเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร (ปริมาณไนโตรเจน 0.049 0.098 0.147 และ 0.196 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ) และทำการเปรียบเทียบผลที่ได้ดังนี้

3.1 แอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า เชื้อ *A. niger* TISTR 3089 จะสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดในวันที่ 9 ซึ่งที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร จะผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดร้อยละ 1.5804 ในขณะที่ความเข้มข้น 1.0 2.0 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร จะผลิตกรดซิตริกได้ร้อยละ 1.5168 1.472 1.3632 และ 1.344 ตามลำดับ ในช่วงวันที่ 9-12 ซึ่งเป็นช่วงหลังของการเลี้ยงเชื้อ พบว่า ปริมาณกรดซิตริกจะลดลง (ดังแสดงในรูปที่ 4-3 และตารางภาคผนวกที่ ค-3) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มโกโก้ที่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจน พบว่าในวันที่ 9 มีการผลิตกรดซิตริกร้อยละ 1.8366 ซึ่งแตกต่างจากปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากน้ำสกัดเยื่อหุ้มโกโก้ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 (แสดงดังตารางในภาคผนวกที่ ง-3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

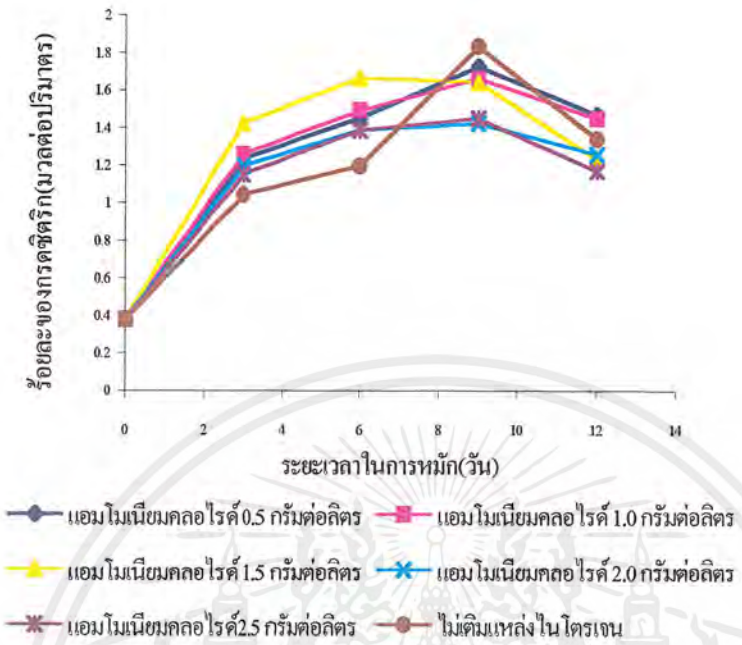


รูปที่ 4-3 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่างกัน โดยใช้ความ เข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มโกโก้ร้อยละ 25 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น 7.0 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

3.2 แอมโมเนียมคลอไรด์

เมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ *A.niger* TISTR 3089 โดยใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 พบว่าจะผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดในวันที่ 9 ซึ่งที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร จะผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดได้ร้อยละ 1.728 ในขณะที่ความเข้มข้น 1.0 1.5 2.0 2.5 กรัมต่อลิตร จะผลิตได้ร้อยละ 1.6640 1.648 1.4272 และ 1.4528 ตามลำดับ ในช่วงวันที่ 9-12 ซึ่งเป็นช่วงหลังการเลี้ยงเชื้อพบว่า ปริมาณกรดซิตริกจะลดลง(ดังแสดงในรูปที่ 4-4 และตารางภาคผนวกที่ ค-4) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากการใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจน พบว่า การผลิตกรดซิตริกจะสูงสุดในวันที่ 9 คือ ร้อยละ 1.8366 ซึ่งไม่แตกต่างจากปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 (แสดงด้วยตารางภาคผนวก ง-4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

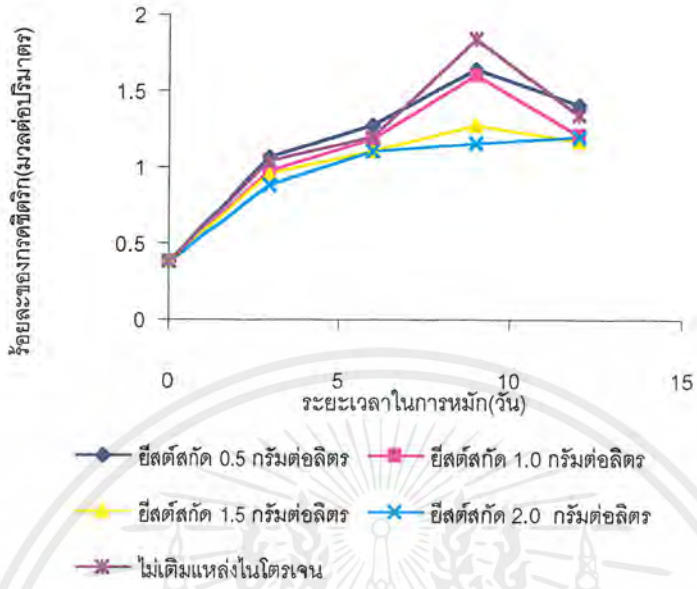


รูปที่ 4-4 แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

3.3 ยีสต์สกัด

เมื่อใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเชื้อรา *A. niger* TISTR 3089 พบว่าการใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร จะผลิตกรดซิตริกสูงสุดได้ร้อยละ 1.650 1.600 1.280 และ 1.152 ตามลำดับในวันที่ 9 (ดังแสดงในรูปที่ 4-5 และตารางภาคผนวกที่ ค-5) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากการใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ไม่ใส่ไนโตรเจน พบว่าการผลิตกรดซิตริกจะสูงสุดในวันที่ 9 คือร้อยละ 1.8362 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากการใช้ยีสต์สกัด 0.5 กรัมต่อลิตร (แสดงดังตารางในภาคผนวก ง-5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



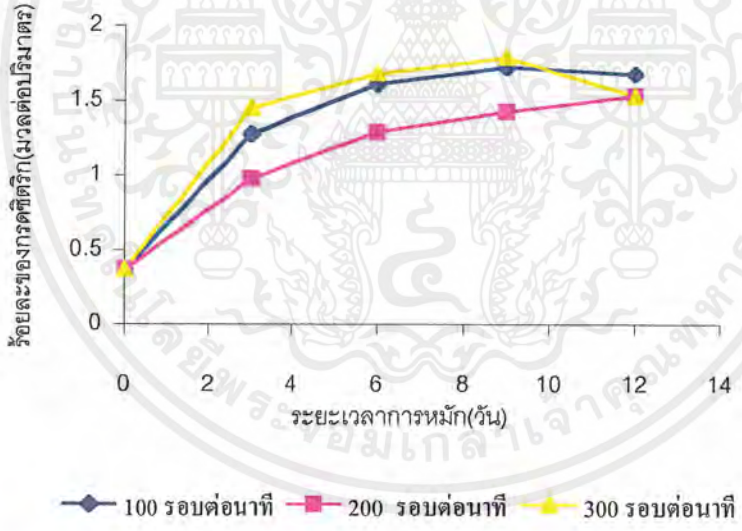
รูปที่ 4-5 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัดต่างกันโดยใช้น้ำสกัดของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และยีสต์สกัดที่มีความเข้มข้นมากขึ้น การผลิตกรดซิตริกจะลดลง เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนจะมีผลต่อการผลิตกรดซิตริกคือถ้าแหล่งไนโตรเจนมากเกินไปจะกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ทำให้ มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้การผลิตกรดซิตริกลดลง แต่ถ้าแหล่งไนโตรเจนน้อยเกินไปก็จะไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต Xu และคณะ (1989) พบว่าแอมโมเนียมไนเตรต หรือแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีในการผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อ *A. niger* แต่จากผลการทดลองพบว่าการใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนจะสามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณที่สูงและไม่แตกต่างทางสถิติกับการเติมแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ดังนั้นจึง เลือกใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 เพื่อศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *A.niger* TISTR 3089

การศึกษาความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 โดยใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ไม่ได้ใส่แหล่งไนโตรเจนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใช้ความเร็วรอบที่ต่าง ๆ กัน คือที่ความเร็วรอบ 100 200 และ 300 รอบต่อนาที โดยเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ควบคุมอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้ความเร็วรอบต่างกันมีผลต่อปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ การใช้ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 9 คือ ร้อยละ 1.728 (ดังแสดงในรูปที่ 4-6 และตารางภาคผนวกที่ ค-6) สำหรับการใช้ความเร็วรอบ 100 และ 200 รอบต่อนาที ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่ผลิตได้ คือ ร้อยละ 1.728 และ 1.536 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้จากการใช้ความเร็วรอบที่ต่างกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (แสดงดังตารางภาคผนวก ง-6)



รูปที่ 4-6 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าต่างกันโดยใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เข้มข้นร้อยละ 25 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0

Usami และคณะ (1960) ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตกรดซิตริกใน *Aspergillus niger* พบว่าการเพิ่มอัตราเร็วของการให้อากาศทำให้ระยะเวลาการหมักลดลงและผลิตกรดซิตริกได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ดังนั้นที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที จึงสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่าลักษณะของเหลวที่สกัดได้จะมีสีเขียวอ่อนนุ่ม หนืดเล็กน้อย มีรสเปรี้ยวอมหวาน มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ น้ำสกัดที่ได้มีความเป็นกรดโดยทำการวัดค่าพีเอชก่อนการหมักพบว่ามีพีเอชประมาณ 3.2 ค่าซีโอดี 3.8 x 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 x 10^2 พีพีเอ็ม แคลเซียม 0.924 x 10 พีพีเอ็ม แมงกานีส 0.333 พีพีเอ็ม และสังกะสี 0.385 พีพีเอ็ม

ในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยใช้เชื้อ *A. niger* TISTR 3089 ซึ่งเป็นเชื้อที่เหมาะสมและเป็นที่นิยมในการผลิตกรดซิตริก จากการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ *A. niger* TISTR 3089 โดยใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 และร้อยละ 50 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ พบว่าน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0 สามารถให้ปริมาณกรดซิตริกสูงกว่าที่ปรับความเป็นกรด-ด่าง เป็น 4.5 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0 ก็ให้ปริมาณกรดซิตริกสูงกว่าที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 4.5 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงเลือกปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 ใช้ในการศึกษาต่อไป ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ใช้พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตและยีสต์สกัด แต่อย่างไรก็ตามปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้เมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจนกับไม่เติมแหล่งไนโตรเจน จะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นจึงเลือกการไม่เติมแหล่งไนโตรเจนมาใช้ในการศึกษาครั้งต่อไป ส่วนผลของความเร็วรอบของเครื่องเขย่าพบว่าความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถให้ปริมาณกรดสูงกว่าที่ความเร็วรอบ 100 และ 200 รอบต่อนาที และเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่ได้จากความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่ผลิตได้จากความเร็วรอบ 100 และ 200 รอบต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ข้อเสนอแนะ

1. ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ในช่วงวันที่ 9-12 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงควรลดระยะเวลาของการหมักให้เหลือเพียง 9 วันเพื่อเป็นการประหยัดเวลาและลดต้นทุนการผลิต
2. ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้เมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนและไม่เติมแหล่งไนโตรเจนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติดังนั้นในการผลิตกรดซิตริกจึงเลือกไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต
3. เนื่องจากในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีโลหะบางชนิดเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรศึกษาถึงผลของโลหะต่อการผลิตกรดซิตริก
4. ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์จึงสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ เช่น ไวน์ แอลกอฮอล์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. กำเนิด สุภัณวงษ์. (2534) .จุลชีวอุตสาหกรรม.ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
2. จิระนันท์ เหมพูลเสริฐ. (2533) .การนำวัสดุเหลือทิ้งและวัตถุดิบราคาถูกบางชนิดมาผลิตเป็นกรด มะนาวโดยใช้เชื้อ *Candida lipolytica*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยมหิดล.
3. จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒนะ. (2525) .การผลิตกรดซิตริกจากกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
4. ชัยวัฒน์ บรรใดเพ็ชร. (2536) .การผลิตกรดมะนาวโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
5. ดุษณี ธนะบริพัฒน์. (2537) .จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
6. เทวี โพธิผละ. (2536) .การใช้วัตถุเจือปนในอาหาร. โครงการส่งเสริมการแต่งตำรา. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.
7. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กรุงเทพฯ. (2526) . มาตรฐานอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริก.(มอก.464-2526)
8. อรพิน ภูมิภมร. (2526) .ระบบชีวภาพที่สำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพ เล่ม 1.ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
9. อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. (2529) . กรดซิตริก. วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรม และวิทยาศาสตร์. 5(3) : 405-423.
10. A.O.A.C. (1984) .Official method of analysis of the association of analytical chemist .14th ed.Association of official analytical chemist, USA.
11. A.O.A.C. (1990) .Official method of analysis of the association of analytical chemist .14th ed.Association of official analytical chemist, USA.
12. APHA,AWWA and WEF. (1992) . Standard method for the examination of water and waste water .18th ed.American public health association,Inc.,New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

15. 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*. International Journal of Food Microbiology.29(2/3):411-416.

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

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

18. 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.

19. 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.

20. 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.

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

22. 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

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

Potato Dextose Agar (PDA)

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

1. ต้มมันฝรั่งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
2. กรองเอาน้ำใส เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร
3. เติมกลูโคสและ agar แล้วต้มให้ละลาย
4. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

<u>การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Luff – Schoorl method</u>

● สารเคมี ●

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

● การเตรียมสารละลาย Carrez I ●

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

● การเตรียมสารละลาย Carrez II ●

เตรียมโดยทำการละลาย potassium ferrocyanide trihydrate ปริมาณ 10.6 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

● การเตรียม Luff-Schoorl Reagent ●

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

3. ปรับปริมาตรของผสมภายในขวด และผสมให้เข้ากัน

4. ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน แล้วกรองเอาตะกอนที่เกิดขึ้นออก

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

● วิธีการทำ Standardize สารLuff-Schoorl Reagent ●

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

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

3. ใช้ reagent 10 มิลลิลิตร มาทำให้เจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร

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

5. นำไปวางบนอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. ทำให้เย็นลง และปรับปริมาตรให้เท่าเดิมด้วยน้ำกลั่น

7. ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยมีฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 5.5 – 6.5 มิลลิลิตร

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

9. ค่าพีเอชของสาร reagent ควรประมาณ 9.3 – 9.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

● วิธีการวิเคราะห์ ●

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (ประมาณ 15-20 กรัม) ใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำร้อนลงไป 150 มิลลิลิตร ทำการเขย่า เพื่อสกัดสารที่ละลายน้ำออกมา

3. ทำสารละลายให้ใสด้วยการเติมสารละลาย Carrez I ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วตามด้วย การเติมสารละลาย Carrez II อีก 5 มิลลิลิตร

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

5. นำส่วนของเหลวที่ได้มาเจือจางจนกระทั่งตัวอย่างสารละลายที่เจือจาง 25 มิลลิลิตรนั้น มีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์อยู่ 15-60 มิลลิลิตร

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

7. เติมสารละลายที่เจือจางไว้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไป

8. ใส่เม็ดแก้วกันกระแทกลงไปในขวดแก้วรูปชมพู่ 2-3 อัน

9. ทำการ reflux โดยปรับอุณหภูมิให้สารละลายเดือด เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วลดอุณหภูมิ ของการ reflux ลงไป ปล่อยทิ้งไว้ให้เดือดเบาๆ อีก 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที

10. เติมสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ (30% w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติม ด้วย 25 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 โมลาร์ อาจเติม isopentanol ลง ไป 2-3 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟอง

11. เมื่อไม่มีฟองเกิดขึ้นแล้ว นำไปไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายไม่มีสี จึงเติมน้ำแป้ง (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรต่อน้ำ หนัก) ลงไป 2-3 มิลลิลิตร แล้วไตเตรตต่อจนกระทั่งสารละลายไม่มีสี ปริมาตรที่ได้เท่ากับ x มิลลิลิตร

12. ไตเตรตสารละลาย blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง และปฏิบัติเช่นเดียว กับสารละลายตัวอย่าง ปริมาตรที่ได้เท่ากับ y มิลลิลิตร

13. เมื่อนำปริมาตร y-x จะเป็นปริมาตรของ copper ที่ถูกรีดิวส์ด้วยน้ำตาลในสารตัวอย่าง ซึ่งสามารถเปิดเทียบค่าได้จากตารางภาคผนวก

14. คำนณค่าร้อยละของน้ำตาลกลูโคส (ในรูปน้ำตาลอินเวิร์ท)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การหาปริมาณกรดทั้งหมด

● สารเคมี ●

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
- ฟีนอฟทาลีน

● วิธีการวิเคราะห์ ●

1. นำตัวอย่างเยื่อหุ้มหรือเมล็ดโกโก้ 5 กรัม เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร
2. ผสมให้เข้ากันโดยการปั่นผสมด้วยเครื่องปั่น เป็นเวลา 5 นาที อาจต้องกรองเอาตะกอนออก หากมีตะกอนมาก
3. ไตเตรตสารละลายกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล หาจุดยุติ มีฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์
4. คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก จากสูตร

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

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (โดยวิธีกรดบอริก)

● สารเคมี ●

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4,000 กรัม ในน้ำกลั่น 10 ลิตร

- กรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 ผสมกับบรอมครีซอล กรีน และ เมทิลเรด

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

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

มิลลิลิตร ของ 1.0 โมลาร์ Alkaoi = มิลลิลิตรของการไตเตรต × 40

เติมปริมาณที่คำนวณได้ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ลงในสารละลายกรดบอริก ผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- กรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล

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

- Na_2CO_3 0.2 นอร์มอล

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

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

คำนวณ

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

- การทำ Standardize กรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล (เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอน)

1. ปิเปต สารละลาย Na_2CO_3 ที่เตรียมไว้ 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร
2. หยด เมทิล ออเรนจ์ 2 หยดเพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ จะได้สารละลายสีเหลือง
3. ใส่กรดไฮโดรคลอริกที่ต้องการทราบความเข้มข้นในบิวเรต
4. นำ สารละลาย Na_2CO_3 ที่อยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่มาไตรเตรตกับ กรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอลจนถึงจุดยุติ สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีจำปา จดปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้
5. นำไปให้ความร้อน จนเดือดน้อยๆ เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเหลือง ให้ทิ้งไว้จนเย็นแล้วนำมาไตเตรตต่อจนถึงจุดยุติอีก
6. นำปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ได้ไตเตรดได้มารวมกัน
7. ทำซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณ

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

● วิธีวิเคราะห์●

1. ชั่งตัวอย่าง 0.9 – 1.0 กรัม ใส่ลงในกระดาษกรองแล้วใส่ลงใน digestion tube
2. ใส่ K_2SO_4 3.9 กรัม และ $CuSO_4 . 5H_2O$ 0.4 กรัม
3. เติมกรดซิลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตรเขย่าเบาๆ
4. นำ digestion tube วางลงในเครื่องย่อย ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 องศาเซลเซียส แล้วเปิดเครื่องดูดควัน
5. ย่อยเป็นเวลา 50 นาที จนได้สารละลายใสสีเขียวหรือสีฟ้า นำออกจากเครื่องย่อย ตั้งทิ้งไว้ในเครื่องดูดควัน เพื่อให้หมดควัน เติมน้ำลงใน digestion tube พอประมาณ แล้วนำไปเข้าเครื่องกลั่น
6. เปิดก๊อกน้ำเพื่อหล่อเย็นเครื่องควบแน่นและเปิด power ของเครื่องกลั่น (Kjeltec)
7. กดปุ่ม Alkali = 2-3 จนแน่ใจว่าในท่อต่างๆม่มีฟองอากาศหลงเหลืออยู่
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 จุ่มลงในสารละลาย ปิด Safty door เครื่องจะทำงานโดยมีน้ำกลั่นลงมาเจือจางสารตัวอย่าง แล้วตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้น steam จะทำงาน
12. เมื่อกลั่นจนเสร็จแล้วนำขวดแก้วรูปชมพู่และ digestion tube ออกจากเครื่องกลั่นแล้วทำการกลั่นตัวอย่างใหม่ต่อไป
13. นำขวดแก้วรูปชมพู่ ซึ่งมี distillate เป็นสารละลายสีเขียวไปไตเตรตกับกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณ

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

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

4. สารแขวนลอย (Suspended Solid)

● อุปกรณ์●

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

● วิธีวิเคราะห์●

1. อบกระดาษกรองใยแก้วในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 –105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง
2. เลือกปริมาตรน้ำตัวอย่างที่จะให้ค่าสารแขวนลอยอย่างน้อยสุดประมาณ 2.5 มิลลิกรัม (ไม่รวมน้ำหนักกระดาษกรองใยแก้ว)
3. วางกระดาษกรองลงในกรวยที่ต่อเข้ากับเครื่องดูดอากาศ
4. ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษกรองให้เปียกเพื่อให้ติดแน่นกับกรวย
5. เทตัวอย่างน้ำปริมาตรตามต้องการผ่านกระดาษกรองโดยอาศัยแรงดูดจากเครื่องดูดอากาศ
6. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างของแข็งที่ตกค้างอยู่ข้างกรวยกรองจนหมอ รอจนเครื่องดูดน้ำหมด
7. ปิดเครื่องดูดอากาศ ใช้ปากคีบจับกระดาษกรองใส่ภาชนะทนไฟ นำไปอบในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 –105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือจนกระดาษแห้ง
8. ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในเดซิกเคเตอร์ แล้วชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองที่เพิ่มขึ้น

คำนวณ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ของแข็งทั้งหมด (Total Solids)

● อุปกรณ์●

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

● วิธีวิเคราะห์●

1. นำจานระเหยไปอบให้แห้งและมีน้ำหนักคงที่ในตู้อบ อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์แล้วชั่งหาน้ำหนักของจานระเหย

2. เลือกใช้ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่เหมาะสม (50.0-100.0 มิลลิลิตร)

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

4. ชั่งหาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือน้ำหนักของของแข็งทั้งหมด

คำนวณ

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

6. COD(Chemical Oxygen Demand)

● อุปกรณ์●

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

● สารเคมี●

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 5.5 กรัม ต่อกรดซัลฟิริกเข้มข้น 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 องศาเซียส 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 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำมาไตเตรตด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้เฟอโรอินเป็นอินดิเคเตอร์ (2-3 หยด)

คำนวณ

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

4. สารละลายเฟอโรอินอินดิเคเตอร์

5. เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดผง ใช้กำจัดหมู่คลอไรด์

6. กรดซัลฟามิกชนิด เออาร์ (Sulfamic acid) ใช้กำจัดไนไตรท์

● วิธีวิเคราะห์●

1. ชั่งเมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) 0.4 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม

2. เติมตัวอย่างน้ำที่ต้องการวิเคราะห์ 20.0 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างน้ำที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10.0 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่มีซิลเวอร์ซัลเฟตเจือปนอยู่ลงไป 30.0 มิลลิลิตร

4. เขย่าสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันดี นำขวดต่อเข้ากับเครื่องควบแน่น กลั่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ล้างเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่นก่อนที่จะถอดเครื่องควบแน่นออกจากขวดแก้วก้นกลม

5. เติมน้ำกลั่นลงในขวดก้นกลมจนปริมาตรประมาณ 140-150 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ไตเตรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เหลือด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอทโมเนียมซัลเฟตโดยใช้เฟอโรอินอินดิเตอร์ (2-3 หยด) จนกระทั่งสีของส่วนผสมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง แสดงว่าถึงจุดยุติ

7. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ และดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทุกประการ

คำนวณ

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

เมื่อ A = มิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้กับ blank

B = มิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้กับตัวอย่างน้ำ

C = โมลาริตีของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ค-1 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)					
	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0
0	0.3020	0.3020	0.3020	0.3020	0.3020	0.3020
3	0.8000	1.0880	1.0240	1.1328	1.0048	1.1712
6	1.1520	1.2160	1.2800	1.3440	1.3184	1.4720
9	1.8112	1.5808	1.7280	1.7728	1.6448	2.1760
12	1.6832	1.4912	1.6192	1.7472	1.6320	1.9584

ตารางภาคผนวกที่ ค-2 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)					
	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0
0	0.2180	0.2180	0.2180	0.2180	0.218	0.2180
3	0.7800	0.7870	0.9400	0.9470	0.9088	0.9150
6	1.2600	1.2600	1.2800	1.2350	1.1712	1.2540
9	1.6960	1.5680	1.6640	1.6000	1.6640	1.7088
12	1.6320	1.5168	1.6190	1.6640	1.5360	1.6830

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-3 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)					
	$(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g/l	$(NH_4)_2SO_4$ 1.5g/l	$(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g/l	$(NH_4)_2SO_4$ 2.5 g/l	$(NH_4)_2SO_4$ 3.0 g/l	ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน
0	0.3810	0.3810	0.3810	0.3810	0.3810	0.3810
3	1.1520	1.1712	1.0688	0.9600	0.9408	1.0432
6	1.3880	1.4080	1.3440	1.2160	1.1712	1.1968
9	1.5168	1.5808	1.4720	1.3632	1.3440	1.8366
12	1.3632	1.4272	1.3888	1.4912	1.2352	1.3440

ตารางภาคผนวกที่ ค-4 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)					
	NH_4Cl 0.5 g/l	NH_4Cl 1.0 g/l	NH_4Cl 1.5 g/l	NH_4Cl 2.0 g/l	NH_4Cl 2.5 g/l	ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน
0	0.3810	0.3810	0.3810	0.3810	0.3810	0.3810
3	1.2352	1.2608	1.4272	1.1968	1.1520	1.0432
6	1.4528	1.4912	1.6640	1.3880	1.3880	1.1968
9	1.7280	1.6640	1.6448	1.4272	1.4528	1.8368
12	1.4720	1.4428	1.2352	1.2608	1.1712	1.3440

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-5 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของยีตส์สกัดต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)				
	ยีตส์สกัด 0.5 g/l	ยีตส์สกัด 1.0 g/l	ยีตส์สกัด 1.5 g/l	ยีตส์สกัด 2.0g/l	ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน
0	0.3810	0.3810	0.3810	0.3810	0.3810
3	1.0688	0.9728	0.9600	0.8768	1.0432
6	1.2800	1.1840	1.1008	1.1070	1.1968
9	1.6500	1.6000	1.2800	1.1520	1.8368
12	1.4080	1.2160	1.1730	1.0948	1.3440

ตารางภาคผนวกที่ ค-6 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความความเร็วรอบของเครื่องเขย่าต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)		
	100 รอบต่อนาที	200 รอบต่อนาที	300 รอบต่อนาที
0	0.3700	0.3700	0.3700
3	1.2800	0.9790	1.4530
6	1.6130	1.2930	1.6830
9	1.7280	1.4270	1.7920
12	1.6830	1.5360	1.5360

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตารางแสดงผลทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)					
	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0
0	0.3020g	0.3020g	0.3020g	0.3020g	0.3020g	0.3020g
3	0.8000i	1.0880h	1.0240h	1.1328fh	1.0048hi	1.1712fh
6	1.1520fh	1.2160fh	1.2800efh	1.3440ef	1.3184ef	1.4720cd
9	1.8112bc	1.5808cd	1.7280bc	1.7728bc	1.6448cd	2.1760a
12	1.6832cd	1.4912de	1.6192cd	1.7472bc	1.6320cd	1.9584ab

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ง-2 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)					
	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0
0	0.2180h	0.2180h	0.2180h	0.2180h	0.218h	0.2180h
3	0.7800f	0.7870f	0.9400e	0.9470e	0.9088ef	0.9150ef
6	1.2600d	1.2600d	1.2800d	1.2350d	1.1712d	1.2540d
9	1.6960a	1.5680abc	1.6640abc	1.6000abc	1.6640abc	1.7088a
12	1.6320abc	1.5168c	1.6190abc	1.6640abc	1.5360bc	1.6830ab

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ง-3 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)					
	$(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g/l	$(NH_4)_2SO_4$ 1.5g/l	$(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g/l	$(NH_4)_2SO_4$ 2.5 g/l	$(NH_4)_2SO_4$ 3.0 g/l	ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน
0	0.3810g	0.3810g	0.3810g	0.3810g	0.3810g	0.3810g
3	1.1520ef	1.1712f	1.0688ef	0.9600e	0.9408f	1.0432ef
6	1.3880acd	1.4080ed	1.3440cd	1.2160bcd	1.1712e	1.1968de
9	1.5168bc	1.5808bcd	1.4720bc	1.3632b	1.3440cd	1.8366a
12	1.3632bcd	1.4272bc	1.3888bcd	1.4912bcd	1.2352ed	1.3440cd

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ง-4 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)					
	NH_4Cl 0.5 g/l	NH_4Cl 1.0 g/l	NH_4Cl 1.5 g/l	NH_4Cl 2.0 g/l	NH_4Cl 2.5 g/l	ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน
0	0.3810g	0.3810g	0.3810g	0.3810g	0.3810g	0.3810g
3	1.2352def	1.2608def	1.4272cde	1.1968ef	1.1520f	1.0432f
6	1.4528cde	1.4912abc	1.6640abc	1.3880cde	1.3880cde	1.1968fe
9	1.7280ab	1.6640abc	1.6448abc	1.4272cde	1.4528cde	1.8368a
12	1.4720bcd	1.4428cde	1.2352edf	1.2608def	1.1712f	1.3440def

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ง-5 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของยีตส์สกัดต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)				
	ยีตส์สกัด 0.5 g/l	ยีตส์สกัด 1.0 g/l	ยีตส์สกัด 1.5 g/l	ยีตส์สกัด 2.0g/l	ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน
0	0.3810k	0.3810k	0.3810k	0.3810k	0.3810k
3	1.0688gh	0.9728hi	0.9600hi	0.8768i	1.0432gh
6	1.2800cde	1.1840efg	1.1008fgh	1.1070fgh	1.1968def
9	1.6500ab	1.6000b	1.2800cde	1.1520efg	1.8368a
12	1.4080c	1.2160def	1.1730def	1.0948fgh	1.3440cd

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ง-6 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ที่ความความเร็วรอบของเครื่องเขย่าต่างกันใช้ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0

วันที่	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)		
	100 รอบต่อนาที	200 รอบต่อนาที	300 รอบต่อนาที
0	0.3700f	0.3700f	0.3700f
3	1.2800d	0.9790e	1.4530cd
6	1.6130abc	1.2930d	1.6830ab
9	1.7280ab	1.4270cd	1.7920a
12	1.6830abc	1.5360bc	1.5360bc

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้