

ผลของแร่ธาตุต่อการหมักกรดซิตริกจากน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้
โดยเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3089



นาย ปฤษฎาภรณ์ ชินวุฒิ
นางสาว ปิยะนุช วิวัฒน์ศรีไพบุลย์

เลขที่.....
เลขทะเบียน..... 43978
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

b.....
i.....

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of Trace Element on Citric Acid Fermentation from Cocoa Pulp

Extract by *Aspergillus niger* TISTR 3089



Mr. Prissadang Chinawoot

Miss Piyanuch Wiwatsripaiboon

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

2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

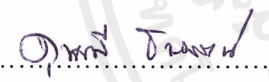
หัวข้อโครงการพิเศษ ผลของแร่ธาตุต่อการหมักกรดซิตริกจากน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ด
โกโก้โดยเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3089
นักศึกษา นายปฤษฎางค์ ชินวุฒิ
นางสาวปิยะนุช วิวัฒน์ศรีไพบูลย์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา 2544

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ
ทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นำโครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์บัณฑิต

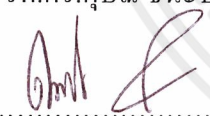

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ रणอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการโครงการพิเศษ


(รศ.ดร.คุณณี รัตนพัฒน์)

ประธานกรรมการ


(ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล)

กรรมการ


(อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์)

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ผลของแร่ธาตุต่อการหมักกรดซิตริกจากน้ำสกัดเชื้อเห็ดเมล็ดโกโก้โดยเชื้อ <i>Aspergillus niger</i> TISTR 3089
นักศึกษา	นายปฤษฎางค์ ชินวุฒิ นางสาวปิยะนุช วิวัฒน์ศรีไพบูลย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

การผลิตกรดซิตริกในสภาวะที่มีการเติมแร่ธาตุโดยใช้ น้ำสกัดเชื้อเห็ดเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยใช้ *Aspergillus niger* TISTR 3089 ที่สภาวะการเลี้ยงแบบขวดเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แร่ธาตุที่ใช้ได้แก่ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ KH_2PO_4 ในรูปของแมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) และฟอสเฟตไอออน (PO_4^{2-}) พบว่า $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ที่มีความเข้มข้นของแมงกานีสไอออน เป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดซิตริก และให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด 1.844 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการหมัก และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้ แมงกานีสไอออน เข้มข้น 0 50 75 125 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลของการเติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ พบว่า ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีปริมาณกรดซิตริกสูงสุด 2.16 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการหมัก และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้ แมกนีเซียมไอออนความเข้มข้นที่ 0 1,000 3,000 4,000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลของการเติม KH_2PO_4 พบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตไอออน (PO_4^{2-}) 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีปริมาณกรดซิตริกสูงสุด 2.2154 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการหมัก และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้ แมกนีเซียมไอออนความเข้มข้นที่ 0 2,000 4,000 6,000 และ 8,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

Special Project Title Effect of Trace Element on Citric Acid Fermentation from Cocoa Pulp Extract by *Aspergillus niger* TISTR 3089

Name Mr.Prissadang Chinawoot
Miss Piyanuch Wiwatsripaiboon

Special Project Advisor Asst.Prof.Duangjai Ochaikul

Department Applied Biology

Academic year 2001

ABSTRACT

Citric acid fermentation by *Aspergillus niger* TISTR 3089 has been studied in shake culture using 25% cocoa pulp extract and trace element as a substrate with incubation temperature of 30°C and shaking speed at 200 rpm. Manganese sulphate($MnSO_4 \cdot H_2O$), magnesium sulphate($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) and potassium dihydrogen phosphate(KH_2PO_4) were used as trace elements in this study. The addition 100 mg/l of Mn^{2+} in the medium gave the highest citric acid on day 9 (1.8441 g/l) and there was non significant difference from the addition of Mn^{2+} at 0 50, 75, 125 and 150 mg/l . The addition 2000 mg/l of Mg^{2+} in the medium gave the highest citric acid on day 9 (2.16 g/l) and there was significant difference from the addition of Mg^{2+} at 0 1,000 3,000 4,000 5,000 mg/l When 10,000 mg/l of PO_4^{2-} was added into the medium, the highest citric acid on day 9 (2.2154 g/l) and there was non significant difference from the addition of PO_4^{2-} at 0 2,000 4,000 6,000 and 8000 mg/l

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิตและสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้นคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณท่าน ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล ที่ให้คำปรึกษา แนวทางการปฏิบัติและข้อเสนอแนะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงการนี้ รวมทั้งยังช่วยตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการทำให้โครงการชิ้นนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณท่าน รศ.ดร. คุษณี ฐนะบริวัฒน์ ประธานกรรมการ และ อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษเล่มนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยให้กำลังใจในการทำโครงการพิเศษเสมอมา ขอขอบคุณ พี่ ๆ เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน พี่ปริญาโท เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคน ที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงการพิเศษชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1. วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
2. ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	
1. โทโก้	3
2. กรดซิตริกและคุณลักษณะของกรดซิตริก	3
3. ลักษณะของเชื้อ <i>Aspergillus niger</i> ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก	7
4. ชีวิตเคมีของการผลิตกรดซิตริก	8
5. การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม	11
6. การแยกกรดซิตริก	13
7. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก	15
8. การใช้ประโยชน์จากกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม	23
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	27
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ	27
3. เครื่องมือและอุปกรณ์	27
4. วิธีการทดลอง	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย	
1. ผลการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของ น้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้	30
2. ผลของแร่ธาตุบางชนิดที่มีต่อการผลิตกรดซิทริก	30
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	45



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2-1	องค์ประกอบของเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้	3
2-2	แสดงความสามารถในการละลายน้ำของกรดซิตริก	6
2-3	แสดงคุณลักษณะทางเคมีของกรดซิตริก	6
2-4	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i>	16
2-5	องค์ประกอบของกากน้ำตาล	17
2-6	ผลของเกลือฟอสเฟตต่อการสร้างกรดซิตริกของ <i>Aspergillus niger</i> ระยะเวลาในการหมัก 11 วัน	18
2-7	ผลของแมกนีเซียมที่มีผลต่อการใช้น้ำตาลและการสร้างกรดซิตริก ของ <i>Aspergillus niger</i> น้ำตาลเข้มข้น 130 กรัมต่อลิตร ระยะเวลา ในการหมัก 13 วัน	19
4-1	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้	30

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2-1	ผลโกโก้	4
2-2	เมล็ดโกโก้	4
2-3	โครงสร้างทางเคมีของกรดซิตริก	5
2-4	ลักษณะของ <i>Aspergillus niger</i> เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์	7
2-5	การเจริญของเส้นใยที่รวมตัวกันเป็น pellet	9
2-6	วิธีการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดซิตริกโดยผ่านวิถีการ glycolytic และ TCA	10
2-7	วิธีเมตาบอลิซึมการสังเคราะห์กรดซิตริก	11
2-8	ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก	14
2-9	กระบวนการกำจัดของเหลือทิ้งมีพิษโดยใช้กรดซิตริก	25
4-1	ปริมาณกรดซิตริกที่ความเข้มข้นของแมงกานีสไอออนแตกต่างกัน	32
4-2	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ความเข้มข้นของแมงกานีสไอออนแตกต่างกัน	32
4-3	ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่ความเข้มข้นของแมงกานีสไอออนแตกต่างกัน	33
4-4	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักที่ความเข้มข้นของแมงกานีสไอออนแตกต่างกัน	33
4-5	ปริมาณกรดซิตริกที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนแตกต่างกัน	35
4-6	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนแตกต่างกัน	35
4-7	ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนแตกต่างกัน	36
4-8	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนแตกต่างกัน	36
4-9	ปริมาณกรดซิตริกที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตไอออนแตกต่างกัน	38
4-10	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตไอออนแตกต่างกัน	38
4-11	ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตไอออนแตกต่างกัน	39
4-12	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตไอออนแตกต่างกัน	39

บทที่ 1

บทนำ

กรดซิตริกถูกใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง เครื่องดื่ม และอุตสาหกรรมอื่นๆ (Kapoor et al.,1982 ; Potvin et al.,1988 ; Kautola et al.,1992) จากความต้องการกรดซิตริกทั่วโลกทั้งหมด พบว่ากรดซิตริกได้มาจากกระบวนการหมักในอาหารเหลวโดย *Aspergillus niger* (Zehentgruber et al.,1985 ; Kubicek and Rohr,1986 ; Grewal and Kalra,1995) มีแหล่งคาร์บอนจำนวนมากถูกใช้เพื่อผลิตกรดซิตริก ในทางการค้ากรดซิตริกผลิตได้จาก กากน้ำตาล ซูโครส หรือกลูโคสไซรัป โดยใช้ *Aspergillus niger* (Meers and Milson,1987) กากน้ำตาลจากอ้อยเป็นที่ต้องการสำหรับกระบวนการหมักของกรดซิตริก เพราะจะให้ประโยชน์ทางการค้าอย่างมาก เมื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดซิตริก(Panda et.al., 1984 ; Bruchmann et al.,1986) มีการใช้ *Aspergillus niger* ในทางการค้าเพื่อผลิตกรดซิตริกเป็นเวลา 50 ปีมาแล้ว ความซับซ้อนของกระบวนการผลิตและการผลิตนั้นขึ้นอยู่กับสถานะของสารอาหารต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริกทำให้ได้รับความสนใจอย่างมากในการศึกษาค้นคว้าทางชีวเคมี(Rohr et al.,1992) ถึงแม้ว่าการผลิตกรดซิตริกส่วนมากนิยมใช้ *Aspergillus niger* ที่ได้รับการกลายพันธุ์ ซึ่งให้ผลผลิตสูงโดยเลี้ยงในอาหารเหลวแต่ยังคงมีความสนใจในการออกแบบกระบวนการผลิตที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตและทำให้มูลค่าการประกอบการทั้งหมดต่ำที่สุด

ในประเทศไทย กรดซิตริกเริ่มมีการผลิตตั้งแต่ปี พ.ศ. 2522 แต่ปริมาณการผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นอีกมากในอนาคต เนื่องจากการขยายตัวของอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่ม การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมนิยมผลิตจากกระบวนการหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยใช้วัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาล วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร กากน้ำตาล น้ำเชื่อม และเมล็ดธัญพืช เป็นต้น (Andrew,1952)

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม จึงมีวัสดุเหลือทิ้งชนิดที่สามารถนำมาผลิตกรดซิตริกได้ เนื่องจากน้ำสกัดเชื้อหมักเมล็ดโกโก้มีน้ำตาลร้อยละ 10-15 และกรดซิตริกร้อยละ 1.5 (Dittmar , 1956) แร่ธาตุมีผลต่อกระบวนการหมักกรดซิตริกโดยใช้ *Aspergillus niger* โดยเฉพาะ Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} และ Mn^{2+} (Noguchi and Johnson , 1961 ; Millis et.al., 1963 ; Clack , 1966) ถ้าแร่ธาตุเหล่านี้มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะไปยับยั้งการผลิตกรดซิตริกได้ โครงการนี้จึง

ได้สนใจที่จะศึกษาผลของแร่ธาตุ ที่มีต่อการผลิตกรดซิตริก โดยเชื้อ *Aspergillus niger* และ ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแร่ธาตุต่างๆ

การศึกษานี้ได้เป็นการพัฒนาวิธีการผลิตกรดซิตริกในอาหารเหลวซึ่งเป็นวิธีการที่มี ประสิทธิภาพสูง โดยใช้น้ำสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เป็นวัตถุดิบ ซึ่งโกโก้เป็นพืชเศรษฐกิจที่ ปลูกมากในจังหวัดแถบภาคใต้ จึงสามารถนำน้ำสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มาเป็นวัตถุดิบ ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อผลิตกรดซิตริกได้ ซึ่งการใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มาผลิตเป็น กรดซิตริกนั้นถือว่าเป็นการนำเอาวัสดุเหลือใช้ในทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางหนึ่ง วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ด โกโก้ เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณไนโตรเจน โปรตีน ของแข็งแขวนลอย ของแข็งทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคส ปริมาณกรดซิตริกเริ่มต้น รวมทั้งแร่ธาตุบางชนิด เช่น Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} และ PO_4

2. ศึกษาผลของแร่ธาตุที่มีต่อการเจริญและการผลิตกรดซิตริกของจุลินทรีย์ เช่น Mn^{2+} , Mg^{2+} และ PO_4

3. นำผลจากการศึกษานี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่อไป ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาผลของแร่ธาตุที่มีต่อการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ด โกโก้ โดยเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3089

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้
2. เป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์
3. ลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม

บทที่ 2

บทตรวจเอกสาร

1. โกโก้

โกโก้เป็นพืชที่นิยมปลูกกันมากในแถบจังหวัดภาคใต้ เกษตรกรผู้ปลูกมักนิยมจำหน่ายในรูปเมล็ดแห้ง ส่วนใหญ่ผลโกโก้อยู่บนก้านดอก ซึ่งผลโกโก้เจริญมาจากก้านดอก ผิวของเมล็ดโกโก้มีลักษณะเป็นตุ่มขรุขระ เป็นร่องๆ (รูปที่ 2-1) ภายในผลโกโก้ที่เจริญเต็มที่ประกอบไปด้วยเมล็ด และมีเยื่อหุ้มเมล็ดที่เป็นเมือกเหนียว ล้อมรอบเมล็ดอีกชั้นหนึ่ง(รูปที่ 2-2) เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีแตกต่างกัน เช่น ขาว ชมพู ขึ้นอยู่กับพันธุ์ของโกโก้ (Wood และ Lass , 1985) ในกระบวนการหมักเมล็ดโกโก้ ส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นส่วนสำคัญในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น แอลกอฮอล์ และ กรดซิตริก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารเหล่านี้มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ ระหว่างการหมักมีการสูญเสียเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ประมาณร้อยละ 5-7 โดยสลายกลายเป็นของเหลวออกไปจากกองหมัก เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10-15 เพคตินร้อยละ 1 และ กรดซิตริกร้อยละ 1.5 (Dittmar, 1956) ดังแสดงในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเมล็ด โกโก้

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

ที่มา : Dittmar(1956)

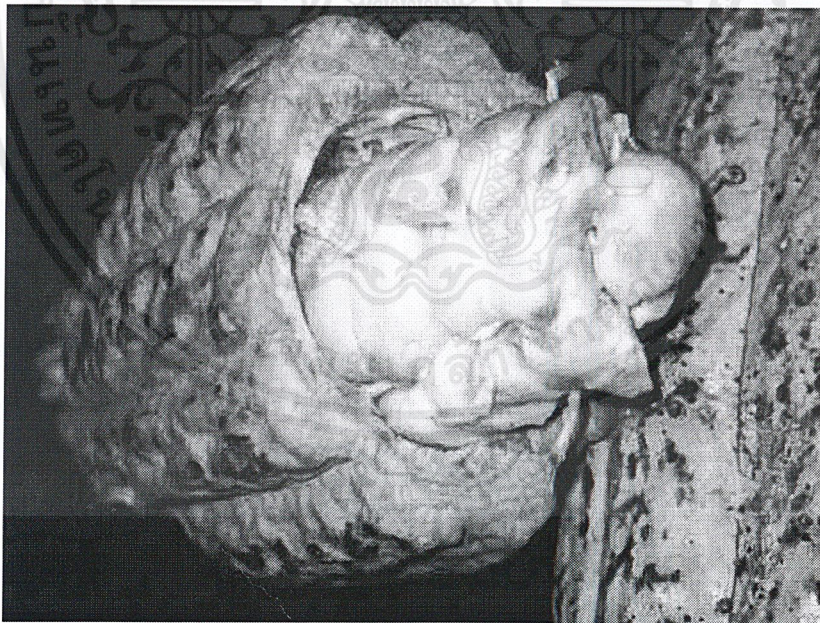
2. กรดซิตริกและคุณสมบัติของกรดซิตริก

กรดซิตริกจัดเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ซึ่งพบในผลไม้หรือเมล็ดของผักหลายชนิด โดยเฉพาะในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะนาวและพืชตระกูลส้ม ซึ่งสามารถแยกกรดซิตริกออกจากน้ำมะนาวได้สำเร็จเป็นครั้งแรก โดยการผ่านน้ำมะนาวร้อนๆ ไปบนแคลเซียมคาร์บอเนต เพื่อให้เกิดเป็นตะกอนของแคลเซียมซิเตรทจากนั้นจึงแยกกรดซิตริกออกมาโดยใช้กรดซัลฟูริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2-1 ผลโกโก้

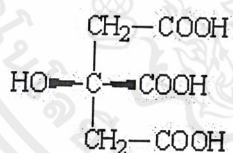


รูปที่ 2-2 เมล็ดโกโก้

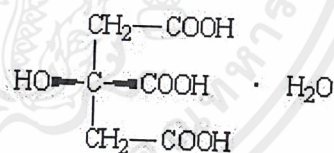
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งวิธีการตกตะกอนแคลเซียมซิเตรทและกรดซิตริกออกจากแคลเซียมซิเตรทยังใช้ในการทำให้กรดซิตริกบริสุทธิ์จนถึงปัจจุบันนี้ อย่างไรก็ตาม วัตถุประสงค์ซึ่งใช้ในการผลิตได้มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากวิธีการผลิตกรดซิตริกโดยการสกัดออกมาจากน้ำมะนาวไม่เพียงพอต่อความต้องการในอุตสาหกรรมอาหาร(Scheele,1784) Wehmer(1893) ผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อในกลุ่ม *Mucor sp.* และ *Penicillium sp.* โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นวัตถุดิบ ต่อมา Currie(1917) ได้อธิบายวิธีการและสภาวะในการผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก Doelger และ Prescott(1934) พบว่าการเปลี่ยนน้ำตาลทรายเป็นกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *A. niger* เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งการค้นพบเหล่านี้กระตุ้นให้เกิดความสนใจในการศึกษาถึงการผลิตกรดซิตริกโดยการหมักด้วยเชื้อรา *A. niger* ทำให้นักวิทยาศาสตร์ท่านอื่นๆ หันมาสนใจในการพัฒนาการผลิตกรดซิตริกโดยใช้กระบวนการหมัก ในปัจจุบันการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมจึงอาศัยหมักด้วยเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ถึงแม้ว่าวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อผลิตกรดซิตริกจะมีแนวโน้มเป็นไปได้ก็ตาม แต่ให้ผลคุ้มค่าทางเศรษฐกิจต่ำกว่าที่ได้รับจากการหมัก (วราวุฒิและรุ่งนภา,2532)

กรดซิตริกมีลักษณะเป็นผลึกขุ่นมัวหรือสีขาว มีลักษณะเป็นผงคล้ายแป้ง มีโครงสร้างดังรูปที่ 2-3 คุณสมบัติของกรดซิตริกมีดังนี้ คือ สูตรเคมี CHO น้ำหนักโมเลกุล 192.13 ความถ่วงจำเพาะ 1.665 จุดหลอมเหลว 153 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างในสารละลาย 0.1 นอร์มัล เท่ากับ 2.2 การละลายในน้ำที่ 25 องศาเซลเซียส 162 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (อาภรณ์,2529)



สูตรโครงสร้างแอนไฮดริส



สูตรโครงสร้างโมโนไฮเดรต

รูปที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของกรดซิตริก

ที่มา : วราวุฒิและรุ่งนภา (2532)

เนื่องจากกรดซิตริกเป็นสารที่มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม ย่อยสลายได้ง่าย มีความเป็นพิษต่ำและกำจัดได้ง่าย ละลายได้ดีโดยขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ (ตารางที่ 2-2) จึงมีการใช้กรดซิตริกเกลือ และเอสเทอร์ของกรดนี้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย คุณสมบัติทางเคมีของกรดซิตริกตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.) แสดงดังตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-2 แสดงความสามารถในการละลายน้ำของกรดซิตริก

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กรดซิตริก (ร้อยละ)	Solid phase
10	54.0	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$
20	59.2	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$
30	64.3	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$
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 : อภรณ์ (2529)

ตารางที่ 2-3 แสดงคุณลักษณะทางเคมีของกรดซิตริก

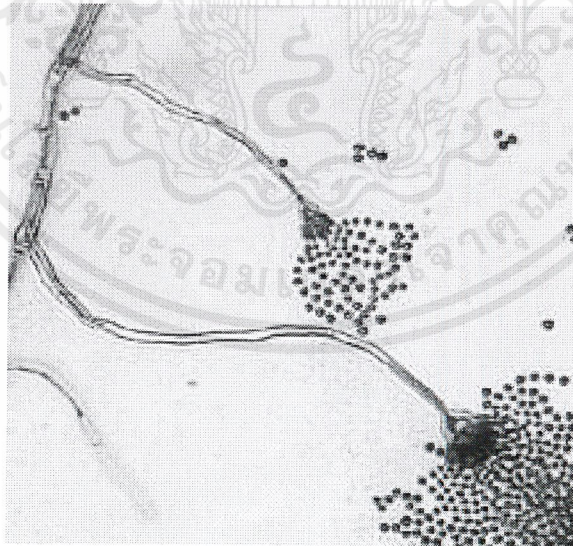
รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด	
		กรดซิตริก โมโนไฮเดรต	กรดซิตริก แอนไฮดริส
1	ความบริสุทธิ์ $C_6H_8O_7$ จำนวนในสภาพแห้งร้อยละ	99.5-101.0	99.5-101.5
2	น้ำร้อยละ	7.5-8.8	ไม่เกิน 0.5
3	กากที่เหลือจากการเสาร้อยละไม่เกิน	0.05	0.05
4	ออกซาเลต	สารละลายต้องไม่ขุ่น	สารละลายต้องไม่ขุ่น
5	ซัลเฟต	สารละลายต้องไม่ขุ่น	สารละลายต้องไม่ขุ่น
6	สารหนู มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม ไม่เกิน	3	3
7	โลหะหนัก ยกเว้น เหล็ก (เทียบเป็นตะกั่ว) มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม ไม่เกิน	10	10
8	แบเรียม	สารละลายต้องไม่ขุ่น	สารละลายต้องไม่ขุ่น
9	แคลเซียม มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	200	200
10	เหล็ก มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
11	คลอไรด์ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
12	สารที่สลายให้คาร์บอนได้ง่าย (readily carbonizable substance)	สีต้องไม่เข้มกว่าสีของ สารละลายมาตรฐาน	สีต้องไม่เข้มกว่าสีของ สารละลายมาตรฐาน

ที่มา : มอก.(2526)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ลักษณะของเชื้อ *Aspergillus niger* ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก

A.niger เป็นเชื้อราสำคัญในการผลิตกรดซิตริกด้วยกรรมวิธีการหมัก เชื้อนี้จัดเป็นราชั้นสูงอยู่ใน subdivision Eumycotina, class Ascomycetes, subclass Euascomycetidae โดยทั่วไปราชนิดนี้จะมีสีดำ แต่เมื่อเชื้อกลายพันธุ์ก็อาจมีสีน้ำตาลเขียวออกเหลือง หรือ ขาวก็ได้ ลักษณะราในกลุ่ม *Aspergillus* คือเส้นใยของรามีพนักกันเป็นห้องๆ ก้านชูสปอร์ (conidiophore หรือ stalk) ตั้งอยู่บนเซลล์ชนิดพิเศษที่เรียกว่า “foot cell” เซลล์เหล่านี้จะมีขนาดใหญ่และผนังหนา ปลายสุดของก้านชูอับสปอร์ (vesicle) อับสปอร์นี้อาจมีรูปร่างต่างกัน เช่น กลม รี และอื่นๆ บนอับสปอร์จะมีหนาม(sterigmata)อยู่โดยรอบหรือบางส่วน ในบางครั้งราจะสร้างหนามสองชั้น หนามชั้นแรกสุด(primary sterigmata)จะติดอยู่กับอับสปอร์ ส่วนหนามชุดที่สอง(secondary sterigmata) จะอยู่ถัดจากหนามชั้นแรกออกมา ถัดจากชั้นหนามจะเป็นที่ตั้งของสปอร์(conidia)สปอร์นี้เกิดจากการยึดตัวของเซลล์หนามแล้วสร้างผนังกัน บางครั้งจะต่อกันเป็นสายโดยสปอร์ที่อยู่ปลายนอกสุดของสายจะเป็นสปอร์ที่แก่ที่สุด (รูปที่ 2-4) *A.niger* ที่ใช้ในการหมักในปัจจุบันเป็นเชื้อที่ถูกทำให้กลายพันธุ์โดยการใช้กรรมวิธีและสารเคมีต่างๆ เพื่อให้สร้างกรดซิตริกออกมาได้มากขึ้น แต่การรักษาประสิทธิภาพในการผลิตกรดของเชื้อให้คงที่ตลอดไปนั้นเป็นเรื่องที่ลำบากมาก มักพบเสมอว่าราที่เพาะจากสปอร์ที่เก็บไว้นานเกินไปนั้นจะผลิตกรดออกมาได้น้อยซึ่งเหตุผลของเรื่องนี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัดเท่าไรนักและวิธีแก้ไขอย่างหนึ่งก็คือต้องทำการถ่ายเชื้ออย่างสม่ำเสมอ(Das,1972;Chaudhary et.al., 1974 ; Banik et.al.,1975; Hannan et.al. , 1976)



รูปที่ 2-4 ลักษณะของ *Aspergillus niger* เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์

Steel และคณะ (1954) กล่าวว่า ลักษณะของเชื้อที่เจริญเป็นแบบเส้นสายไม่เหมาะสม สำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อ เพราะไม่สามารถนับจำนวนสปอร์ได้ นอกจากนี้ลักษณะของเชื้อที่เป็นแบบรีทาร์ด (retard type) คือ เชื้อที่มีการเจริญได้เล็กน้อยจะทำให้การหมักได้ผลไม่ดี ดังนั้นเชื้อที่มีลักษณะเป็นเม็ด (pellet) ซึ่งมีลักษณะระหว่างแบบที่เป็นเส้นสายและแบบรีทาร์ดจึงเหมาะสม สำหรับใช้ในการผลิตกรดซิตริก ดังรูปที่ 2-5

Clack (1962) ได้ศึกษาโครงสร้างภายในของ *A. niger* ที่ใช้ผลิตกรดซิตริกเมื่อเลี้ยงแบบซัพเมอร์จ (submerge) โดยใช้กากน้ำตาลจากหัวบีทที่ผ่านการตกตะกอนโลหะหนักด้วยเฟอโรไซยาไนด์ (ferrocyanide) พบว่าการเจริญในช่วง 24 ชั่วโมงแรกที่ทำให้ภาคนั้น เชื้อแต่ละเม็ดจะเจริญเป็นเส้นใยที่มีลักษณะเกาะกันกลม หลังจากนั้นต่อมาเป็นช่วงที่ให้ออกซิเจนซึ่งจะทำให้การเจริญบริเวณขอบนอกของเม็ดเชื้อหนาที่บริเวณตรงกลางจะเกิดการย่อยสลายตัวเอง ช่วงสุดท้ายของการหมักเม็ดเชื้อประกอบด้วยชั้นของเส้นใยซึ่งจะมีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 50 ของปริมาณเม็ดเชื้อทั้งหมด นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงสถานะของการหมักจะมีผลต่อการเจริญบริเวณขอบรอบๆ และอัตราเร็วของการย่อยสลายด้วย

Clack และ คณะ (1966) รายงานว่า ระหว่างการผลิตกรดซิตริกแบบซัพเมอร์จที่มีเกลือแร่หลาย ๆ อย่าง พบว่ามี แมงกานีสเพียงอย่างเดียวที่ทำให้เกิดการเจริญเป็นแบบเส้นสายแทนแบบเม็ด ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตกรดซิตริกลดต่ำลง

4. ชีวเคมีของการผลิตกรดซิตริกโดย *Aspergillus niger*

กรดซิตริกจัดเป็น primary metabolic product สังเคราะห์ขึ้นได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ หลายวิถี โดยการสังเคราะห์ acetyl-CoA จากวิถี glycolytic และส่งเข้าวัฏจักร Tricarboxylic acid (TCA cycle) เพื่อผลิตกรดซิตริก ดังรูปที่ 2-6 ระหว่างการสังเคราะห์กรดซิตริกเกิดกระบวนการต่อไปนี้

1. การเกิด oxidative decarboxylation โดย pyruvate ซึ่งเกิดจาก dehydration ของน้ำตาลกลูโคสโดยผ่าน glycolytic pathway

2. การเกิด β -oxidation ของ thioester

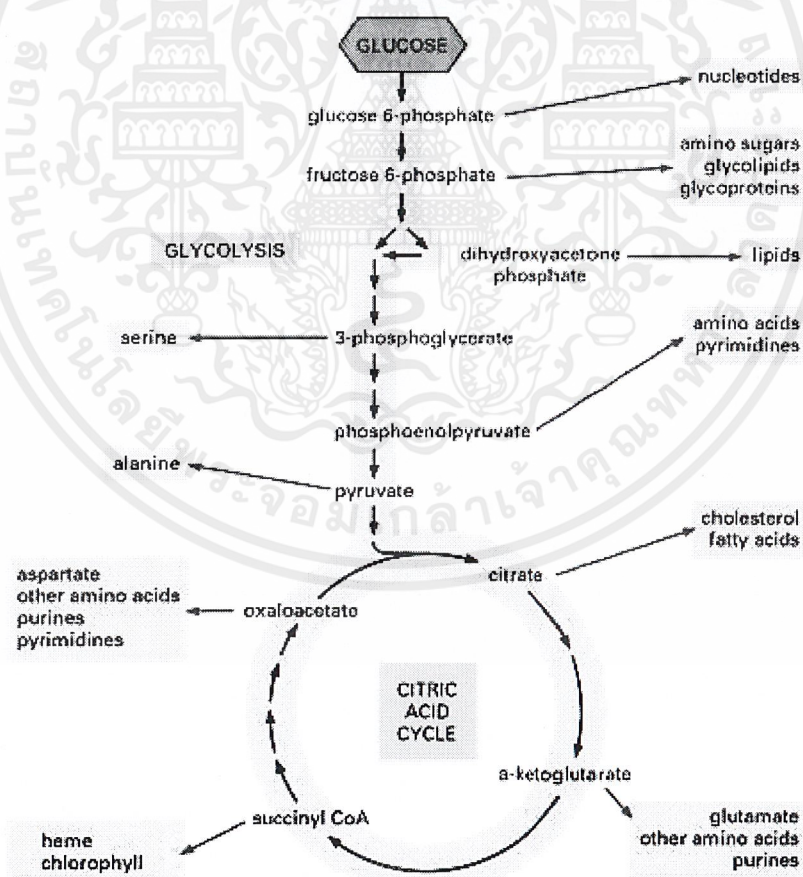
ในเชื้อรา *A. niger* น้ำตาลกลูโคสประมาณร้อยละ 80 จะถูกสลายโดยผ่านกระบวนการ Emden-Meyerhof-Panass (EMP) ส่วนน้ำตาลกลูโคสที่เหลือผ่านขบวนการ pentose phosphate pathway (PPP) เพื่อได้เป็นไพรูเวต (pyruvate) จากนั้นไพรูเวตจะปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ และสร้างออกซาโลอะซีเตต (oxaloacetate) และ อะซีติล-โคเอ (acetyl CoA) ที่เกิดขึ้นมีการรวมกันได้กรดซิตริก โดยมี citrate synthetase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและเข้าสู่ระบบ tricarboxylic acid รูปที่ 2-7 โดยศึกษาสมมูลสารในขบวนการที่มีไพรูเวตเป็นสารตั้งต้น พบว่ามีปริมาณกรดซิตริก กรดออกซาลิก และคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มมากขึ้น จากการวิเคราะห์ทำให้ทราบว่า มีกลไกของเมตาบอลิซึม 2 แบบ โดยแบบแรกเหมือนกับที่ศึกษาโดย



รูปที่ 2-5 ลักษณะของเส้นใยราที่เจริญรวมกันเป็น pellet

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

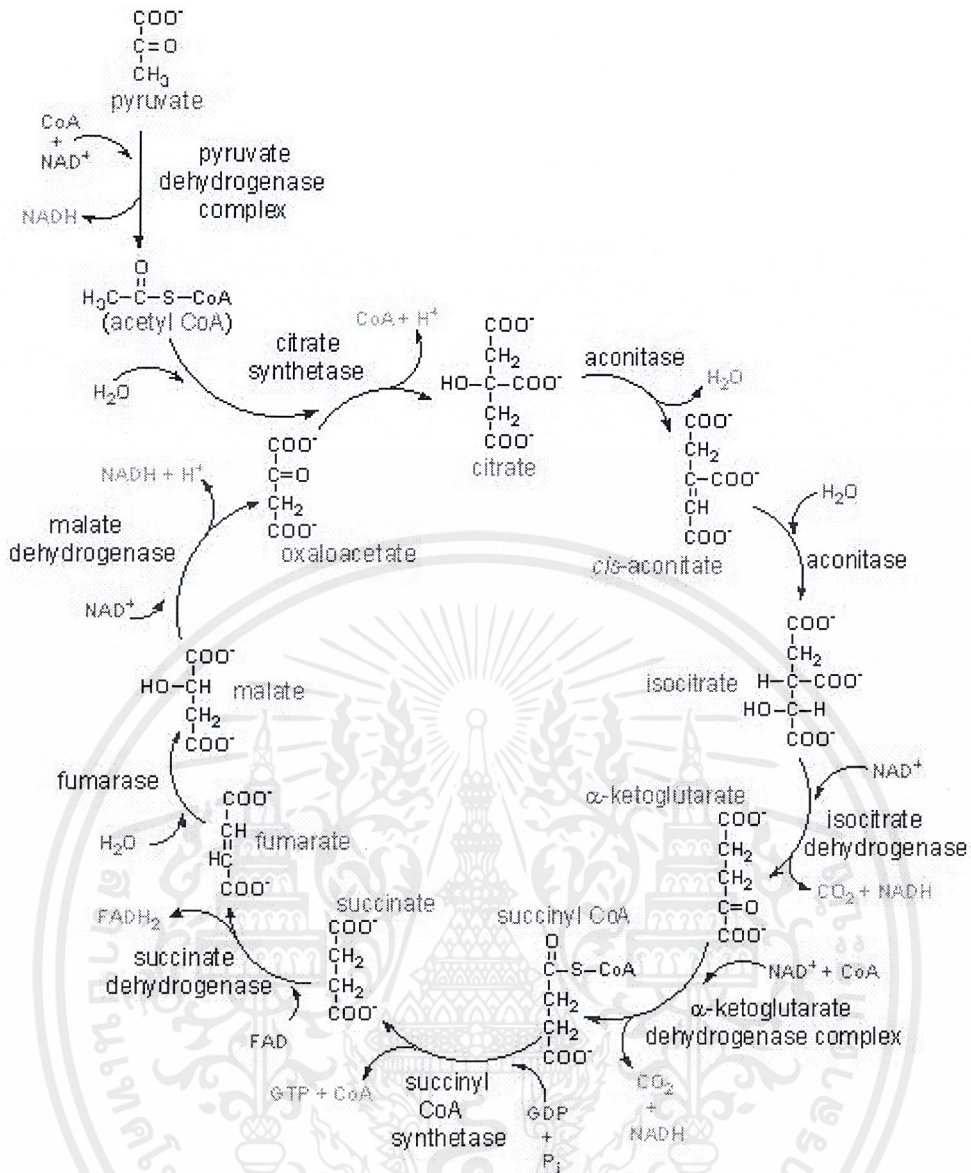
Cleland และ Johnson (1954) แบบที่ 2 เกี่ยวข้องกับการเกิด carboxylation ของ ไพรูเวท 2 โมเลกุล หลังจากนั้นออกซาโลอะซีเตตหนึ่งโมเลกุล จะถูกย่อยสลายเป็นกรดออกซาลิก (oxalic acid) และอะซีเตต (acetate) โดยการทำงานของเอนไซม์ isocitrate lyase เกิดเป็น isocitrate ซึ่งจะถูกลดระดับโดยเอนไซม์ในระบบ tricarboxylic acid เกิดเป็น ซัคซินเนต พร้อมทั้งปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา 2 โมเลกุล ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกปล่อยออกมานี้จะใช้ในการเกิด carboxylation ของไพรูเวท 2 โมเลกุลต่อไปเมื่อวัฏจักรของเอนไซม์ ระหว่างการหมักกรดซिटริก พบว่า กิจกรรมของ pyruvate carboxylase สูงมาก ระหว่างการผลิต กรดซिटริก ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงระบบ tricarboxylic acid อาจสรุปได้ว่าขั้นตอนสำคัญในการผลิตกรดซिटริก คือ การผลิตกรดออกซาโลอะซีเตรทออกมามากกว่าปกติ เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ pyruvate carboxylase และ citrate synthetase ใช้ออกซาโลอะซีเตรทที่เกิดขึ้น เปลี่ยนเป็นกรดซिटริก นอกจากนี้ขั้นตอนสำคัญที่ทำให้กรดซिटริกไม่ถูกใช้ไป คือ การขาดเอนไซม์ aconitase, isocitrate lyase และ isocitrate dehydrogenase หรือการที่เอนไซม์ดังกล่าวมีกิจกรรมเพียงเล็กน้อย (Verhoff และ Spradlin, 1976)



รูปที่ 2-6 วิธีการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดซिटริก โดยผ่านวัฏจักร glycolytic และ TCA

ที่มา : http://www.accessexcellence.org/AB/GG/glycoCit_prec.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2-7 วิธีเมตาบอลิซึมการสังเคราะห์กรดซิตริก
ที่มา : <http://chemistry.gsu.edu/glacone/PDB/protein/krebs/krebs.html>

5. การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม (อรพิน,2526)

กรดซิตริกที่ผลิตเป็นการค้าในปัจจุบัน จะใช้กรรมวิธีการหมักเป็นส่วนใหญ่ และกรรมวิธีในการผลิตของแต่ละโรงงานจะถือเป็นความลับ ดังนั้นจึงมีรายงานออกมาไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามจากรายงานที่ทางโรงงานได้จัดลิขสิทธิ์ไว้ทำให้ทราบเรื่องราวการผลิตกรดซิตริกบางส่วน กรรมวิธีการผลิตที่สำคัญมีอยู่ 3 วิธีด้วยกันคือ

5.1 การผลิตกรดซิตริกแบบ Koji fermentation process (surface culture method)

ขบวนการผลิตนี้ได้เริ่มทำกันในประเทศญี่ปุ่น โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากของเหลือใช้ของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ใส่อาหารลงในถาดแล้วทำการฆ่าเชื้อในอาหารความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1.0-8.0 เซนติเมตร หลังจากอาหารเย็นลงจึงใส่สปอร์ของราลงใน

ถาดอาหาร ถาดอาหารเหล่านี้จะเก็บไว้บนชั้นในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ในขณะที่เดียวกันก็ให้อากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผ่านเข้าไปบนถาดเลี้ยงเชื้อ เชื้อราก็จะเจริญซึ่งจะเห็นเส้นใยของเชื้อรา ตัวอย่างของวัตถุดิบที่นำมาใช้เลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริก เช่น พวกรำข้าวต่างๆ เศษเหลือของมันเทศ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงไม่ควรเกิน 28 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงมาอยู่ที่ 1.8-2.0 ในขณะที่เกิดมีการสะสมกรดซิตริกในขบวนการหมัก หลังจากเลี้ยงได้ 5-8 วัน จึงนำ solid mass ที่มีเชื้อราขึ้นนั้นมาแยกเอากรดซิตริกออก โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย แล้วจึงทำการแยกสารละลายกรดซิตริกออก นำไปทำให้บริสุทธิ์ บางครั้งอาจจะผลิตกรดซิตริกโดยเติมเอนไซม์ลงไป ซึ่งสภาพของอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นจะปรับความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 4-5 และความชื้นประมาณร้อยละ 70-80 สำหรับข้อดีของการใส่เอนไซม์ไปช่วยย่อยแป้งนั้นคือ ทำให้สามารถใช้อาหารต่อถาดได้มากขึ้นโดยไม่ต้องมีการเติมของเสียจากการหมักกรดกลูตามิก

5.2 การผลิตกรดซิตริกแบบ Liquid culture shallow pan process (surface liquid culture)

ในสมัยก่อนการผลิตกรดซิตริกในประเทศยุโรปและอเมริกา มักจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (culture solution) เทลงในถาดนั้นๆ ซึ่งโรงงานที่ผลิตด้วยวิธีนี้จะต้องใช้เนื้อที่ของโรงงานมากกว่า 30 เอเคอร์ และถาดที่ใช้จะทำจากโลหะอลูมิเนียมที่มีความบริสุทธิ์สูง หรือเป็นโลหะพวกพลอดสนิมเพื่อเลี้ยงปัญหาการสึกกร่อนและการปลอมแปลงของพวกแร่ธาตุ (trace element) สำหรับหัวเชื่อนั้นจะทำการเลี้ยงราโดยใช้เวลาประมาณ 9 วัน แล้วจึงถ่ายไปยังสารละลายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อทำการหมัก แล้วทำให้สปอร์นั้นกระจายอยู่ในสารละลายดังกล่าว หลังจากนั้นจึงถ่าย inoculum medium ที่มีสปอร์ของเชื้อรากระจายอยู่นั้นไปยังถาดหมักซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดซิตริก แหล่งคาร์บอนที่ใช้มักเป็นพวกกากน้ำตาลจากอ้อยหรือหัวบีท ความเข้มข้นของน้ำตาลที่จะให้ผลผลิตของกรดซิตริกสูงนั้น ควรจะใช้น้ำตาลประมาณร้อยละ 14-20 นอกจากนี้พวกแร่ธาตุหรือฟอสเฟตก็มีความจำเป็นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของราที่ใช้ อาหารที่ใช้ควรมีฟอสเฟตเพียงพอ โลหะอื่นๆ ก็มีเช่น เหล็ก สังกะสี และทองแดง ซึ่งโลหะเหล่านี้ไม่จำเป็นต้องมีครบทุกชนิดอาจจะมีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิด แต่ในบางครั้งแร่ธาตุจะมีปริมาณสูงเกินไปในวัตถุดิบที่ใช้ เช่น กากน้ำตาลจากหัวบีท ในกรณีนี้ต้องทำการลดปริมาณโลหะก่อน โดยการทำ pretreatment กับ ferricyanide เพื่อจะรวมตัวกับโลหะเหล็ก หรืออาจจะ pretreat invert molass ด้วย cation-exchange resin ก็ได้ ซึ่งมักจะใช้กับการผลิตกรดซิตริกโดยวิธี submerged-aerated citric acid fermentation

เมื่อทำการเลี้ยงสปอร์ใน fermentation medium ได้ 24 ชั่วโมง จะเห็นเยื่อสีขาวของเส้นใยปกคลุมบนพื้นผิวของสารละลาย แล้วจึงผ่านอากาศขึ้นที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วเข้าไป ซึ่งอากาศนี้มีอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส หลังจากใส่สปอร์ลงไปแล้ว 8-10 วัน ปริมาณน้ำที่อยู่ใน culture solution จะลดลงไปประมาณร้อยละ 20 ระดับความเข้มข้นของกรดจะสูงสุดในช่วงนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำให้ได้ปริมาณกรดซิตริกความเข้มข้นสูงขึ้นทำได้ 2 วิธีคือ การใช้ขบวนการหมักที่เหมาะสม (fermentation process) และใช้วิธีการระเหย(evaporation process) ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตขึ้นได้แบบ surface liquid จะได้ประมาณร้อยละ 80-85 ของน้ำหนักคาร์โบไฮเดรตเริ่มต้นที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ส่วนประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวมีประมาณร้อยละ 90 ของปริมาณกรดซิตริกที่ผลิต

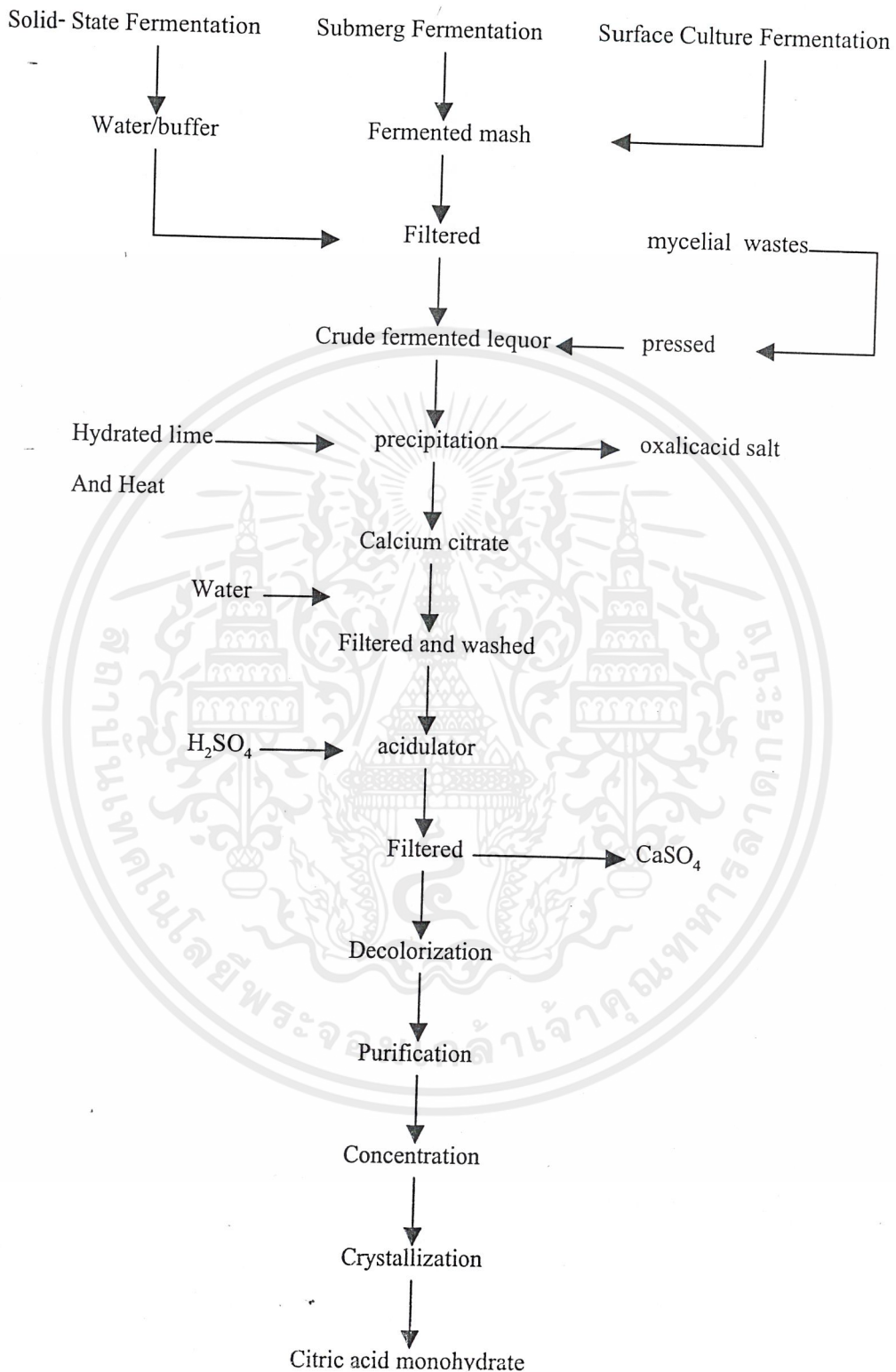
5.3 การผลิตกรดซิตริกแบบ Submerged fermentation process

ปัจจุบันได้พยายามพัฒนาการผลิตกรดซิตริกด้วยวิธีนี้ ขบวนการผลิตโดยทั่วไปก็อาศัยหลักการเลี้ยงเส้นใยของเชื้อราในถังลึกที่บรรจุอาหารอยู่ สำหรับวัตถุดิบที่ใช้สำหรับการผลิตแบบนี้ เช่น น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของ sucrose invert ประมาณ 2 ใน 3 น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง นอกจากนี้อาจใช้เอนไซม์ hydrolyzate ของธัญพืชพวกข้าวโพด ข้าวฟ่างหรือแป้งมันเทศ (Swartove,1996) หลังจากที่เชื้อราเจริญใน fermentation solution ความเข้มข้นต่างในนั้นไม่ควรเกิน 3.5 เพราะอาจมีกรดชนิดอื่นปะปนมาด้วย สำหรับเรื่องการกวนเพื่อให้ออกซิเจนกระจายอย่างเพียงพอนั้นก็ไม่น่าจำเป็นในกรณีนี้ เพราะช่วงระยะเวลาของขบวนการหมักนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลในตอนต้นที่ใช้ต้ม ส่วนระยะเวลาการหมักจะใช้ประมาณ 5-14 วัน ส่วนในด้านเกี่ยวกับการควบคุมฟองที่เกิดขึ้นในระหว่างขบวนการหมักนั้น สามารถทำได้โดยการเติมสาร antifoam ลงไปเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารล้นออกนอกถังหมัก วิธีนี้ มีปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตขึ้นร้อยละ 95 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยทั่วไปแล้วปริมาณการผลิตจะอยู่ในช่วงร้อยละ 70-90 ในเวลา 8-10 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส(Schierholt,1977)

6. การแยกกรดซิตริก (วราวุฒิและรุ่งนภา , 2532)

ตามปกติในขบวนการหมักมีขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอน ซึ่งประกอบด้วย การเตรียมวัตถุดิบ การหมักและการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ตามธรรมดาแล้วถ้าทำการหมักจนได้ผลผลิตสูง แต่ถ้าใช้วิธีการเก็บเกี่ยวที่ไม่เหมาะสมก็จะทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตลดต่ำลง การเก็บเกี่ยวกรดซิตริกออกมาจากการหมักแสดงดังรูปที่ 2-8 เริ่มต้นด้วยการแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกจากน้ำหมักก่อน(ในกรณีที่ใช้การหมักในกระบวนการหมักที่เชื้อเจริญที่ผิวของอาหารและกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว) หรือต้องทำการสกัดเอากรดซิตริกด้วยน้ำหรือบัฟเฟอร์ออกมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักโดยกระบวนการหมักในสภาพอาหารแห้ง แล้วจึงกรองแยกเอาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้อยาก่อน จากนั้นจึงนำน้ำหมักที่ได้มาผ่านกระบวนการตกตะกอนโดยในช่วงแรกทำการตกตะกอนกรดออกซาลิกออกมาด้วยน้ำปูนใส(hydrated-lime) ปริมาณเล็กน้อยและปรับอุณหภูมิประมาณ 80-90 องศาเซลเซียสแล้วจึงเติมน้ำปูนขาวลงไปอีกในอัตราส่วนน้ำปูนขาว 1 ส่วนต่อน้ำหมัก 2 ส่วน โดยใช้เวลาในการเติมมากกว่า 1 ชั่วโมงในขณะที่เดียวกันเพิ่มอุณหภูมิให้สูงถึง 95 องศาเซลเซียส การเติมน้ำปูนขาวในช่วงนี้จะทำให้กรดซิตริกตกตะกอนออกมาในรูปของเกลือแคลเซียมซิเตรท (calcium citrate) ซึ่งจะถูกรองและล้างด้วยน้ำหลายๆครั้ง ก่อนที่จะส่งเข้าเครื่องเติมกรด(acidulators)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2-8 ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Lakshminarayans และ คณะ (1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการเติมกรดซัลฟูริกเข้าไป เพื่อแยกแคลเซียมออกไปในรูปแคลเซียมซัลเฟตแล้วกรองออกไป ส่วนสารละลายที่มีกรดซิตริกละลายอยู่ จะถูกนำไปกำจัดสีโดยถ่านกัมมันต์แล้วจึงนำไปผ่านคอลัมน์เรซินเพื่อแลกเปลี่ยนประจุ เพื่อทำให้กรดซิตริกที่ได้รับบริสุทธิ์ปราศจากสิ่งเจือปน ก่อนที่จะนำไปทำให้เข้มข้นภายในสภาพสุญญากาศ แล้วจึงผ่านขั้นตอนการตกผลึกและขั้นตอนการทำแห้ง ซึ่งจะได้กรดซิตริกในรูป citric acid monohydrate ออกมาในที่สุด

สำหรับการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อยีสต์ เช่น *Candida* นอกจากกรดซิตริกที่ถูกสร้างขึ้นมาแล้วก็จะมีกรดไอโซซิเตริคนอกออกมาด้วยเสมอ ดังนั้นการเก็บเกี่ยวผลผลิตจึงจำเป็นต้องแยกกรดทั้งสองออกจากกันทั้งนี้สามารถทำได้โดยการเติมปูนขาว(ในรูปของแคลเซียมไฮดรอกไซด์) ในอัตราส่วน 3:3 ส่วนน้ำหมักที่แยกเชื้อออกไปแล้วและควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 85-90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะทำให้กรดไอโซซิเตริกตกตะกอนลงมา จากนั้นจึงนำทั้งเกลือซิเตรทและเกลือไอโซซิเตรทไปผ่านกระบวนการเก็บเกี่ยวดังที่กล่าวมาแล้ว

7. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก (วราวุฒิและรุ่งนภา , 2532)

สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา โดยเฉพาะการหมักในอาหารเหลวจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

- 7.1 ธาตุอาหาร
- 7.2 การแปรสภาพวัตถุดิบ
- 7.3 ความเป็นกรด-ด่าง
- 7.4 หัวเชื้อ
- 7.5 การควบคุมสภาพการหมัก
- 7.6 สารกระตุ้น
- 7.7 ฟองและการควบคุม
- 7.8 ปัจจัยอื่นๆ

7.1 ธาตุอาหาร

ธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริกนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราและชนิดของการหมักซึ่งปกติแล้วสายพันธุ์ที่จะใช้จะมีความจำเพาะต่อกระบวนการที่จะใช้เท่านั้น ธาตุอาหารแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้

7.1.1 คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส

- แหล่งคาร์บอน

ในทางทฤษฎีแล้วน้ำตาลที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2-7 และ ชนิด 12 คาร์บอนสามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดซิตริกได้ แต่น้ำตาลที่ดีที่สุดในการผลิตกรดซิตริกโดย *A. niger* ก็คือซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส ตามลำดับ(Hossain et al.,1984) นอกจากนี้ยังอาจใช้น้ำตาลจากอ้อยหรือหัวผักกาดหวานก็ได้ ปริมาณของน้ำตาลที่ใช้โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 140-200 กรัมต่อลิตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Prescott et al., 1984) การผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา มี 2 ขั้นตอนที่เกี่ยวข้อง คือ ขั้นตอนการเจริญเติบโตของเชื้อ และ ขั้นตอนการหมัก ดังนั้นเชื้อราจึงจำเป็นต้องใช้ธาตุอาหารหลัก และ แร่ธาตุรอง(trace element) สำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิตริก ดังนั้นความเข้มข้นของส่วนประกอบเหล่านี้ จึงส่งผลกระทบต่อผลผลิตของกรดซิตริกที่จะได้รับ ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* (สายพันธุ์ที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน) จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้เหมาะสมซึ่งโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงร้อยละ 15-18 ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงกว่านี้ จะทำให้มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการหมักสูงซึ่งจะเป็นการสิ้นเปลือง ในทางตรงกันข้ามถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่ำเกินไปจะส่งผลให้กรดซิตริกที่ได้มีน้อยลง และในขณะเดียวกันจะเกิดการสะสมของกรดออกซาลิกด้วย (Kovats, 1960) สำหรับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *Aspergillus niger* แสดงอยู่ในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger*

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

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kapoor และคณะ (1982)

ตามปกติแล้วการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรานี้ มักต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท synthetic media ที่มีองค์ประกอบง่ายไม่ซับซ้อน เช่น แหล่งคาร์บอนที่ใช้กันได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำอ้อย แป้งจากแหล่งต่างๆ กากน้ำตาลจากอ้อย เป็นต้น ทั้งนี้ น้ำตาลซูโครส หรือกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบที่นิยมใช้มากที่สุด กากน้ำตาลแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 50-60 กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 48 และกากน้ำตาลที่ผลิตขึ้นมาโดยนำน้ำอ้อยมาเปลี่ยนรูปบางส่วนแล้วจึงไประเหยให้ขึ้นเป็นน้ำเชื่อม มีน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 70 อย่างไรก็ตามในการใช้กากน้ำตาลนี้อาจเกิดข้อเสียต่อการหมักทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณของเถ้า(ash) สูงซึ่งจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริกได้ องค์ประกอบของกากน้ำตาลแสดงดังตารางที่ 2-5 ในการหมักที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบนี้ เริ่มต้นด้วยการเอากากน้ำตาลมาเจือจางให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 15-20 และปรับความเป็น

กรด-ด่างเท่ากับ 5.5-6.5 ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง จากนั้นจึงเติม สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที ทำการถ่ายสปอร์ของ *Aspergillus niger* เพื่อทำการหมักต่อไป

ตารางที่ 2-5 องค์ประกอบของกากน้ำตาล

องค์ประกอบ	ปริมาณที่ใช้ (ที่ร้อยละ 75 ของสารแห้ง)
น้ำตาลทั้งหมด :	48-56
ซูโครส	30-40
น้ำตาลรีควิซ	15-20
น้ำตาลที่หมักไม่ได้	2-4
สารอินทรีย์ที่ไม่มีน้ำตาล :	9-12
คาร์โบไฮเดรตที่สามารถละลายได้	4.0
สารอินทรีย์ เช่น กรดอโคนิติก	3.0
กรดซิตริก กรดมาลิก กรดซัคซินิก 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)

- แหล่งไนโตรเจน

Aspergillus niger สามารถใช้ในโตรเจนในรูปเกลือต่างๆ Porgers (1932)พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โซเดียมไนเตรทเข้มข้นร้อยละ 0.4 จะให้ผลที่ดีกว่าใช้เกลือแอมโมเนียมไนเตรทหรือแอมโมเนียมซัลเฟต กรณีที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรทเกินกว่า 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณของเชื้อจะสูง (Prescott and Dunn,1959)อย่างไรก็ตามชนิดของแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อเชื้อราอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ ถ้าใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้ระยะเวลาเจริญเติบโตของเชื้อกินเวลานาน แต่ถ้าใช้แอมโมเนียมไนเตรทจะทำให้ระยะดังกล่าวกินเวลาน้อย อย่างไรก็ตามถ้าใช้แอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 0.25 จะก่อให้เกิดการสะสมของกรดออกซาลิกขึ้นอีก นอกจากนี้ Sherard (1963) พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตของกรดซิตริกได้เมื่อเติมเกลือไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการหยุดสร้างเซลล์ โดยจะเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาข้อมูลของเอกสารอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากการหมักดำเนินไปได้แล้ว 1 ต่อ 3 ของเวลาทั้งหมดถ้าทำได้เช่นนี้ประสิทธิภาพการใช้ น้ำตาลจะสูงขึ้นและได้กรดซิตริกเพิ่มมากขึ้นด้วย แต่ถ้าเติมก่อนถึงเวลาอันสมควรผลผลิตจะ ลดลง

- แหล่งฟอสเฟต

ในระยะเริ่มต้นการหมักขณะยังมีเกลือฟอสเฟตในอาหาร เชื้อจะอยู่ในช่วงการเจริญ โดยที่เกลือฟอสเฟตจะชะลอการสร้างกรดไว้ก่อน เมื่อเกลือฟอสเฟตหมดลงไปเชื้อจึงเริ่มการ สังเคราะห์กรดขึ้น (Szuce, 1944) ส่วน Steel และคณะ (1955) พบว่าการเติมเกลือฟอสเฟตใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก กากน้ำตาลของหัวผักกาดหวาน ในปริมาณ 0.01-0.50 กรัมต่อลิตร พบ ว่าไม่มีการสร้างกรดออกซาลิก แต่เมื่อเชื้อจะมีขนาดใหญ่มากกว่าปกติทำให้มีความหนืดเพิ่มขึ้น ใน ที่สุดจะขัดขวางการทำงานของเครื่องให้อากาศ ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเกลือฟอสเฟตจะมี การสร้างกรดออกซาลิกมากถึงร้อยละ 80 ของกรดอื่นที่เกิดขึ้นนอกเหนือไปจากกรดซิตริก ตารางที่ 2-6 แสดงให้เห็นถึงผลของเกลือฟอสเฟตในปริมาณต่างๆกันที่มีต่อการสร้างกรดซิตริก ตารางที่ 2-6 ผลของเกลือฟอสเฟตต่อการสร้างกรดซิตริกของ *A. niger* ระยะเวลาในการ หมัก 11 วัน

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (ร้อยละ)	ปริมาณกรดซิตริก (ร้อยละ)	การสูญเสียน้ำตาลไปเป็นเซลล์ และสารอื่น ๆ นอกจากกรดซิตริก (ร้อยละ)
0.05	3.14	3.24
0.04	3.24	1.87
0.02	4.24	1.36
0.01	5.59	1.00

ที่มา : Noyes(1969)

7.1.2 แร่ธาตุ

Aspergillus niger สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกต้องการแร่ธาตุหลายชนิดได้แก่ Fe^{2+} Cu^{2+} Zn^{2+} Mn^{2+} และ Mg^{2+} เป็นต้น สำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิตริกอย่างไรก็ตามความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลต่อการหมักอย่างมากจนอาจ กล่าวได้ว่า ถ้าต้องการให้การผลิตกรดซิตริกสำเร็จต้องควบคุมแร่ธาตุเหล่านี้เสียก่อน แร่ธาตุดังกล่าวมีดังนี้

เหล็ก (Fe^{2+}) ความเข้มข้นของเหล็กที่เหมาะสมกับการผลิตกรดซิตริกให้ได้ปริมาณ ของกรดซิตริกสูงสุดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และอาหารที่ใช้ ความเข้มข้นของ Fe^{2+} ใน ปริมาณสูง จะช่วยให้มีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ได้ดีเนื่องจากเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ของ เอนไซม์ aconitase และจะมีผลทำให้การผลิตกรดซิตริกลดต่ำลง ในทางตรงกันข้าม ความเข้มข้น

ชั้นของเหล็กเพียงเล็กน้อยประมาณ 0.02-0.025 mg/l กลับช่วยให้มีการผลิตกรดซัลฟูริกได้สูงสุด แต่อย่างไรก็ตาม ถ้ามีทองแดงไอออน(Cu^{2+}) ความเข้มข้น 0.1-500 พีพีเอ็ม (หนึ่งส่วนในล้านส่วน) ลงไปในน้ำหมักระหว่างถ่ายสปอร์เชื้อหรือในช่วง 50 ชั่วโมงแรก Cu^{2+} จะไปช่วยลดความรุนแรงของ Fe^{2+} ลงมาได้มาก

แมกนีเซียม(Mg^{2+}) มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาเอนไซม์หลายชนิดภายในเซลล์ ในขณะที่เดียวกันก็ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซัลฟูริกด้วย ความเข้มข้นของ MgSO_4 ที่เหมาะสมเพื่อผลิตกรดซัลฟูริกให้ได้สูงสุดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.02-0.025 ตารางที่ 7 แสดงถึงผลของแมกนีเซียมที่มีต่อการใช้น้ำตาลและการสร้างกรดซัลฟูริก ในบรรดาแร่ธาตุหลายชนิดเหล่านี้ แร่ธาตุที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการผลิตกรดซัลฟูริกคือ Fe^{2+} และ Zn^{2+} โดยทั่วไปแล้วแร่ธาตุทั้งสองชนิดนี้ต้องมีความเข้มข้นต่ำจึงเหมาะต่อการผลิตกรดซัลฟูริก แต่ถ้าความเข้มข้นสูงจะทำให้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตยืดยาวออกไป (Sueand Johnson, 1947)

ตารางที่ 2-7 ผลของแมกนีเซียมที่มีผลต่อการใช้น้ำตาลและการสร้างกรดซัลฟูริกของ *A. niger* น้ำตาลเริ่มต้น 130 กรัมต่อลิตร ระยะเวลาในการหมัก 13 วัน

ดีเกลือ (MgSO_4) (ร้อยละ)	การเปลี่ยนแปลงของน้ำ ตาลเริ่มต้น (ร้อยละ)	การเปลี่ยนแปลงของน้ำ ตาลที่ถูกใช้ไป (ร้อยละ)	กรดซัลฟูริก (ร้อยละ)
0.02	42.7	57.2	6.13
0.04	53.0	72.2	7.41
0.06	56.6	72.2	7.79
0.08	59.2	73.3	8.03

ที่มา : Noyes(1969)

ซิงค์ (Zn^{2+}) ผลของความเข้มข้นต่อการผลิตกรดซัลฟูริกด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* มีลักษณะเช่นเดียวกับ Fe^{2+} ถ้าความเข้มข้นของ Zn^{2+} อยู่ในระดับ 1-2 ไมโครโมล จะทำให้ช่วงการเจริญเติบโตของเชื้อราเกิดอย่างต่อเนื่อง แต่ถ้าความเข้มข้นต่ำกว่า 1 ไมโครโมล จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซัลฟูริกด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ในการติดตามการหมักยังมีความเข้มข้นของ Zn^{2+} เข้ามาเกี่ยวข้องได้อีก กล่าวคือในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรา เมื่อเกิดการขาด Zn^{2+} ขึ้นมาในช่วงใดย่อมเป็นสัญญาณแสดงให้เห็นว่า จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพจากการเจริญเติบโตไปสู่ช่วงการผลิตกรดซัลฟูริกต่อไป

คอปเปอร์ (Cu^{2+}) เป็นสารที่มีความสำคัญสำหรับการเจริญและกระบวนการเมตาบอลิซึมของ *A. niger* แต่มีความต้องการในปริมาณน้อย ในการเลี้ยงที่มีคอปเปอร์อยู่จะช่วยในการเกิดการใช้คาร์โบไฮเดรตเพื่อการผลิตกรดซัลฟูริก แทนการใช้เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ และยังเป็นตัวช่วยยับยั้งการปนเปื้อนจาก *Penicillium* อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมงกานีส (Mn^{2+}) ในการผลิตกรดซิตริกด้วยกระบวนการ Submerge fermentation นั้น แมงกานีสมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มผลผลิตกรดซิตริก สภาพที่ขาดแมงกานีสใน *A.niger* นั้นมีผลกระทบโดยตรงกับการผลิตกรดซิตริก ทำให้ผลผลิตลดลง ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมงกานีสในการเลี้ยงแบบ submerge fermentation คือ น้อยกว่า 0.2 ppb (Shankaranand และ Lonsane , 1994)

ส่วนแร่ธาตุอื่น ๆ จะก่อให้เกิดผลกระทบทางสรีระวิทยาและการผลิตกรดซิตริก อย่างไรก็ตามแร่ธาตุเหล่านี้ไม่ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริกมักใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากากน้ำตาลมีแร่ธาตุต่างๆอยู่มากเกินพอ ซึ่งเป็นผลเสียต่อการหมัก เพราะแร่ธาตุเหล่านี้จะไปกระตุ้นการเจริญของราทำให้ราผลิตกรดออกมาน้อย วิธีแก้ไขคือต้องเติม โปแทสเซียมเพอโรไซยาไนด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เกล็ดตัวนี้จะรวมตัวกับแร่ธาตุต่างๆ ทำให้ตกตะกอนราไม่สามารถใช้ได้อีกต่อไป

7.2 การแปรสภาพวัตถุดิบ

จากการที่แร่ธาตุที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลต่อการผลิตกรดซิตริก จึงได้มีการค้นคว้าหาเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ลดความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านั้นให้อยู่ในระดับต่ำที่สุด สำหรับเทคนิคที่ใช้ในการแก้ปัญหานี้เท่าที่มีการศึกษาค้นคว้า พอดีแบ่งออกได้ 2 วิธี คือ

7.2.1 การแปรสภาพของวัตถุดิบด้วยสารเคมีหรือเรซินที่ใช้แลกเปลี่ยนประจุ เพื่อลดความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านั้น

7.2.2 การปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา เพื่อให้สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นของแร่ธาตุสูง

7.3 ความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรด-ด่างนับว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้การหมักบรรลุผลสำเร็จ เมื่อใช้ความเป็นกรด-ด่างต่างๆ นอกจากจะได้กรดซิตริกออกมามากยังช่วยลดการเกิดกรดออกซาลิกและลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นได้อีกด้วย โดยไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อในอาหารเหลวที่อุณหภูมิสูงและเป็นเวลานาน ในการหมักจำเป็นต้องปรับกรด-ด่างเริ่มต้น ทั้งนี้ขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ การปรับกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในระดับต่ำ (ความเป็นกรดต่ำ) ก่อให้เกิดผลดังนี้

- 7.3.1 ช่วยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ
- 7.3.2 ช่วยยับยั้งการสร้างและ/หรือ การสะสมกรดออกซาลิก
- 7.3.3 ช่วยทำให้กระบวนการฆ่าเชื้อที่ใช้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

7.4 หัวเชื้อ

โดยทั่วไปเชื้อราสายพันธุ์ที่ผลิตกรดซิตริกจำเป็นจะต้องมีการเก็บรักษาเพื่อให้มีชีวิตอยู่ตลอดไป และคงคุณสมบัติและลักษณะเดิมให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยให้มีการเปลี่ยนแปลงให้น้อยที่สุด โดยอาศัยวิธีการต่างๆ ดังนี้

7.4.1 การเก็บรักษาโดยเลี้ยงเชื้อราไว้บนอาหารวุ้น และทำการถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่เป็นระยะๆ

7.4.2 การเก็บไว้โดยทำให้แห้งและเก็บไว้ภายใต้สภาพไม่มีอากาศ(โดยการหลอมปิดปากหลอดหรือใช้ฝาเกลียวที่ปิดสนิท)

7.4.3 การเก็บโดยวิธี lyophilization หรือ freeze-drying

7.4.4 เก็บภายใต้ความเย็นยิ่งยวด (Ultra-low temperature) โดยการใช้ไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิที่เก็บประมาณ -130 องศาเซลเซียส

ในการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกในสภาพต่างๆสามารถใช้หัวเชื้อในลักษณะต่างๆซึ่งในแต่ละลักษณะจำเป็นจะต้องมีการคำนึงถึงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เตรียมหัวเชื้อให้แข็งแรงและสามารถทำการหมักได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพื่อพัฒนาการเตรียมหัวเชื้อควบคู่กับการพัฒนาทางด้านอื่นๆด้วย จึงจะทำให้การหมักเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์และให้ผลผลิตสูงตามที่ต้องการ

7.5 การควบคุมสภาพการหมัก (วราวุฒิและรุ่งนภา , 2532)

ในระหว่างการหมักจำเป็นจะต้องควบคุมปัจจัยที่สำคัญหลายอย่าง เช่น การให้อากาศ การกวน อุณหภูมิ และเวลาในการบ่ม เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด ในการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริก จัดเป็นการหมักในสภาพมีอากาศ (aerobic fermentation) ดังนั้นเชื้อราจึงจำเป็นต้องได้รับอากาศ โดยอาศัยการให้อากาศและการกวน ทั้งสองระบบนี้จะช่วยทำให้เกิดการแผ่กระจายออกซิเจนในน้ำหมักได้ดี แต่ทั้งนี้จะต้องขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และขนาดของถังหมักเป็นสำคัญ การให้อากาศและการกวนจะช่วยทำให้มีออกซิเจนเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและทำการปล่อยกรดซิตริกจากเส้นใยสู่น้ำหมักเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพในการหมักในสภาพอาหารเหลว ส่วนการหมักในสภาพอาหารแข็ง อากาศที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริกจะได้จากอากาศที่แพร่ผ่านตามช่องว่างของสับสเตรท(void fraction) ในการหมักระบบนี้จะไม่สามารถใช้การกวนหรือการเขย่าได้

7.6 สารกระตุ้น (วราวุฒิและรุ่งนภา , 2532)

สารกระตุ้นที่ใช้เพื่อปรับปรุงผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* มีหลายชนิด เช่น เมธานอล เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ในบรรดาสารกระตุ้นดังกล่าว เมธานอลเป็นสารกระตุ้นที่ทำให้ผลผลิตของกรดซิตริกจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspergillus niger สูงขึ้นมากกว่าสารกระตุ้นชนิดอื่นๆ จากการศึกษากของ Chaudhary และคณะ (1978) พบว่าเมธานอลความเข้มข้นร้อยละ 3-4 จะช่วยทำให้มีการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์(sporulation)และในขณะเดียวกันจะส่งผลทำให้กรดซิตริกถูกสร้างมากขึ้นด้วย ทั้งนี้ อาจเนื่องจากเมธานอลไม่ได้ทำให้เมตาบอลิซึมของเชื้อราเสียหายแต่กลับส่งผลดีต่อคุณสมบัติการซึมผ่านของสารเข้า-ออกเมมเบรน (membrane) ของเชื้อรา จึงทำให้การปลดปล่อยกรดซิตริกออกมาจากเส้นใยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อมีมากขึ้น

7.7 ฟองและการควบคุม

ในขณะที่หมักกรดซิตริกนั้นนอกจากจะมีการให้อากาศและการกวนแล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อยังมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่สูง ตลอดจนเชื้อปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาด้วย จึงทำให้มีฟองเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก ฟองที่เกิดขึ้นอาจควบคุมได้โดยการเติมสารพวกไขมันหรือน้ำมันลงในน้ำหมัก น้ำมันที่เติมลงไปนอกจากลดปัญหาเรื่องฟองแล้วยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักอีกด้วย น้ำมันที่เติมอาจเป็น เนย เปรียง น้ำมันมะกอก น้ำมันหมู น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วลิสงและอื่นๆ (Noyes, 1969)

7.8 ปัจจัยอื่นๆ

การปนเปื้อนของโลหะหนัก ที่มาจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตมีความสำคัญต่อการหมักกรดซิตริก จึงมีการพยายามเพิ่มผลผลิตที่ได้จากการหมักโดยการเติมสารต่างๆดังต่อไปนี้

7.8.1 Hexacyanoferrate

ใช้ในการกำจัดคาร์บอนของโลหะที่มีในแหล่งคาร์บอนโดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็น chelating agent พบว่าผลได้ของกรดซิตริกสูงขึ้น ถ้ามี hexacyanoferrate ในสารละลายสูงกว่าปกติเล็กน้อย เนื่องจากจะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 10-200 มิลลิกรัมต่อลิตร(Rohr and Kubicek,1986)

7.8.2 Fatty material

Mills (1963) พบว่าน้ำมันธรรมชาติที่มีสัดส่วนของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงจะเพิ่มผลได้ สุดท้ายของการผลิตกรดซิตริกโดยไม่มีผลต่อผลได้สุดท้ายของน้ำหมักแห่ง Fatty material ที่ใช้ในอุตสาหกรรมหมักมักเป็นสารกำจัดฟอง ปริมาณกรดไขมันที่เหมาะสมคือร้อยละ 0.05-0.3

7.8.3 สารประกอบอื่นๆ

สารประกอบอื่นที่มีผล เช่น H_2O_2 ซึ่งจะมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ aconitase และเพิ่ม oxygen tension ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังมี Benzoic acid , Amine oxime , EDTA , Iron cyanide , Verniculite เป็นต้น (Rohr และ Kubicek , 1986)

8. การใช้ประโยชน์จากกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม (คุณณี, 2537)

กรดซิตริกที่ผลิตขึ้นเพื่อเป็นการค้า จะผลิตในรูปปราศจากน้ำหรือในรูปโมโนไฮเดรต ซึ่งการผลิตกรดซิตริกในรูปปราศจากน้ำจะได้จากการตกผลึกของสารละลายที่กรดร้อน ในขณะที่กรดซิตริกในรูปโมโนไฮเดรตได้จากการตกผลึกสารละลายที่อุณหภูมิต่ำกว่า 36.5 องศาเซลเซียส ในอุตสาหกรรมยามีการใช้กรดซิตริกอย่างกว้างขวาง ประโยชน์ของการใช้กรดซิตริกเกลือและเอสเทอร์ของกรดซิตริกมีดังนี้

8.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง

โดยใช้เป็นส่วนผสมในการทำลูกกวาด ลูกอม ผลไม้เชื่อม แยม เยลลี่ ผักผลไม้ดอง น้ำหวาน น้ำเชื่อม น้ำอัดลม น้ำผลไม้ ไวน์ อาหารแข็ง อาหารกระป๋อง เนยแข็ง ไอศกรีม และอื่น ๆ ซึ่งกรดซิตริกมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มกลิ่นรส ควบคุมความเป็นกรด ลดความฝาด ป้องกันการเปลี่ยนแปลงกลิ่นของเครื่องสำอางและอาหารแข็ง ป้องกันการขุ่นของไวน์ เป็น emulsifier ในผลิตภัณฑ์นมต่างๆ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการเก็บถนอมอาหารอีกด้วย

ข้อกำหนดในการใช้กรดซิตริกเป็นวัตถุเจือปนในอาหาร ซึ่งอนุญาตให้ปนในอาหารบางชนิดเพื่อวัตถุประสงค์ต่างกันดังนี้

1. สำหรับปรับความเป็นกรดต่าง
2. สำหรับการปรุงแต่งกลิ่นรส และป้องกันการรวมตัวเป็นก้อนของน้ำตาล
3. สำหรับป้องกันการรวมตัวเป็นก้อน
4. สำหรับป้องกันการเปลี่ยนสี กลิ่น รส และกลิ่นเสียของผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกรรมวิธีบรรจุกระป๋อง
5. สำหรับป้องกันการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็ง
6. สำหรับป้องกันการเกิดการเปลี่ยนสี กลิ่น รส และ ช่วยเสริมฤทธิ์วัตถุกันเสียของผลิตภัณฑ์อาหาร
7. สำหรับป้องกันการเกิดตะกอนของผลิตภัณฑ์อาหารดอง คือ มะกอกดอง ด้วยการใส่ปริมาณ 15,000 ppm (หนึ่งในล้านในล้านส่วน)

8.2 อุตสาหกรรมยา

ใช้เป็นส่วนผสมในการทำยาบางชนิด เป็นสารทำให้เกิดฟองฟูเมื่อผสมกับคาร์บอนเนตหรือไบคาร์บอนเนต โดยใช้ในการเตรียมยาลดกรด หรือแอสไพรินที่ละลายน้ำได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็น stabilizer ในวิตามินซีอีกด้วย การใช้ผสมกับยาจะใช้ในรูปของเกลือ หรือเอสเทอร์ของกรดซิตริก

8.3 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

ใช้เป็นส่วนผสมของครีมนวดผมและโลชั่น โดยจะควบคุมระดับพีเอชของผลิตภัณฑ์ และช่วยเพิ่มความแวววาวและความอ่อนนุ่มของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังเป็นวัตถุกันเสียอีกด้วย

8.4 อุตสาหกรรมอื่นๆ

8.1 ใช้ทำความสะอาดโลหะล้างสนิม เนื่องจากกรดซิตริกสามารถรวมตัวกับโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ได้เป็นอย่างดี

8.2 ใช้ผสมกับผงซักฟอกในรูปของไตรโซเดียมซิเตรตแทนการใช้โซลโฟสเฟต เพื่อช่วยในการทำความสะอาดให้ดีขึ้น

8.3 ใช้เป็น plasticizer ในแผ่นฟิล์มพลาสติกที่ใช้ห่อหุ้มอาหารในรูปของไตรเอทิล (triethyl) ไตรบิวทิล (tributyl) และอะซิลิล ไตรบิวทิลเอสเทอร์ (acetyl tributyl ester) เนื่องจากไม่มีความเป็นพิษ

8.4 ใช้เป็นส่วนผสมของหมึกพิมพ์ น้ำและสี

8.5 ใช้เป็น softener ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น

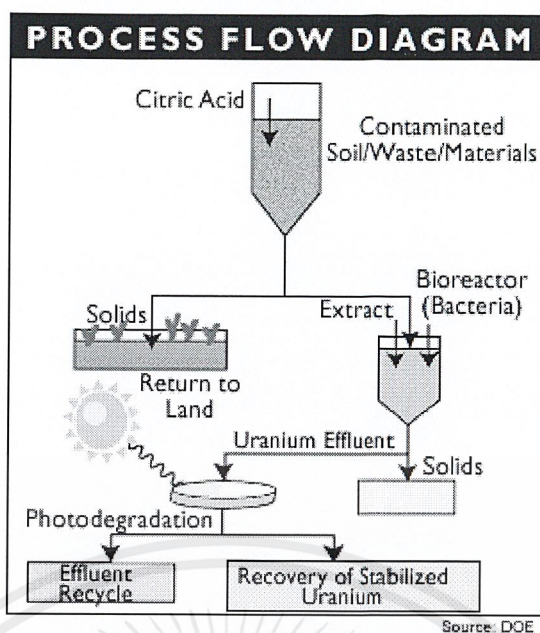
8.6 ใช้ในการกำจัดของเหลือทิ้งมีพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน ซึ่งได้แก่ โลหะหนัก และ สารกัมมันตภาพรังสี ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก (รูปที่ 2-9) คือ

8.6.1 การสกัดแยก โลหะหนักและสารกัมมันตภาพรังสีออกจากดิน โดยวิธีการล้างดินด้วยสารละลายกรดซิตริก กรดซิตริกจะจับตัวกับเหล็กและสารกัมมันตภาพรังสี อยู่ในรูป metal citrate complex

8.6.2 การย่อยสลายทางชีวภาพ โดยแบคทีเรียจะทำการย่อยสลาย metal citrate complex ให้อยู่ในรูปที่ไม่มีอันตราย ยกเว้น uranyl citrate complex ซึ่งแบคทีเรียไม่สามารถย่อยได้ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีการในขั้นที่ 3 คือ การย่อยสลายทางกายภาพ

8.6.3 การย่อยสลายทางกายภาพ ได้แก่ การใช้แสงจากดวงอาทิตย์ แสงสามารถทำลายพันธะระหว่าง citrate และ uranium ได้

เหล็กและสารกัมมันตภาพรังสีที่ถูกกำจัดได้โดยวิธีนี้ ได้แก่ Cd , Pb , Zn , Cu , uranium , thorium , plutonium , cobalt , cesium และ strontium



รูปที่ 2-9 กระบวนการกำจัดของเหลือทิ้งมีพิษโดยใช้กรดซิตริก

ที่มา : http://www.enn.com/enn-new-archive/1999/01/010699/citric_971.asp

นอกจากประโยชน์ต่างๆที่กล่าวมาแล้ว เกลือของกรดซิตริกยังมีประโยชน์ในทางการแพทย์อีกด้วย เช่น เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท (ferric ammonium citrate) ใช้ในการรักษาโรคโลหิตจาง หรือการใช้ไตรโซเดียมซิเตรท(trisodium citrate) ในการเก็บรักษาเลือด โดยป้องกันเลือดไม่ให้เกาะกันเป็นก้อน

อุตสาหกรรมการผลิตกรดมะนาวเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่รัฐบาลมีบทบาทมากในด้านการคุ้มครอง และส่งเสริมผู้ผลิตภายในประเทศ มาตรการคุ้มครองได้แก่ การเก็บภาษีศุลกากรนำเข้า และการเก็บค่าธรรมเนียมพิเศษ มาตรการคุ้มครองของรัฐบาลเป็นปัจจัยที่ทำให้อุตสาหกรรมกรดมะนาวอยู่รอดและสามารถแข่งขันกับกรดมะนาวนำเข้าได้ ซึ่งรัฐบาลให้การคุ้มครองโดยให้การต่ออายุการเก็บค่าธรรมเนียมพิเศษทุกปี

ถ้าหากพิจารณาทางด้านอุปสรรคในการเข้าสู่ตลาด จากการศึกษา (วิสุทธิ์ , 2534) พบว่า ลักษณะโครงสร้างของอุตสาหกรรมกรดมะนาวบางประการ ได้เอื้อต่อการเกิดอุปสรรคในการเข้าสู่ตลาดของผู้ผลิตรายใหม่ กล่าวคือ ลักษณะของกรดมะนาวเอง มีขนาดไม่ใหญ่มากนัก จากขนาดตลาดที่ไม่ใหญ่พอทำให้การผลิตมีต้นทุนสูง และต้องมีการแข่งขันกับกรดมะนาวที่นำเข้าจากต่างประเทศ ทางด้านแนวโน้มในอนาคตเกี่ยวกับมาตรการและนโยบายของรัฐบาลที่จะส่งผลกระทบต่อภารกิจกีดกันผู้ลงทุนรายใหม่นั้น รัฐบาลได้มีมาตรการลดภาษีและการใช้ระบบภาษีมูลค่าเพิ่ม นับว่าเป็นมาตรการโดยทั่วไปเกี่ยวกับการส่งเสริมอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีซึ่งส่งผลกระทบต่อการลงทุนในอุตสาหกรรมกรดมะนาวอีกด้วย และการศึกษาพบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่าความต้องการกรดอะมิโนจะมีเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณการผลิตสินค้าที่ใช้กรดอะมิโน เช่น เครื่องดื่ม ผัก-ผลไม้กระป๋อง เป็นต้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

- *Aspergillus niger* TISTR 3089

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารสูตร Potato dextrose agar

2.2 น้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ ใช้ส่วนผสมที่ได้จากการบิบบเมล็ดโกโก้สด

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1 เครื่องมือพื้นฐานทางชีววิทยา

3.2 เครื่องคั้นน้ำแบบบีบอัด

3.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.5 เครื่องกรองโดยใช้ความดัน

3.6 เครื่องย่อย (digestor)

3.7 เครื่องกลั่น (distillator)

3.8 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

3.9 เครื่องอบสารร้อน (hot air oven)

3.10 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ (auto clave)

3.11 เดซิเคเตอร์ (desicator)

4. วิธีการทดลอง

4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และ คุณลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยวิธีวิเคราะห์

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง
- ไนโตรเจนทั้งหมด
- ปริมาณโปรตีน
- ของแข็งแขวนลอย (suspended solid)
- ของแข็งทั้งหมด (total solid)

ตามวิธีของ APHA , AWWA และ WPCF (1992)

- น้ำตาลรีดิวิซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ปริมาณกรดซัลฟิวริกเริ่มต้น
- แร่ธาตุ บางชนิดเช่น ทองแดง แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม แมงกานีส และสังกะสี (วิเคราะห์โดยเครื่อง Atomic Absorbtion)

4.2 ศึกษาผลของแร่ธาตุบางชนิด ที่มีต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการผลิตกรดซัลฟิวริกจากเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3089 เช่น Mn^{2+} , Mg^{2+} และ PO_4^{2-}

4.2.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เลี้ยง *Aspergillus niger* TISTR 3089 บนอาหาร PDA แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อจะเจริญเต็มที่ จากนั้นนำสารละลายสปอร์มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ให้มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

4.2.2 การเตรียมหัวเชื้อ

นำน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 45 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที เติมหุ้นเริ่มต้น 5 มิลลิลิตรนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.2.3 ศึกษาผลของแร่ธาตุบางชนิดที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดซัลฟิวริก เช่น Mn^{2+} , Mg^{2+} และ PO_4^{2-}

4.2.3.1 ศึกษาความเข้มข้นของ แมงกานีสไอออน

โดยเลี้ยง *Aspergillus niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 ปริมาตร 45 มิลลิลิตรเติม $MnSO_4 \cdot H_2O$ ลงในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ปริมาณ 0 0.1534 0.2302 0.3070 0.3839 และ 0.4607 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อให้มีความเข้มข้นของ แมงกานีสไอออน 0.33 50 75 100 125 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ปริมาณ Mn^{2+} ในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ มีค่า 0.333 มิลลิกรัมต่อลิตร) นำไปฆ่าเชื้อ เติมหุ้นเชื้อที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ซึ่งเลี้ยงในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ขวดละ 5 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน เพื่อทำการวิเคราะห์หากรดซัลฟิวริก ด้วยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Nelson วิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่างด้วย pH meter วิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยการหาน้ำหนักแห้งและนำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ทางสถิติ

4.2.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของ แมกนีเซียมไอออน

โดยเลี้ยง *Aspergillus niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 ปริมาตร 45 มิลลิลิตรเติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ลงในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ปริมาณ 0 10.0995 20.2324 30.3686 40.5031 และ 50.6376 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นของ แมกนีเซียมไอออนเป็น 13.8 1,000 2,000 3,000 4,000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปฆ่าเชื้อ เดิมหัวเชื้อที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ซึ่งเลี้ยงในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ขวดละ 5 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 4.2.3.1

4.2.3.3 ศึกษาความเข้มข้นของ ฟอสเฟตไอออน

โดยเลี้ยง *Aspergillus niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เติม KH_2PO_4 ปริมาณ 0 2.8583 5.7238 8.5894 11.4549 และ 14.3202 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อให้มีความเข้มข้นของฟอสเฟตไอออนเป็น 20.25 2,000 4,000 6,000 8,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปฆ่าเชื้อ เดิมหัวเชื้อที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ซึ่งเลี้ยงในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ขวดละ 5 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 4.2.3.1

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปราย

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ ลักษณะของน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ได้จะมีสีขาวขุ่น มีความหนืด มีกลิ่นหอมอ่อนๆ มีรสเปรี้ยวอมหวานเล็กน้อย เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างเป็นกรด มีปริมาณไนโตรเจน ของแข็งแขวนลอย ของแข็งทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้

พารามิเตอร์	ความเข้มข้น
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	3.73
ไนโตรเจน	0.117(ร้อยละ)
โปรตีน	0.731(ร้อยละ)
ของแข็งทั้งหมด	564.12 มิลลิกรัมต่อลิตร
ของแข็งแขวนลอย	86.07 มิลลิกรัมต่อลิตร
น้ำตาลรีดิวซ์	1.221 (ร้อยละ)
ปริมาณกรดทั้งหมด	0.742 (ร้อยละ)
กรดซิตริกเริ่มต้น	0.604 (ร้อยละ)
แร่ธาตุบางชนิด	
-ทองแดง (Cu)	0.075 (พีพีเอ็ม)
-เหล็ก(Fe)	1.032 (พีพีเอ็ม)
-แมกนีเซียม(Mg)	0.138x10 ² (พีพีเอ็ม)
-แมงกานีส(Mn)	0.333 (พีพีเอ็ม)
-แคลเซียม(Ca)	9.240 (พีพีเอ็ม)
-สังกะสี(Zn)	0.385 (พีพีเอ็ม)

2. ผลของแร่ธาตุบางชนิดที่มีต่อการผลิตกรดซิตริก

2.1 ศึกษาความเข้มข้นของแมงกานีสไอออน(Mn²⁺)

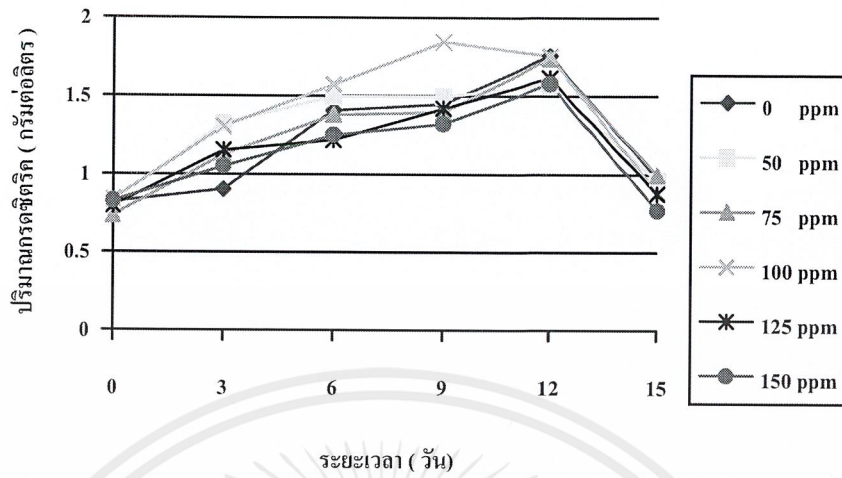
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการผลิตกรดซิดริกโดย *A. niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 และใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สถานะของการหมัก 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเติม แมงกานีสไอออน ในรูป $MnSO_4 \cdot H_2O$ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ แมงกานีสไอออน ที่แตกต่างกันโดยมีความเข้มข้นของแมงกานีสไอออน 0 50 75 100 125 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน พบว่า การเติมแมงกานีสไอออน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดซิดริกสูงสุดเป็น 1.8441 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการหมัก ขณะที่การเลี้ยงที่มีการเติม แมงกานีสไอออนความเข้มข้น 0 50 75 125 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณกรดซิดริกสูงสุดในวันที่ 12 ของการหมัก คือ 1.7578 1.5747 1.7395 1.6166 และ 1.5765 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 4-1 เมื่อนำปริมาณกรดซิดริกที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณกรดซิดริกที่ได้จากการเติมแมงกานีสไอออน 100 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเติมแมงกานีสไอออนที่ความเข้มข้นอื่น และการไม่เติมแมงกานีสไอออน

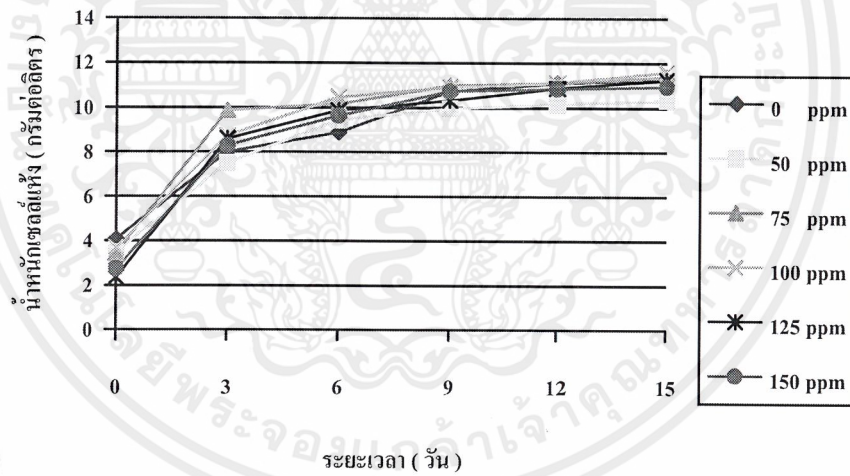
การศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงในสถานะที่มีความเข้มข้นของแมงกานีสไอออน เป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุด คือ 11.59 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการหมัก ขณะที่มีความเข้มข้นของแมงกานีสไอออน 50 75 125 150 และไม่เติมแมงกานีสไอออน น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เป็น 10.33 11.39 11.23 10.96 และ 11.31 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 4-2

การศึกษาความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่มีความเข้มข้นของ Mn^{2+} 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าต่ำสุดในวันที่ 9 ของการหมัก คือ 2.33 ดังรูปที่ 4-3 และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่เติม แมงกานีสไอออนให้มีความเข้มข้น 50 75 125 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติม แมงกานีสไอออน มีค่าต่ำสุดในวันที่ 12 ของการหมัก คือ 2.27 2.23 2.23 2.22 และ 2.58 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4-3

การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในอาหารที่เติมแมงกานีสไอออน 50 75 125 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติมแมงกานีสไอออน ลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าต่ำสุดในวันสุดท้ายของการหมัก โดยมีค่า 0.0147 0.0198 0.0157 0.0155 0.0154 และ 0.0144 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 4-4

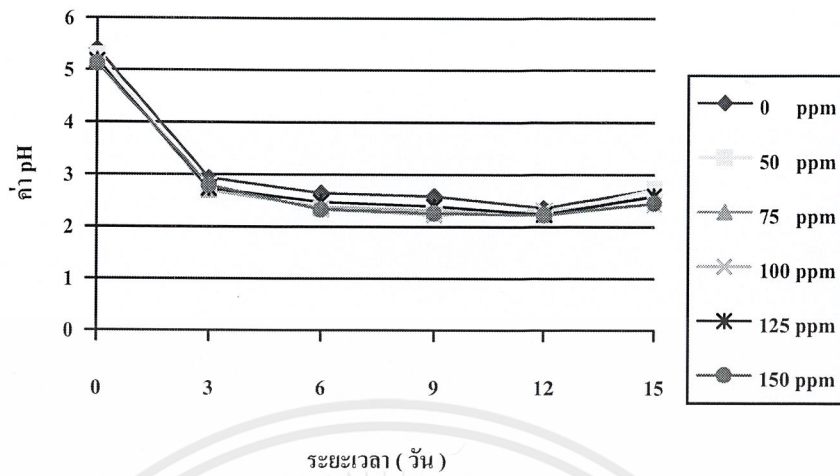


รูปที่ 4-1 ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ความเข้มข้นของแมงกานีสไอออนแตกต่างกัน

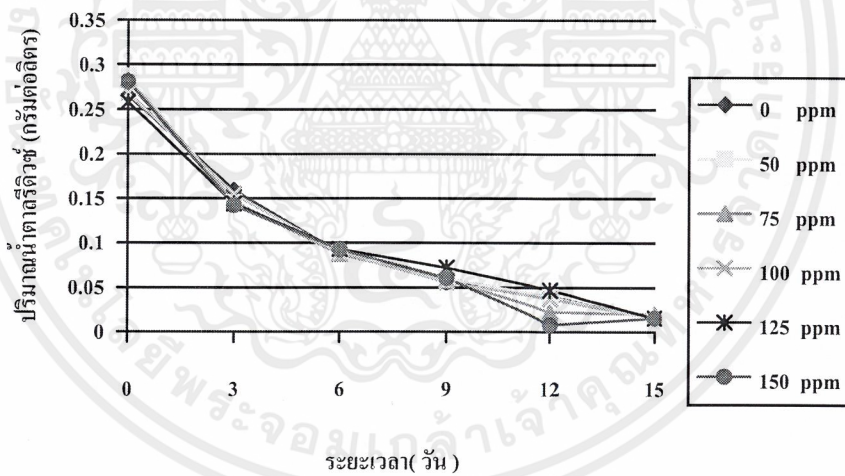


รูปที่ 4-2 นำหนักเซลล์แห้งที่ความเข้มข้นของแมงกานีสไอออนแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียไอออนแตกต่างกัน



รูปที่ 4-4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียไอออนแตกต่างกัน

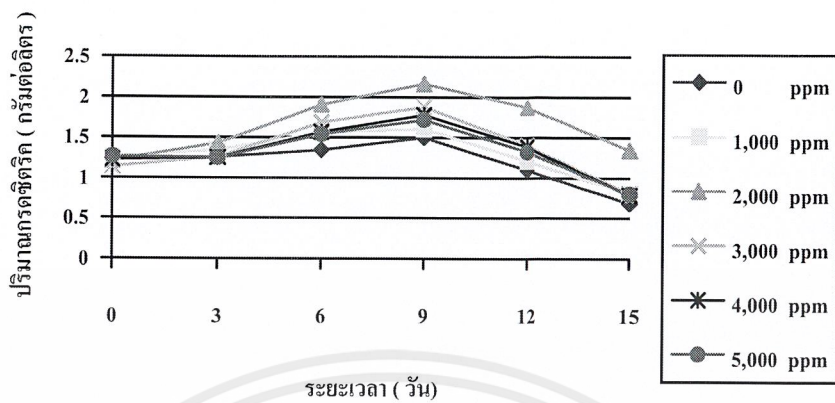
2.2 ศึกษาความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+})

จากการศึกษาการผลิตกรดซิตริกโดย *A.niger* TISTR 3089 ที่เลี้ยงในน้ำสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้และมีการเติม Mg^{2+} ในรูป $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ แมกนีเซียมไอออนที่แตกต่างกันคือ 1,000 2,000 3,000 4,000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของ แมกนีเซียมไอออน 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดเป็น 2.16 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ขณะที่การเติม แมกนีเซียมไอออน ที่ความเข้มข้น 1,000 3,000 4,000 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติม แมกนีเซียมไอออน จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 9 โดยมีค่า 1.61, 1.88, 1.78, 1.72 และ 1.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 4-5 และเมื่อนำปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเติม แมกนีเซียมไอออน มาวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับการหมักที่เติม แมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

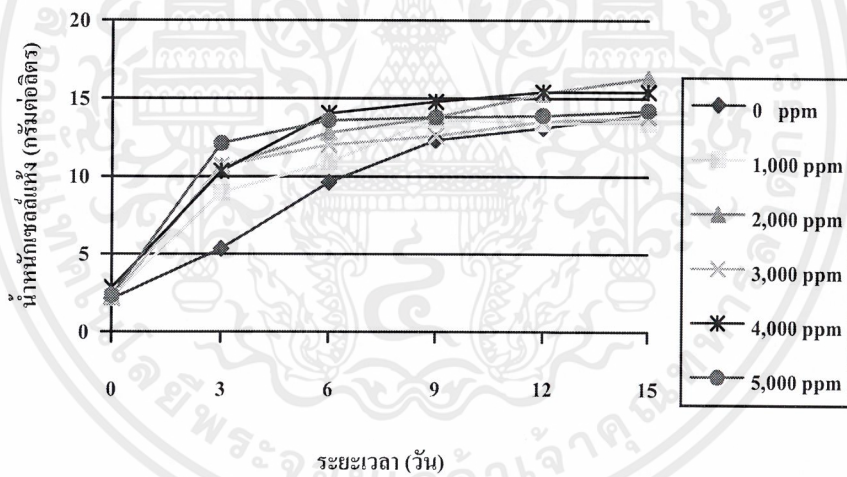
การศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ แมกนีเซียมไอออน 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าสูงที่สุดคือ 16.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 15 ของการหมัก ดังรูปที่4-6 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่เติม แมกนีเซียมไอออนในวันเดียวกันซึ่งมีความเข้มข้นของ แมกนีเซียมไอออน เป็น 1,000 2,000 3,000 4,000 5,000 และไม่เติม แมกนีเซียมไอออน จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 13.4 13.8 15.4 14.2 และ 10.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การศึกษาค่าความเป็นกรดต่างของน้ำหมัก พบว่าค่าความเป็นกรดต่างของน้ำหมักที่ความเข้มข้นของ Mg^{2+} 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แมกนีเซียมไอออนความเข้มข้นอื่นในวันที่ 9 ของการหมักคือ 1.66 ดังรูปที่4-7 และค่าความเป็นกรดต่างของน้ำหมักที่เติม แมกนีเซียมไอออน เป็น 1,000 3,000 4,000 5,000 และไม่เติม แมกนีเซียมไอออน มีค่าต่ำสุดในวันที่ 9 ของการหมักโดยมีค่า 1.91 1.82 2.09 2.08 และ 1.97 ตามลำดับ

การศึกษาน้ำตาลรีดิวซ์ในการหมักพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่เติมแมกนีเซียมไอออน 1,000 2,000 3,000 4,000 5,000 และไม่เติม แมกนีเซียมไอออนจะลดลงอย่างต่อเนื่อง และต่ำสุดในวันสุดท้ายของการหมัก ดังรูปที่4-8 โดยมีค่า 0.0116 0.034 0.0211 0.019 0.017 0.0152 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

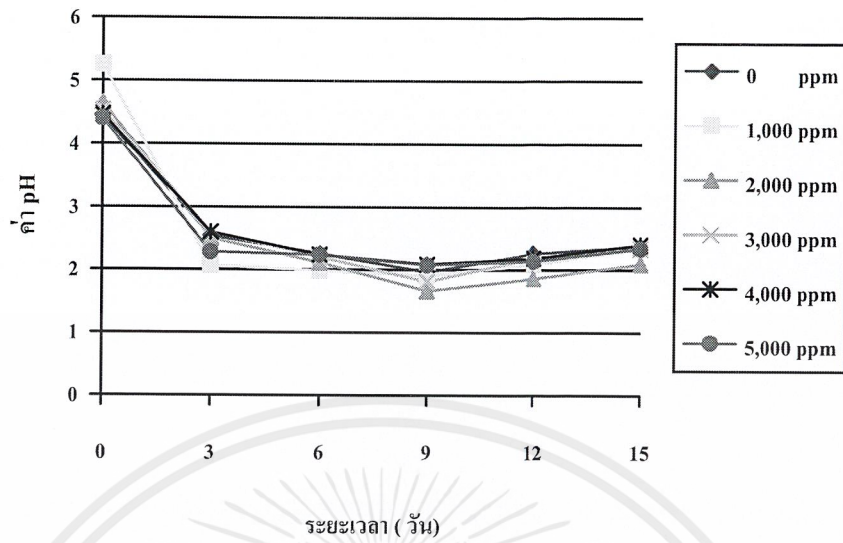


รูปที่ 4-5 ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไฮโอคลอไรด์แตกต่างกัน

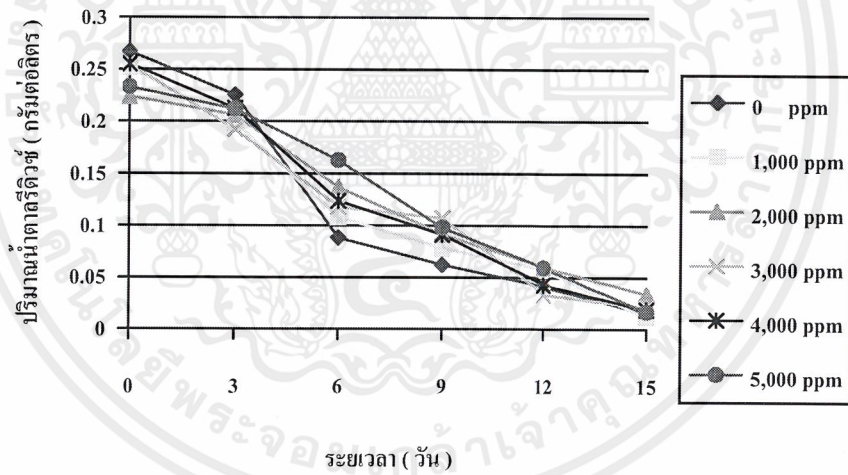


รูปที่ 4-6 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไฮโอคลอไรด์แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-7 ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนแตกต่างกัน



รูปที่ 4-8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

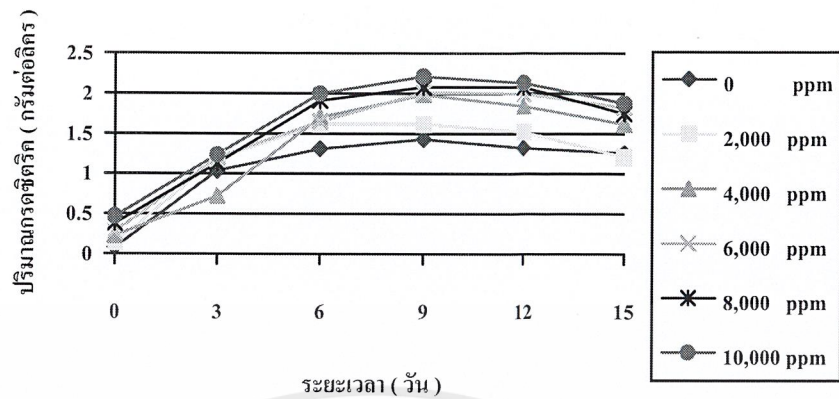
2.3 ศึกษาความเข้มข้นของ ฟอสเฟตไอออน (PO_4^{2-})

จากการศึกษาการผลิตกรดซิตริก โดย *A. niger* TISTR 3089 ที่เลี้ยงในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ และมีการเติม PO_4^{2-} ในรูป KH_2PO_4 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ ฟอสเฟตไอออน ที่แตกต่างกันโดยเติม ฟอสเฟตไอออน 2,000 4,000 6,000 8,000 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นของ ฟอสเฟตไอออน 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดเป็น 2.2154 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการหมักขณะที่การเติม ฟอสเฟตไอออน ที่ความเข้มข้น 4,000 6,000 8,000 และไม่เติม ฟอสเฟตไอออน จะมีปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 9 เช่นกัน โดยมีค่า 1.6192 1.9840 2.0131 2.08 และ 1.4275 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 4-9 และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเติม ฟอสเฟตไอออน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

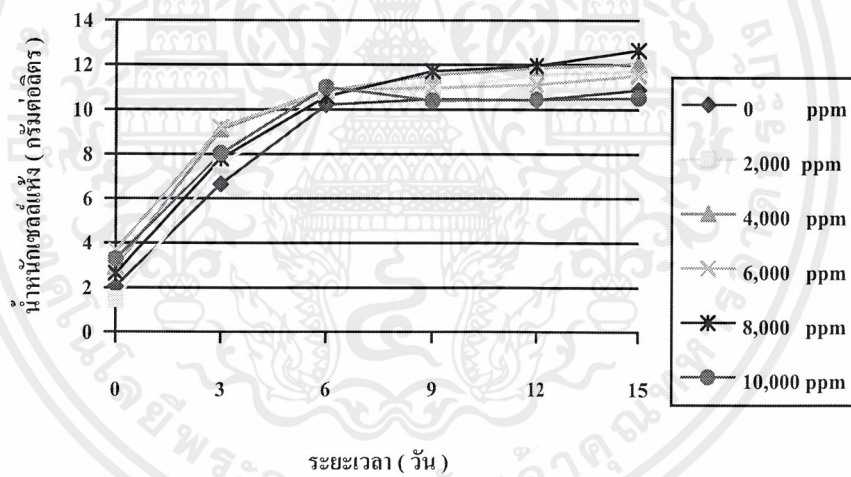
การศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติม ฟอสเฟตไอออน 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุดคือ 10.51 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการหมัก ดังรูปที่ 4-10 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่เติม ฟอสเฟตไอออน 2,000 4,000 6,000 8,000 และไม่เติม ฟอสเฟตไอออน จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 11.72 12.05 11.52 12.65 และ 10.88 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่ความเข้มข้นของ ฟอสเฟตไอออน 10,000 กรัมต่อลิตร มีค่าต่ำสุดในวันที่ 9 ของการหมัก คือ 1.6 ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่เติม ฟอสเฟตไอออน เป็น 2,000 4,000 6,000 8,000 และ ไม่เติม ฟอสเฟตไอออน มีค่าต่ำสุดในวันที่ 9 ของการหมักคือ 2.2 2.22 2.18 2.36 และ 2.19 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4-11

การศึกษาน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่เติมฟอสเฟตไอออน ความเข้มข้น 2,000 4,000 6,000 8,000 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติม ฟอสเฟตไอออน ลดลงอย่างต่อเนื่องและลดลงต่ำสุดในวันสุดท้ายของการหมัก ดังรูปที่ 4-12 โดยมีค่า 0.034 0.064 0.026 0.025 และ 0.015 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

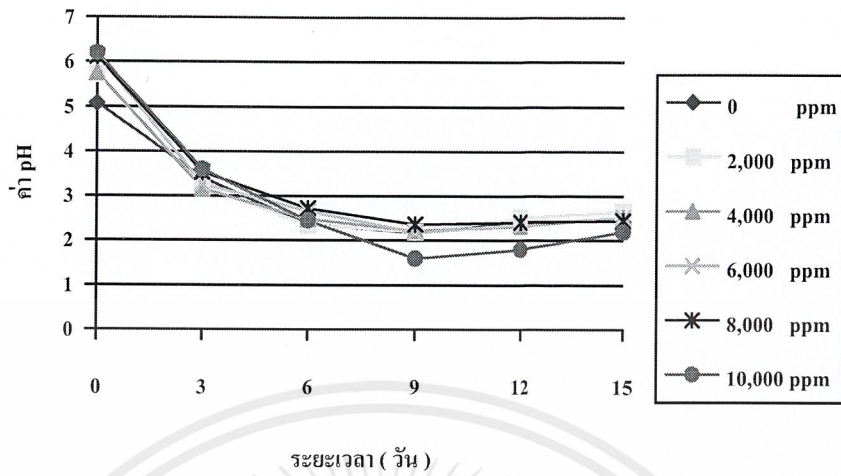


รูปที่ 4-9 ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตแตกต่างกัน

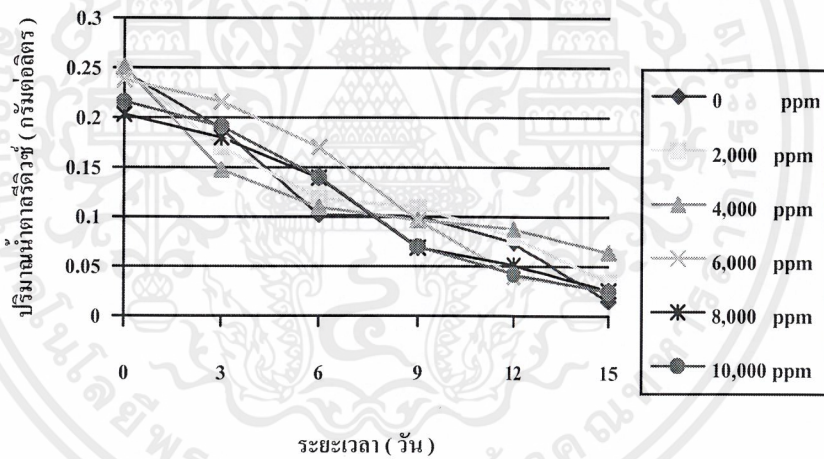


รูปที่ 4-10 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-11 ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตแตกต่างกัน



รูปที่ 4-12 ปริมาณน้ำตาเลรีดิวิซ์ในน้ำหมักที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตแตกต่างกัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3089 ในสภาวะการเลี้ยงแบบขวดเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงคือ น้ำสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ ความเข้มข้นร้อยละ 25 และ มีการเติมแร่ธาตุในอาหารดังกล่าวได้แก่ แมงกานีสไอออน , แมกนีเซียมไอออน และ ฟอสเฟตไอออน โดยการเติมในรูปของ $MnSO_4 \cdot H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ KH_2PO_4 ตามลำดับ พบว่า ในสภาวะการผลิตกรดซิตริกที่เติม $MnSO_4 \cdot H_2O$ ลงในน้ำสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ แมงกานีสไอออน คือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดคือ 1.8441 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการหมัก และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงที่ความเข้มข้นของแมงกานีสไอออนอื่น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเติม แมงกานีสไอออน ไม่มีผลในการช่วยให้มีการผลิตกรดซิตริกเพิ่มมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักรีดิวซ์แห้ง จะสัมพันธ์กับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อผลิตขึ้น โดยพบว่าเมื่อปริมาณกรดซิตริกสูง ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดต่ำลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็จะลดลงเรื่อย ๆ จนถึงที่สุด การหมัก และน้ำหนักรีดิวซ์แห้งมีการเปลี่ยนแปลงไปในทางเดียวกันกับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อผลิตขึ้น

ในสภาวะการหมักกรดซิตริกที่เติม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ลงในน้ำสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของ แมกนีเซียมไอออน คือ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดคือ 2.16 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการหมัก และเมื่อเปรียบเทียบกับทางสถิติกับปริมาณของกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงที่ความเข้มข้นของ แมกนีเซียมไอออนอื่น ๆ รวมทั้งที่ไม่เติม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเติม แมกนีเซียมไอออน มีผลช่วยให้มีการผลิตกรดซิตริกเพิ่มสูงขึ้น สำหรับการเปลี่ยนแปลงของ น้ำหนักรีดิวซ์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ให้ผลสอดคล้องกับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อผลิตขึ้นเช่นเดียวกันกับการเติมแมงกานีสไอออน

ในสภาวะการหมักกรดซิตริกที่เติม KH_2PO_4 ลงในน้ำสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ฟอสเฟตไอออน คือ 10,000 กรัมต่อลิตร โดยจะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดคือ 2.2154 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการหมัก เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเติม ฟอสเฟตไอออน ที่ความเข้มข้นต่างๆ และไม่เติม ฟอสเฟต

ไอออน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งจะเห็นว่าการเติม ฟอสเฟตไอออน ไม่ช่วยในการเพิ่มการผลิตกรดซิตริกแต่อย่างใด

ข้อเสนอแนะ

1. ควรที่จะศึกษาการใช้แร่ธาตุในความเข้มข้นที่เหมาะสมร่วมกัน
2. การศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อรา ควรลดระยะเวลาในการหมักเป็น 9 วัน เพียงพอแล้ว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- จิระนันท์ เหมพูลเสริฐ. 2533. การนำวัสดุเหลือทิ้งและวัตถุดิบราคาถูกบางชนิดมาผลิตเป็นกรดมะนาวโดยใช้เชื้อ *Candida lipolytica*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- ฉัตร ชำชอง และ วุฒิ หวังวัชรกุล. 2528. การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพและศักยภาพการผลิตและการใช้กรดอินทรีย์รวมทั้งความต้องการในการวิจัยและพัฒนาประเทศไทย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 40 น.
- คุณณี ธนะบริพัฒน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 415 น.
- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กรุงเทพฯ. 2526. มาตรฐานอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริก. (มอก.464-2526)
- วิสุทธิ กิตติสมุทร์ .2534. การศึกษาภาวะการผูกขาดอุตสาหกรรมกรดมะนาวในประเทศไทย. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. 2529. กรดซิตริก วารสารเศรษฐศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์. 5(3) : 405-423.
- Banik, A.K. 1975. Fermentative production of citric acid by *Aspergillus niger* strain selection and optimum cultural conditions for improved citric acid production .J.Fd.Sci and Technol. India. 12 : 111-114.
- Chaudhary , K., Kakshminarayana, K., Dev., I.K. and Vyes , S.R. 1974. Nitrosoguanidine Induced mutation of *Aspergillus niger* for obtaining high citric acid producing mutant. Ind. J. Microbiol. 14 : 42-43.
- Chaudhary , K.,S. Ethiraj , K. Lakshminarayana and P.Tauro. 1978. Citria acid production from Indian cane molasses by *Aspergillus niger* under solid state fermentation conditions .J. Ferment .Technol.56(5) : 554-557.
- Currie ,J.N.1917.The citric acid fermentation of *Aspergillus niger* . J.Biol.Chem. 31 : 15-37.
- Das , A. 1972. Strain selection in Citric acid fermentation .Curent Sci. 41 : 593-596
- Dittmar ,E.K. 1956. A composicao da polpa diferents variedades de cacau da Bahai. Instiituto de Tecnologia da Bahai . Boletim 14 : 9 p.

- Doelger, W.P., and Prescott, S.C. 1934. Citric acid fermentation. *Ind. Eng. Chem.* 26 : 1142.
- EI-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) : 411-46.
- Kubicek , C.P. and M.Rohr. 1986. Citric acid fermentation. *CRC. Reviews in biotechnol.* 3 : 331-373.
- Noyes, R. 1969. Citric acid production process. New Jessy, U.S.A.
- Porgers, n.1932. *Am. J. Botany.* 19 : 559-567. *In: Industrial . Microbiology.* (ed. S.C. Prescott, and C.G.Dunn), 3rd ed., pp. 533-577, McGraw-Hill Book Comp. Inc., N.Y., Toronoto, London. 1959.
- Presscott , S.C. and Dunn, C.G. 1959. *Industrial Microbiology.* 3rd ed., McGraw-Hill Book Comp. Inc., N.Y., Toronoto, London. pp. 533-577.
- Rohr, M. and C.P. kubicek. 1981. Regulatory Aspects of citric acid by *Aspergillus niger*. *Proc. Biochem.* 16 : 34-37.
- Shankarand , V.S. and Losane , B.K., Ability of *Aspergillus niger* to Tolerate Metal Ions and Minerals in s Solid-State Fermentation System for the Production of Citric Acid . *Process Biochemistrý* .,29 (1994) 29-37.
- Sherard., M.W. 1963. U.S. Patent. 3,083,144.
- Steel, R., S.M. Martin and C.P. Lentz. 1955. A standard inoculum for citric acid production in submerged culture. *Can. J. Microbiolo.* 1 : 150-157.
- Stem , J.R. 1957 . Assay of tricarboxylic acid . In colowick , S.P. and Kaplan , N.O.(eds.) , *Method in Enzymology* , vol. 3 , PP.425-428 . New York : Academic Press.
- Verhoff , F.H. and J.E. Spradlin . 1976 Mass and Energy balance analysis. of metabolic Pathways applied to citric acid production by *A.niger* . *Biotechnol. Bioeng.* 18 : 425p
- Wehmer., C. 1893. Note sur la fermentation citrique. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 9:728-730.
- Wood , G.J.B. and Lass , R.A. 1985. *Cocoa* , 4th ed., Tropical Agriculture Serie. Longman, New York.

http://www.accessexcellence.org/AB/GG/glycoCit_prec.html

http://www.enn.com/enn-new-archive/1999/01/01069/citric_971.asp

<http://chemistry.gsu.edu/glactone/PDB/proteins/krebs/krebs.html>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์น้ำตาลกักเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้

ก. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Somogyi Nelson's method

-สารละลาย Copper reagent ประกอบด้วย

1. 10% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 มิลลิลิตร (10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)
2. Phosphate-tartrate solution เตรียมโดยสารละลาย Na_2HPO_4 28 กรัม (หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 70.5495 กรัม) ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Sodium Potassium Tartrate(Tetrahydrat) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติม 1N NaOH 100 มิลลิลิตร ตามด้วย Na_2SO_4 (Anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษ Whatman NO.4
3. ผสมสารละลายในข้อ 1 (100 มิลลิลิตร) และข้อ 2 (900 มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน)

Nelson' Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

1. ละลาย Ammoniummolybdate $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. Disodium arsenate $(\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร
3. ผสมสารละลายในข้อ 1 และข้อ 2 เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำเก็บที่อุณหภูมิห้อง และควรเก็บในขวดสีชา

วิธีการ

1. เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้ว เติม 1 มิลลิลิตร Copper reagent แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้หลอดแก้ววางบนปากหลอดแก้ว เพื่อลดการระเหยของน้ำ
2. ทำให้เย็น โดยแช่ในอ่างน้ำ เติม Arsenomolybdate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จะเห็นสีเขียวหรือน้ำเงินเขียว ขึ้นกับปริมาณน้ำตาล
3. เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

คำนวณ

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

ข. การหาน้ำหนักแห้ง : ดำเนินงานตามวิธีของ Miller Method ดังนี้

วิธีการ

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

2. นำตัวอย่างที่ทำการแยกโดยผ่านกระดาษกรอง Whatman นำตะกอนที่ได้พร้อมกระดาษกรองไปใส่ในกระดาษอะลูมิเนียมที่อบไว้

3. อบที่ 80 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ประมาณ 24-48 ชั่วโมง

4. นำมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก (W_2)

5. นำค่าน้ำหนักมาทำการคำนวณก็จะได้น้ำหนักแห้งของเซลล์ในอาหารต่อ

ปริมาตรตัวอย่าง

คำนวณ

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

ค. การวิเคราะห์หาระดับความเป็นกรด-ด่าง

วิธีการ

ใช้เครื่อง pH meter ในการวัดจากตัวอย่าง ทำการอ่านค่าที่ได้

ง. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (โดยวิธีกรดบอริก)

สารเคมี

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4,000 กรัมในน้ำกลั่น 10 ลิตร

- กรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 ผสมกับบรอมครีซอล กรีน และเมทิลเรด

ละลายกรดบอริก 400 กรัม ในน้ำกลั่น 6 ลิตร นำไปตั้งบน hot plate ต้มนจนละลายหมด เติมน้ำกลั่นที่ร้อน 3 ลิตร ทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง เติมบรอมครีซอล กรีน 100 มิลลิลิตร และ เมทิลเรด 70 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาณ 10 ลิตร คนให้เข้ากันดี

ดูดสารละลายกรดบอริกมา 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ถ้าสารละลายในขวดรูปชมพู่ยังคงมีสีแดง ให้ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1

นอร์มอล จนกระทั่งกลายเป็นสีม่วงเทา คำนวณปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่จำเป็นต้องเติมลงในกรดบอริก 10 ลิตร

มิลลิลิตรของ 1.0 โมลาร์ Alkali = มิลลิลิตรของการไทเทรต X 40

เติมปริมาณที่คำนวณได้ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ลงในสารละลายกรดบอริกผสมให้เข้ากัน

- กรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล

เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 17 มิลลิลิตรใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร หาคความเข้มข้นที่แน่นอนโดยไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 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 จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 265 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง หรืออุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์

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

คำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลาย } \text{Na}_2\text{CO}_3 \text{ (เป็นนอร์มอล)} = \frac{\text{น้ำหนัก } \text{Na}_2\text{CO}_3 \text{ X 2 X 1,000}}{106 \text{ X 100}}$$

- การทำ standarize กรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล (เพื่อหาคความเข้มข้นที่แน่นอน)
- 1. ปิเปต สารละลาย Na_2CO_3 ที่เตรียมไว้ 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร
- 2. หยดเมทิล ออเรนจ์ 2 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ จะได้สารสีเหลือง
- 3. ใส่กรดไฮโดรคลอริกที่ต้องการทราบความเข้มข้นในบิวเรต
- 4. นำสารละลาย Na_2CO_3 ที่อยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่มาไทเทรตกับกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอลจนถึงจุดยุติ สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีจางไป จดปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้

- นำไปให้ความร้อน จนเดือดน้อยๆ เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเหลือง ให้ทิ้งไว้จนเย็นแล้วนำมาไตเตรตจนถึงจุดยุติอีก
- นำปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไตเตรตได้มารวมกัน
- ทำซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย

คำนวณ

$$N(\text{HCl}) = \frac{\text{มิลลิลิตร } \text{Na}_2\text{CO}_3 \times N(\text{Na}_2\text{CO}_3)}{\text{มิลลิลิตร HCl}}$$

วิธีวิเคราะห์

- ชั่งตัวอย่าง 0.9 -1.0 กรัม ใส่ลงในกระดวยกรองแล้วใส่ลงใน digestion tube
- ใส่ K_2SO_4 3.9 กรัมและ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.4 กรัม
- เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตรเขย่าเบาๆ
- นำ digestion tube วางลงในเครื่องย่อย ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 องศาเซลเซียส แล้วเปิดเครื่องดูดควัน
- ย่อยเป็นเวลา 50 นาที จนได้สารละลายใสสีเขียวหรือสีฟ้า นำออกมาจากเครื่องย่อยตั้งทิ้งไว้ในเครื่องดูดควัน เพื่อให้หมดควัน เติมน้ำลงใน digestion tube พอประมาณ แล้วนำไปเข้าเครื่องกลั่น
- เปิดก๊อกน้ำเพื่อหล่อเย็นเครื่องควบแน่นและเปิด power ของเครื่องกลั่น (kjeltec)
- เปิดปุ่ม Alkali = 2-3 จนแน่ใจว่าในท่อต่างๆ ไม่มีฟองอากาศเหลืออยู่
- warm เครื่องกลั่น โดยใช้ขวดแก้วรูปชมพู่และ digestion tube ぺด้า steam กลั่นเป็นเวลา 5 นาที
- เปิด steam นำ digestion tube และขวดแก้วรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น
- Set Alkali = 2 Delay time = 0.2 steam = 3.6
- นำขวดแก้วรูปชมพู่ซึ่งมีกรดบอริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ไปตั้งบน platform ของเครื่องกลั่น กดปุ่ม Auto ยก platform ขึ้นเพื่อให้ digestion tube จุ่มลงในสารละลาย ปิด Safety door เครื่องจะทำงานโดยมีน้ำกลั่นลงมาเจือจางสารตัวอย่าง แล้วตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้น steam จะทำงาน
- เมื่อกลั่นจนเสร็จแล้ว นำขวดแก้วรูปชมพู่และ digestion tube ออกจากเครื่อง แล้วทำการกลั่นตัวอย่างใหม่ต่อไป

13. นำขวดแก้วรูปชมพู่ซึ่งมี distillate เป็นสารละลายสีเขียวไปไตเตรตกับกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล จนถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเทา

คำนวณ

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

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

จ. สารแขวนลอย (Suspended Solid)

อุปกรณ์

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

วิธีวิเคราะห์

1. อบกระจกกรองใยแก้วในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักกระจกกรอง
2. เลือกปริมาตรน้ำหนักตัวอย่างที่จะให้ค่าสารแขวนลอยอย่างน้อยที่สุดประมาณ 2.5 มิลลิกรัม (ไม่รวมน้ำหนักกระจกกรองใยแก้ว)
3. วางกระจกกรองลงในกรวยที่ต่อเข้ากับเครื่องดูดอากาศ
4. ใช้น้ำกลั่นฉีดกระจกกรองให้เปียกเพื่อให้ติดแน่นกับกรวย
5. เทตัวอย่างน้ำปริมาตรตามต้องการผ่านกระจกกรองโดยอาศัยแรงดูดจากเครื่องดูดอากาศ
6. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างของแข็งที่ตกค้างอยู่ข้างกรวยกรองจนหมด รอนเครื่องดูดน้ำหมด
7. ปิดเครื่องดูดอากาศ ใช้ปากคีบจับกระจกกรองใส่ภาชนะทนไฟ นำไปอบในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือจนกระจกแห้ง
8. ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งหาน้ำหนักกระจกกรองที่

เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณ

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

ค. ของแข็งทั้งหมด(Total Solids)

อุปกรณ์

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

วิธีวิเคราะห์

1. นำจานระเหยไปอบให้แห้งและมีน้ำหนักคงที่ในตู้อบอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์แล้วชั่งน้ำหนักของจานระเหย
2. เลือกใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำที่เหมาะสม (50.0-100.0 มิลลิลิตร)
3. ค่อยๆ รินตัวอย่างน้ำที่ต้องการลงในจานระเหย นำไปอบบนเครื่องชั่งไอน้ำเมื่อน้ำระเหยหมด นำจานไปอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์
4. ชั่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือน้ำหนักของแข็งทั้งหมด

คำนวณ

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

ภาคผนวก ข

วิธีการตรวจสอบกรดซิติริก

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน (Stem, 1957)

1. การละลายเกลือแคลเซียมในน้ำหมัก (Nakanishi และ คณะ)

เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ ลงในน้ำหมักจนเกลือแคลเซียมละลายหมด ปรับค่าความเป็นกรด่างให้เท่ากับ 2.0 เจือจางด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว pH 2.0 ให้ได้ความเจือจางที่เหมาะสม

2. การเปลี่ยนกรดมะนาวเป็นเพนตาโบรโมอะซีโตน

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการกำจัดเกลือแคลเซียมในข้อ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาเกลียว เติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโปแทสเซียมโบรไมด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ลงไป 5 หยด เติมสารละลายโปแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไป 10 หยดทันที เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

3. การสกัดเพนตาโบรโมอะซีโตนด้วยเฮปแทน

นำหลอดทดลองที่ได้จากข้อ 2 แขนในอ่างน้ำแข็ง หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในหลอดทดลอง จนสารละลายใส ปิเปตเฮปแทน ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองปิดฝาให้สนิท สกัดโดยให้เครื่องผสมนาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้น

4. การสกัดด้วยไทโอยูเรีย

ปิเปตส่วนบน (ชั้นเฮปแทน) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาเกลียวชุดใหม่ ที่มีสารละลายไทโอยูเรีย ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท สกัดด้วยเครื่องผสมนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น คู่อะชั้นล่าง (ชั้นไทโอยูเรีย) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ใช้สารละลายไทโอยูเรียเป็นตัวเปรียบเทียบ กำหนดหาปริมาณกรดมะนาวได้จาก กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงของความเข้มข้น 0-40 มิลลิกรัมต่อลิตร หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 1 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยง *A.niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ความเข้มข้นแมงกานีสไอออนแตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของ Mn ²⁺	ระยะเวลาของการหมักกรดซิตริก (วัน)					
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15
0.333 ppm	2.745 u	7.95 s	8.89 p	10.74 i	11.09 ef	11.32 bc
50 ppm	2.48 v	7.51 t	9.44 o	9.96 m	10.16 l	10.33 k
75 ppm	2.43 v	9.88 m	10.16 l	11.36 fg	11.11 de	11.39 b
100 ppm	2.71 u	8.72 q	10.47 j	10.93 gh	11.13 de	11.59 a
125 ppm	2.36 v	8.63 q	9.885 m	10.32 k	10.89 gh	11.23 cd
150 ppm	2.73 u	8.28 r	9.64 n	10.74 i	10.86 hi	11.97 gh

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 2 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *A.niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ความเข้มข้นแมงกานีสไอออนแตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของ Mn ²⁺	ระยะเวลาของการหมักกรดซิตริก (วัน)					
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15
0.333 ppm	0.8214 qrs	0.9025 p	1.4073 g	1.4488 efg	1.7578 b	0.9756nop
50 ppm	0.83 qr	1.3262 I	1.4962 e	1.4962 e	1.5747 d	0.96 o
75 ppm	0.7342 t	1.1248 l	1.3785 h	1.3968 gh	1.7395 bcd	0.9966 n
100 ppm	0.8371 q	1.3027 ij	1.5695 d	1.8443 a	1.7563 b	0.8816 pq
125 ppm	0.7952 r	1.5436 k	1.218 jkl	1.4203 f	1.6168 c	0.8765 pq
150 ppm	0.0866 u	1.0498 m	1.2477 j	1.32 i	1.5765 d	0.7695 s

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 นำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยง *A.niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ความเข้มข้นแมกนีเซียมไอออนแตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

ความเข้มข้น ของ Mg ²⁺	ระยะเวลาของการหมักกรดซิตริก (วัน)					
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15
13.8 ppm	2.14 u	5.35 r	9.6 p	12.35 k	13.10 i	10.9 m
1,000 ppm	2.25 tu	8.94 q	10.87 m	13.69 g	13.42 h	13.42 h
2,000 ppm	2.19 tu	10.62 n	10.59 n	13.70 fg	15.28 b	16.30 a
3,000 ppm	2.16 u	10.69 n	10.69 n	12.63 j	13.47 h	13.80 fg
4,000 ppm	2.85 s	10.29 o	14.04 e	14.77 c	15.40 b	15.40 b
5,000 ppm	2.34 t	12.11 l	12.11 l	13.80 fg	13.89 ef	14.20 d

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 4 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *A.niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ความเข้มข้นแมกนีเซียมไอออนแตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

ความเข้มข้น ของ Mg ²⁺	ระยะเวลาของการหมักกรดซิตริก (วัน)					
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15
13.8 ppm	1.2283 k	1.2764 k	1.3423 ij	1.4984 g	1.0965 l	0.7014 n
1,000 ppm	1.2572 k	1.3450 ij	1.5507 fg	1.6300 e	1.2032 l	0.8154 m
2,000 ppm	1.2134 k	1.4306 h	1.8960 b	2.1612 a	1.8715 b	1.3428 ij
3,000 ppm	1.1368 l	1.2581 k	1.6793 de	1.8852 b	1.3953 hi	0.8113 m
4,000 ppm	1.2220 k	1.2600 k	1.5704 f	1.7816 c	1.3721 ij	0.7912 m
5,000 ppm	1.2625 k	1.2503 k	1.5410 fg	1.7220 d	1.3209 l	0.8010 m

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 5 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยง *A.niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ความเข้มข้นฟอสเฟตไอออนแตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

ความเข้มข้น ของ PO ₄ ²⁻	ระยะเวลาของการหมักกรดซิตริก (วัน)					
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15
20.5 ppm	2.02 q	6.66 m	10.21 i	10.465 h	10.415 h	10.88 fg
2,000 ppm	2.47 op	7.51 l	10.78 g	10.85 fg	11.55 d	11.72 cd
4,000 ppm	2.415 p	9.11 j	10.84 fg	11.54 d	11.87 bc	12.05 b
6,000 ppm	2.69 n	9.19 j	10.88 fg	10.97 fg	11.13 e	11.525 d
8,000 ppm	2.65 no	7.85 k	10.59 h	11.71 cd	11.965 b	12.65 a
10000ppm	2.37 p	8.03 k	11.00 ef	10.40 h	10.45 h	10.505 h

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 6 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *A.niger* TISTR 3089 ในน้ำสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ความเข้มข้นฟอสเฟตไอออนแตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

ความเข้มข้น ของ PO ₄ ²⁻	ระยะเวลาของการหมักกรดซิตริก (วัน)					
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15
20.5 ppm	0.0832 z	1.0368 s	1.307 n	1.4275 m	1.3211 n	1.2544 o
2,000 ppm	0.1408 y	1.1841 q	1.6192 k	1.6192 k	1.5235 l	1.2113 pq
4,000 ppm	0.224 x	0.7232 t	1.7025 j	1.9840 e	1.8433 gh	1.6183 k
6,000 ppm	0.2752 w	1.2032 pq	1.6480 k	2.0131 d	2.0019 d	1.824 h
8,000 ppm	0.3855 v	1.1264 r	1.9101 ef	2.08 c	2.0820 c	1.7520 i
10000ppm	0.4672 u	1.282 op	1.99 d	2.2154 a	2.1327 b	1.8756 fg

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95