สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อยีสต์

T047322

นาย ไพศาล ประสิว
นางสาว รัชฎาภรณ์ บุตรสนม
นางสาว สกุลรัตน์ พุกกะวรรณะ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 47322
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2546

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Citric Acid Production from Cocoa Pulp Extract by Yeasts

Mr. Phaisarn Prasiw

Miss Rutchadaporn Butsanom

Miss Sakunrat Pukkawanna

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

Academic Year 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อยีสต์

นักศึกษา นายไพศาล ประสิว

นางสาวรัชฎาภรณ์ บุตรสนม

นางสาวสกุลรัตน์ พุกกะวรรณะ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์	.....
กรรมการ	ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล	.....
กรรมการ	ผศ.วันชัย สุทธินุ่น	.....

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อยีสต์
นักศึกษา นายไพศาล ประสิว
นางสาวรัชฎาภรณ์ บุตรสนม
นางสาวสกุลรัตน์ พุกกะวรรณะ
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2545
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล

บทคัดย่อ

การผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์ ที่ทำการคัดเลือกจากเชื้อ *Candida* sp. 3 สายพันธุ์ คือ *Candida lipolytica* TISTR 5655 *Candida tropicalis* TISTR 5045 และ *Candida oleophila* TISTR 5687 ทำการศึกษาโดยการเลี้ยงเชื้อแบบใช้เครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 100 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *C. oleophila* TISTR 5687 ให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด (12.03 กรัมต่อลิตร) และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติพบว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากนั้นทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 50 75 และ 100 พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 ให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด (13.21 กรัมต่อลิตร) และเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.3 0.5 และ 0.7 สารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.1 0.3 และ 0.5 แอมโมเนียมไนเตรตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.1 0.2 และ 0.3 พบว่า การใช้สารสกัดจากยีสต์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด (13.81 กรัมต่อลิตร) และเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิตพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 ใช้สารสกัดจากยีสต์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที พบว่าในวันที่ 4 สามารถให้ปริมาณกรดซิตริกได้สูงสุด (14.41 กรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Citric Acid Production from Cocoa Pulp Extract by Yeasts

Name Mr. Phaisarn Prasiw
Miss Rutchadaporn Butsanom
Miss Sakunrat Pukkawanna

Department Applied Biology

Program Biotechnology

Academic year 2002

Special Project Advisor Asst. Prof. Duangjai Ochaikul

ABSTRACT

Citric acid fermentation by yeasts selecting from three strains of *Candida* sp. , i.e. , *Candida lipolytica* TISTR 5655, *Candida tropicalis* TISTR 5045 and *Candida oleophila* TISTR 5687 were studied in shake culture using 100 % cocoa pulp extract as medium and incubated at 28^{0}C and shaking speed of 300 rpm . *Candida oleophila* gave the highest yield of citric acid (12.03 grams/litre) with significant difference from the other strains . The carbon concentration at 25 % gave the highest yield of citric acid (13.21 gram/litre) with significant difference from the carbon concentration at 50 , 75 and 100 % .The suitable nitrogen source was studied by adjusting the concentrations of peptone at 0 0.3 0.5 and 0.7 % and the concentrations of yeast extract at 0 0.1 0.3 and 0.5% and the concentrations of ammonium nitrate at 0 0.1 0.2 and 0.3 %. The result showed that the addition of 0.1% yeast extract in the culture gave the highest citric acid (13.81 gram/litre) with significant difference from the addition of peptone , yeast extract and ammonium nitrate. The highest yield of citric acid (14.41 gram/litre) was obtained on day 4 when *Candida oleophila* TISTR 5687 was cultivated in a medium consisting of 25 % cocoa pulp extract , 0.1% yeast extract and incubate at 28^{0}C with shaking speed of 300 rpm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตและสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น เนื่องจากได้รับความสนับสนุน ความช่วยเหลือ ความรัก ความร่วมมือ ความอบอุ่นตลอดจนคำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อผู้จัดทำ คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณท่าน ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล ที่ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทาง การปฏิบัติและข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงงานนี้ รวมทั้งยังช่วยตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานทำให้โครงงานชิ้นนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณท่าน รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการ และ ผศ.วันชัย สุทธินุ่น กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่และน้อง ที่คอยให้กำลังใจในการทำโครงงานพิเศษเสมอมา ขอบคุณ พี่ๆ เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ พี่ปริญญาโท เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์

นอกเหนือจากนี้ยังมีบุคคลท่านอื่นๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ ซึ่งผู้จัดทำไม่ได้กล่าวถึง ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย

นายไพศาล ประสิว
นางสาวรัชฎาภรณ์ บุตรสนม
นางสาวสกุลรัตน์ พุกกะวรรณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
2. วัตถุประสงค์	2
3. ขอบเขตของการวิจัย	2
4. ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	2
5. ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
1. โกโก้	3
2. กรดซิตริกและคุณลักษณะของกรดซิตริก	5
3. วัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริก	7
4. ลักษณะของเชื้อ *Candida* sp. ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก	8
5. ชีวเคมีของการผลิตกรดซิตริก	11
6. การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม	12
7. การแยกกรดซิตริก	14
8. การผลิตกรดซิตริกโดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์	15
9. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก	19
10. การใช้ประโยชน์จากกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	27
1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	27
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3. เครื่องมือและอุปกรณ์ 27

4. วิธีการทดลอง 27

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 31

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ 31

2. ผลของการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ 32

3. ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตกรดซิตริก 32

4. ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดซิตริก 39

5. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อยีสต์ในระดับขวดเขย่า 49

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 51

เอกสารอ้างอิง 53

ภาคผนวก 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	3
2-2	แสดงความสามารถในการละลายน้ำของกรดซิตริก	6
2-3	แสดงคุณลักษณะทางเคมีของกรดซิตริก	7
2-4	วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกประเภทต่างๆ	10
4-1	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	31
4-2	ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	33
4-3	ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. lipolytica* TISTR 5655 ในน้ำสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	34
4-4	ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 ในน้ำสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	35
4-5	ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25	36
4-6	ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50	37
4-7	ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 75	37
4-8	ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 100	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-9 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้เปปโตนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.3 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน 40

4-10 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C.oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้เปปโตนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน 40

4-11 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้เปปโตนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.7 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน 41

4-12 เปรียบเทียบปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในวันที่ 4 ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้เปปโตนที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน 41

4-13 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้สารสกัดจากยีสต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน 43

4-14 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้สารสกัดจากยีสต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.3 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-15 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้สารสกัดจากยีสต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน 44

4-16 เปรียบเทียบปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในวันที่ 4 ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้สารสกัดจากยีสต์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน 45

4-17 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้แอมโมเนียมไนเตรตมีความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน 47

4-18 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้แอมโมเนียมไนเตรตมีความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน 47

4-19 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้แอมโมเนียมไนเตรตมีความเข้มข้นร้อยละ 0.3 เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน 48

4-20 เปรียบเทียบปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในวันที่ 4 ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้แอมโมเนียมไนเตรตที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน 48

4-21 เปรียบเทียบปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน ในวันที่ 4 ของการหมัก 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-22 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 และสารสกัดจากยีสต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2-1	เมล็ดโกโก้	4
2-2	น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	4
2-3	สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดซิตริก	5
2-4	ลักษณะของเชื้อ *Candida* ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก	9
2-5	วิถีการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์ผ่านทางวัฏจักรเครปส์	11
2-6	ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก	17
4-1	ปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อ *Candida oleophila* TISTR 5687 *Candida lipolytica* TISTR 5655 และ *Candida tropicalis* TISTR 5045 สามารถผลิตได้	36
4-2	ปริมาณกรดซิตริก ที่เชื้อ *Candida oleophila* TISTR 5687 ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้แตกต่างกัน	38
4-3	ปริมาณกรดซิตริก ที่เชื้อ *Candida oleophila* TISTR 5687 ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของเปปโตนแตกต่างกัน	42
4-4	ปริมาณกรดซิตริก ที่เชื้อ *Candida oleophila* TISTR 5687 ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์แตกต่างกัน	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

กรดซิตริกเป็นกรดที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง ซึ่งใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมยา ทั้งนี้เพราะกรดซิตริกมีคุณสมบัติที่ดีหลายอย่าง คือ มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม ย่อยได้ง่าย มีความเป็นพิษต่ำ

กรดซิตริกที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้มาจากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา *Aspergillus niger* จากวัตถุดิบพวกคาร์โบไฮเดรต (Mattey,1992 ; Milsom และ Meers, 1985) และยังมีเชื้อราอีกหลายชนิดที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้ เช่น *Aspergillus aureus* , *Aspergillus glaucus* , *Aspergillus japonicus* , *Aspergillus wentii* , *Aspergillus fumaricus* , *Aspergillus awamori* , *Aspergillus luchvensis* และ *Aspergillus fonsecaeus* อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากยีสต์หลายสายพันธุ์ โดยผลิตจากวัตถุดิบหลายชนิดทั้งประเภทคาร์โบไฮเดรต ไขมันธรรมชาติ โดยยีสต์เหล่านี้ได้แก่ *Candida lipolytica* , *Candida oleophila* , *Candida tropicalis* , Hansenula , Torulopsis , Torula , Rhodotorula , Nocardia และ Saccharomyces (Hamissa,et al, 1981 ; Miall และ Parker, 1975) Hassan และคณะ (1995) ได้ศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่าการใช้ *Candida lipolytica* สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงกว่า Candida สายพันธุ์อื่นและอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมเปปโตนร้อยละ 0.5 pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.5 อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อ 9 วัน สามารถผลิตกรดซิตริกได้ 51.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยยีสต์ *Candida oleophila* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อนี้ คือ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ใช้หัวเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดซิตริกได้ 138.36 กรัมต่อลิตร ในเวลา 120 ชั่วโมง

โกโก้เป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกมากแถบภาคใต้ของประเทศไทย โดยเฉพาะจังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี และชุมพร เมื่อเก็บผลโกโก้จากต้น เกษตรกรจะนำผลโกโก้มาปอกเปลือกเพื่อนำเมล็ดโกโก้มาหมัก ในระหว่างการหมักจะมีของเหลวซึ่งเป็นส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ไหลออกจากกองหมัก ซึ่งของเหลวนี้ถ้าปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมจะก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีความเป็นกรดค่อนข้างสูง โครงงานพิเศษนี้จึงได้สนใจนำของเหลวที่สกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้จากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มาเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อให้ผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อยีสต์

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้
2. ศึกษาความสามารถของยีสต์แต่ละชนิดในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้และคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมไว้ศึกษาต่อไป
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกของยีสต์ที่คัดเลือกได้
4. นำผลศึกษานี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คัดเลือกยีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกไว้

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

การดำเนินงานวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ เช่น ปริมาณไนโตรเจน น้ำตาลรีดิวซ์ กรดซิตริก พีเอช แร่ธาตุต่างๆ

ขั้นที่ 2 คัดเลือกยีสต์ที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

ขั้นที่ 3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากยีสต์ที่คัดเลือกไว้

ขั้นที่ 4 วิเคราะห์ข้อมูล สรุป และจัดทำรายงาน

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาผลิตกรดซิตริก นอกจากจะได้กรดซิตริกซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ แล้ว ยังเป็นการลดปัญหาเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อมอีกทางหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

1. โกโก้

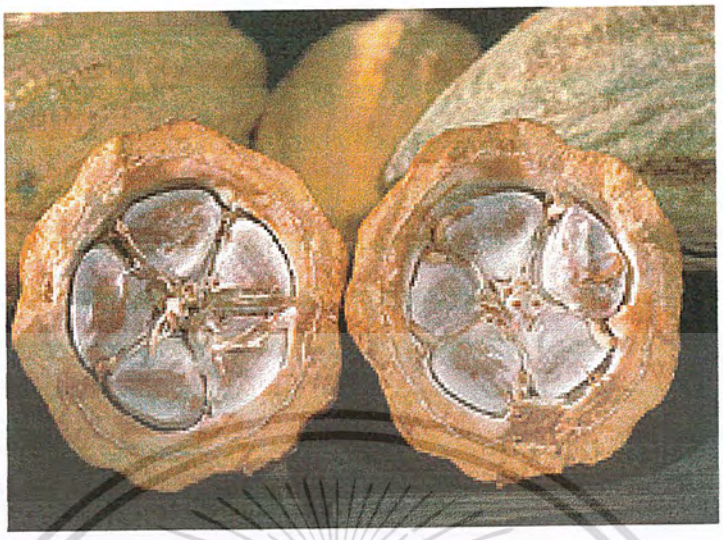
โกโก้เป็นพืชเศรษฐกิจที่นิยมปลูกในแถบจังหวัดภาคใต้ เกษตรกรผู้ปลูกมักนิยมจำหน่ายในรูปเมล็ดแห้ง ส่วนใหญ่ผลโกโก้อยู่บนก้านดอก ซึ่งผลโกโก้เจริญมาจากก้านดอก ผิวของเมล็ดโกโก้มีลักษณะเป็นตุ่มขรุขระ เป็นร่อง ภายในผลโกโก้ที่เจริญเต็มที่ประกอบไปด้วยเมล็ด และมีเยื่อหุ้มเมล็ดที่เป็นเมือกเหนียว ล้อมรอบเมล็ดอีกชั้นหนึ่ง เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีแตกต่างกัน เช่น ขาว ชมพู ขึ้นอยู่กับพันธุ์ของโกโก้ ในกระบวนการหมักเมล็ดโกโก้ ส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นส่วนสำคัญในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์ต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ และ กรดซิตริก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารเหล่านี้มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ ระหว่างการหมักมีการสูญเสียเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ประมาณร้อยละ 5-7 โดยสลายกลายเป็นของเหลวไปจากกองหมัก เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10-15 เพคตินร้อยละ1และกรดซิตริกร้อยละ 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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2-1 เมล็ดโกโก้

10 3 2003

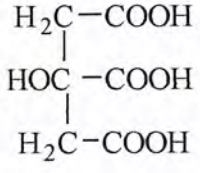
รูปที่ 2-2 น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กรดซิตริกและคุณสมบัติของกรดซิตริก

กรดซิตริกจัดเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย มีชื่อทางเคมีคือ 2-hydroxy -1,2,3-propanetricarboxylic acid สูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2-3 พบในธรรมชาติและในสิ่งมีชีวิตโดยเป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle) ช่วยให้เกิดการออกซิไดส์คาร์โบไฮเดรตไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ จึงไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ ปัจจุบันสามารถผลิตเป็นการค้าออกมา 2 รูปแบบ คือ ในรูป anhydrous ($C_6H_8O_7$) มีจุดหลอมเหลวที่ 153 องศาเซลเซียส และในรูป monohydrate ($C_6H_8O_7 . H_2O$) มีจุดหลอมเหลวที่ 135-152 องศาเซลเซียส และนอกจากนี้ยังพบในผลไม้หรือเมล็ดของผักหลายชนิด โดยเฉพาะในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะนาวและพืชตระกูลส้ม ซึ่งสามารถแยกกรดซิตริกออกจากน้ำมะนาวได้สำเร็จเป็นครั้งแรก โดยการผ่านน้ำมะนาวร้อนๆ ไปบนแคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อให้เกิดเป็นตะกอนของแคลเซียมซิเตรท จากนั้นจึงแยกกรดซิตริกออกมาโดยใช้กรดซัลฟูริก ซึ่งวิธีการตกตะกอนแคลเซียมซิเตรทและกรดซิตริกออกจากแคลเซียมซิเตรทยังใช้ในการทำให้กรดซิตริก บริสุทธิ์จนถึงปัจจุบันนี้ อย่างไรก็ตามวัตถุดิบซึ่งใช้ในการผลิตได้มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากวิธีการผลิตกรดซิตริกโดยการสกัดออกมาจากน้ำมะนาวไม่เพียงพอต่อความต้องการในอุตสาหกรรมอาหาร Wehmer (1893) เป็นบุคคลแรกที่กล่าวถึงการสังเคราะห์กรดตัวนี้โดยราในกระบวนการหมัก เชื้อราที่เขาศึกษาก็คือ *Citromyces prefferianus* และ *C. glabe* สามารถสร้างกรดซิตริกจากสารละลายน้ำตาลที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบ ต่อมา Wehmer ได้รายงานอีกว่า กรดตัวนี้สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้โดยใช้เชื้อในกลุ่ม *Mucor sp.* และ *Penicillium sp.* โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นวัตถุดิบ

กรดซิตริกมีลักษณะเป็นผลึกขุ่นมัวหรือสีขาว มีลักษณะเป็นผงคล้ายแป้ง มีโครงสร้างดังรูป 2-3 คุณสมบัติของกรดซิตริกมีดังนี้ คือ สูตรเคมี CHO น้ำหนักโมเลกุล 192.13 ความถ่วงจำเพาะ 1.665 จุดหลอมเหลว 153 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างในสารละลาย 0.1 นอร์มัล เท่ากับ 2.2 การละลายในน้ำที่ 25 องศาเซลเซียส 162 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร



รูปที่ 2-3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดซิตริก
ที่มา : วราวุฒิและรุ่งนภา (2532)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากกรดซิตริกเป็นสารที่มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม ย่อยสลายได้ง่าย มีความเป็นพิษต่ำ และกำจัดได้ง่าย ละลายได้ดีโดยขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ (ตารางที่ 2-2) จึงมีการใช้กรดซิตริก เกลือ และเอสเทอร์ของกรดซิตริกนี้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย คุณลักษณะทางเคมีของกรดซิตริก ตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (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 : อาภรณ์ (2529)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-3 แสดงคุณลักษณะทางเคมีของกรดซิตริก

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด	
		กรดซิตริกโมโนไฮเดรต	กรดซิตริกแอนไฮดรัส
1	ความบริสุทธิ์ $C_6H_8O_7$ คำนวณในสภาพแห้งร้อยละ	99.5-101.0	99.5-101.5
2	น้ำร้อยละ	7.5-8.8	ไม่เกิน 0.5
3	กากที่เหลือจากการเผาร้อยละไม่เกิน	0.05	0.05
4	ออกซาเลต	สารละลายต้องไม่ขุ่น	สารละลายต้องไม่ขุ่น
5	ซัลเฟต	สารละลายต้องไม่ขุ่น	สารละลายต้องไม่ขุ่น
6	สารหนู มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	3	3
7	โลหะหนัก ยกเว้น เหล็ก (เทียบเป็นตะกั่ว) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	10	10
8	แบเรียม	สารละลายต้องไม่ขุ่น	สารละลายต้องไม่ขุ่น
9	แคลเซียม มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	200	200
10	เหล็ก มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	50
11	คลอไรด์ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	50	20
12	สารที่สลายให้คาร์บอนได้ง่าย (readily carbonizable substance)	สีต้องไม่เข้มกว่าสีของสารละลายมาตรฐาน	สีต้องไม่เข้มกว่าสีของสารละลายมาตรฐาน

ที่มา : มอก. (2526)

3. วัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริก

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกมีทั้งน้ำตาล แป้ง สารประกอบไฮโดรคาร์บอน ไขมัน และ แอลกอฮอล์ รายละเอียดดังสรุปในตารางที่ 2-4 แต่ในการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมนั้น ส่วนใหญ่ใช้วัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้ง สำหรับแป้งจะใช้ใน 2 รูปแบบ คือ ใช้ในรูป solid state และ ย่อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคสในการหมักในอาหารเหลว แป้งที่นำมาผลิตกรดซิตริกอาจเป็นแป้งจากธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง แป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลัง รำข้าว แกลบ และมีการผลิตกรดซิตริกจากกากแอบเปิ้ลที่คั้นน้ำแล้ว (apple pomace) สำหรับน้ำตาลอาจจะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ซูโครส มอลโทส หรืออาจใช้กากน้ำตาลทั้งที่มาจากอ้อยและหัวบีท และใช้น้ำผลไม้ เช่น สับปะรด น้ำมะพร้าว และน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ส่วนวัตถุดิบอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 2-4

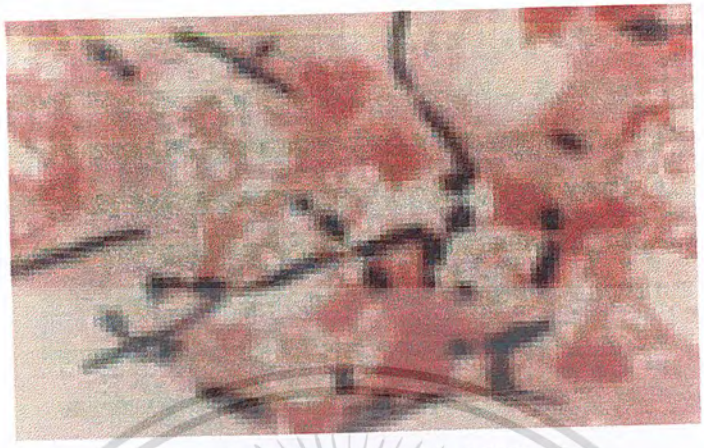
แป้งมันสำปะหลังที่ผลิตภายในประเทศ โดยทั่วไปประกอบด้วย แป้ง 86.23 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 12.0 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 0.86 เปอร์เซ็นต์ Bolach และคณะ (1985) รายงานว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

starch hydrolysate เหมาะสำหรับใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตกรดซิตริก เนื่องจากการย่อยแป้งด้วยกรดทำให้มีปริมาณ dextrin ที่ไม่ต้องการเช่น gentiobiose, isomaltose, panose และอื่นๆ เป็นจำนวนมาก dextrin เหล่านี้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ เพื่อหลีกลี่ยงปัญหานี้ การย่อยด้วยเอนไซม์จึงเป็นหนทางที่ดีกว่า ซึ่ง Bolach และคณะ (1985) พบว่าค่า Degree of Starch Hydrolysis (DE) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดซิตริกที่มีค่า DE ตั้งแต่ 2-98 เมื่อนำไปเป็นสับ-สเตรทสำหรับการหมักกรดซิตริก พบว่า แป้งที่ผ่านขั้นตอนการย่อยแบบ liquefaction (ที่มีค่า DE น้อยกว่า 25) มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตกรดซิตริกมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ลักษณะของเชื้อ *Candida* ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก



Candida lipolytica TISTR 5655

Candida oleophila TISTR 5687

Candida tropicalis TISTR 5045

รูปที่ 2-4 ลักษณะของเชื้อ *Candida*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-4 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกประเภทต่างๆ

ประเภทวัตถุดิบ	ตัวอย่างวัตถุดิบ	จุลินทรีย์และการหมัก
น้ำตาล	กลูโคส ซูโครส มอลโทส พรักโทส แมนโนส กากน้ำตาลจากอ้อยและหัวบีท น้ำผลไม้ เช่น สับปะรด และน้ำมะพร้าวเข้มข้น	ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมอยู่ในช่วงร้อยละ 14-22 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้ได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และราที่ผลิตกรดซิตริกได้
แป้ง	แป้งจากธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ฯลฯ มันฝรั่ง มันสำปะหลัง กากมัน รำข้าว แกลบ	ใช้ได้ทั้งในรูปสารละลายแป้งที่ต้องผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ หรือในรูปแป้งดิบ
สารประกอบไฮโดรคาร์บอน	n-alkane (9-20 คาร์บอนอะตอม) n-parafin (9-30 คาร์บอนอะตอม)	มีการทดลองในฟลาสก์เขย่าที่ญี่ปุ่น หมักยีสต์ *Candida* sp. ให้ผลผลิตสูงถึงร้อยละ 130 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่เป็นกรดไอโซซิตริกครึ่งหนึ่ง
แอลกอฮอล์	เมทานอล เอธานอล บิวทานอล และแอลกอฮอล์ที่มี 12-16 คาร์บอน	ใช้ในปริมาณ ร้อยละ 1-2 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการทดลองในยีสต์ *Candida* sp. บางชนิด *Torulopsis xylinus* และ *Pichia farimosa*
ไขมัน	ไขมัน กรดไขมัน และน้ำมันธรรมชาติ	ใช้เลี้ยงเชื้อ *Candida* sp. และ Hansenula และ *Pichia* sp.

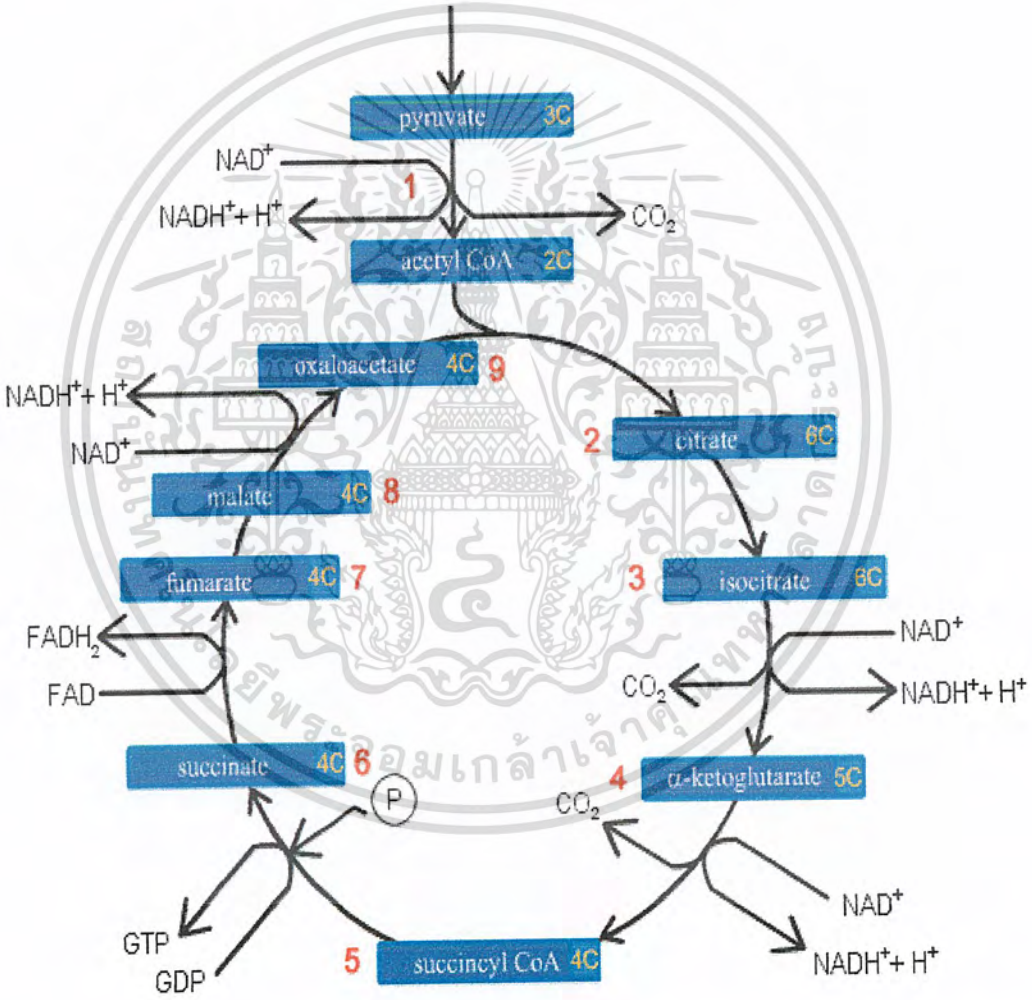
ที่มา : ชัยวัฒน์ (2536)

5. ชีวเคมีของการผลิตกรดซิตริกโดย *Candida*

กรดซิตริกเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle) ซึ่งแสดงในรูปที่ 2-5 สำหรับกลไกการผลิตกรดซิตริกจากน้ำตาลกลูโคสนั้น น้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวต (pyruvate) โดยวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) และไพรูเวตที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็น อะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) เพื่อเข้าสู่วิถีการผลิตกรดซิตริก โดยอะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) ที่เกิดขึ้นจะรวมกับออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) โดยอาศัยเอนไซม์ซิเตรตซินติเตส (citrate synthetase) ได้กรดซิตริกเกิดขึ้น ในระหว่างการสะสมกรดซิตริก ออกซาโลอะซิเตตถูกสร้างขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยอาศัยปฏิกิริยา การสร้างทดแทน (anaplerotic reaction) ซึ่งเกิดจากไพรูเวตรวมกับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอาศัยเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส (pyruvate carboxylase) การสะสมกรดซิตริกในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นเนื่องจากมีความผิดปกติของวัฏจักรเครปส์ โดยมีเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ อะโคนิเตส (aconitase) และไอโซซิเตรต ดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) ซึ่งในช่วงที่มีการผลิตกรดซิตริกเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด จะมีกิจกรรม (activity) ลดลง ในขณะที่เอนไซม์ซิเตรต ซินติเตส (citrate synthetase) มีกิจกรรมสูงขึ้น



รูปที่ 2-5 วิถีการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์ผ่านทางวัฏจักรเครปส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม

กรดซิตริกที่ผลิตเป็นการค้าในปัจจุบัน จะใช้กรรมวิธีการหมักเป็นส่วนใหญ่ และกรรมวิธีในการผลิตของแต่ละโรงงานจะถือเป็นความลับ ดังนั้นจึงมีรายงานออกมาไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามจากรายงานที่ทางโรงงานได้จดลิขสิทธิ์ไว้ทำให้ทราบเรื่องราวการผลิตกรดซิตริกบางส่วน กรรมวิธีการผลิตที่สำคัญมีอยู่ 3 วิธี ด้วยกันคือ

6.1 การผลิตกรดซิตริกแบบ Koji fermentation process (surface culture method)

กระบวนการผลิตนี้ได้เริ่มทำกันในประเทศญี่ปุ่น โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากของเหลือใช้ของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ใส่อาหารลงในถาดแล้วทำการฆ่าเชื้อในอาหาร ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1.0-8.0 เซนติเมตร หลังจากอาหารเย็นลงจึงใส่สปอร์ของราลงในถาดอาหาร ถาดอาหารเหล่านี้จะเก็บไว้บนชั้นในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ในขณะเดียวกันก็ให้อากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผ่านเข้าไปบนถาดเลี้ยงเชื้อ เชื้อราก็จะเจริญซึ่งจะเห็นเส้นใยของเชื้อรา ตัวอย่างของวัตถุดิบที่นำมาใช้เลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริก เช่น พวกรำข้าวต่างๆ เศษเหลือของมันเทศ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงไม่ควรเกิน 28 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงมาอยู่ที่ 1.8-2.0 ในขณะที่เกิดมีการสะสมกรดซิตริกในกระบวนการหมัก หลังจากเลี้ยงได้ 5-8 วัน จึงนำ solid mass ที่มีเชื้อราขึ้นนั้นนำมาแยกเอากรดซิตริกออก โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย แล้วจึงทำการแยกสารละลายกรดซิตริกออก นำไปทำให้บริสุทธิ์ บางครั้งอาจจะผลิตกรดซิตริกโดยเติมเอนไซม์ลงไป ซึ่งสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจะปรับความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 4-5 และความชื้นประมาณร้อยละ 70-80 สำหรับข้อดีของการใส่เอนไซม์ไปช่วยย่อยแป้งนั้นคือ ทำให้สามารถใช้อาหารต่อถาดได้มากขึ้นโดยไม่ต้องมีการเติมของเสียจากการหมักกรดกลูตามิก

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

ในสมัยก่อนการผลิตกรดซิตริกในประเทศยุโรปและอเมริกา มักจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (culture solution) เทลงในถาดนั้นๆ ซึ่งโรงงานที่ผลิตด้วยวิธีนี้จะต้องใช้เนื้อที่ของโรงงานมากกว่า 30 เอเคอร์ และถาดที่ใช้จะทำจากโลหะอลูมิเนียมที่มีความบริสุทธิ์สูง หรือเป็นโลหะพวกปลอดสนิมเพื่อเลี่ยงปัญหาการสึกกร่อนและการปลอมแปลงของพวกแร่ธาตุ (trace element) สำหรับหัวเชื้อนั้นจะทำการเลี้ยงราโดยใช้เวลาประมาณ 9 วัน แล้วจึงถ่ายไปยังสารละลายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อทำการหมัก แล้วทำให้สปอร์นั้นกระจายอยู่ในสารละลายดังกล่าว หลังจากนั้นจึงถ่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

inoculum medium ที่มีสปอร์ของเชื้อรากระจายอยู่นั้นไปยังถาดหมักซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดซิตริก แหล่งคาร์บอนที่ใช้มักเป็นพวกกากน้ำตาลจากอ้อยหรือหัวบีท ความเข้มข้นของน้ำตาลที่จะให้ผลผลิตของกรดซิตริกสูงนั้น ควรจะใช้น้ำตาลประมาณร้อยละ 14-20 นอกจากนี้พวกแร่ธาตุหรือฟอสเฟตก็มีความจำเป็นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของราที่ใช้ อาหารที่ใช้ควรมีฟอสเฟตเพียงพอ โลหะอื่นๆ ก็มีเช่น เหล็ก สังกะสี และทองแดง ซึ่งโลหะเหล่านี้ไม่จำเป็นต้องมีครบทุกชนิดอาจจะมีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิด แต่ในบางครั้งแร่ธาตุจะมีปริมาณสูงเกินไปในวัตถุดิบที่ใช้ เช่น กากน้ำตาลจากหัวบีท ในกรณีนี้ต้องทำการลดปริมาณโลหะก่อน โดยการทำ pretreatment กับ ferric cyanide เพื่อจะรวมตัวกับโลหะเหล็ก หรืออาจจะ pretreat invert molass ด้วย cation-exchange resin ก็ได้ ซึ่งมักจะใช้กับการผลิตกรดซิตริกโดยวิธี submerged-aerated citric acid fermentation

เมื่อทำการเลี้ยงสปอร์ใน fermentation medium ได้ 24 ชั่วโมง จะเห็นเยื่อสีขาวของเส้นใยปกคลุมบนพื้นผิวของสารละลาย แล้วจึงผ่านอากาศชื้นที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วเข้าไป ซึ่งอากาศนี้มีอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส หลังจากใส่สปอร์ลงไปแล้ว 8-10 วัน ปริมาณน้ำที่อยู่ใน culture solution จะลดลงไปประมาณร้อยละ 20 ระดับความเข้มข้นของกรดจะสูงสุดในช่วงนี้ การทำให้ได้ปริมาณกรดซิตริกความเข้มข้นสูงขึ้นทำได้ 2 วิธีคือ การใช้กระบวนการหมักที่เหมาะสม (fermentation process) และใช้วิธีการระเหย (evaporation process) ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตขึ้นได้แบบ surface liquid จะได้ประมาณร้อยละ 80-85 ของน้ำหนักคาร์โบไฮเดรตเริ่มต้นที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ส่วนประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวมีประมาณร้อยละ 90 ของปริมาณกรดซิตริกที่ผลิต

6.3 การผลิตกรดซิตริกแบบ Submerged fermentation process

ปัจจุบันได้พยายามพัฒนาการผลิตกรดซิตริกด้วยวิธีนี้ กระบวนการผลิตโดยทั่วไปก็อาศัยการเลี้ยงของเชื้อราในถังลึกที่บรรจุอาหารอยู่ สำหรับวัตถุดิบที่ใช้สำหรับการผลิตแบบนี้ เช่น น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของ sucrose invert ประมาณ 2 ใน 3 น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง นอกจากนี้อาจจะใช้เอนไซม์ hydrolyzate ของธัญพืชพวกข้าวโพด ข้าวฟ่างหรือแป้งมันเทศ หลังจากที่เชื้อราเจริญใน fermentation solution ความเป็นกรด-ด่างในนั้นไม่ควรเกิน 3.5 เพราะอาจมีกรดชนิดอื่นปะปนมาด้วย สำหรับเรื่องการกวนเพื่อให้ออกซิเจนกระจายอย่างเพียงพอนั้นก็ไม่จำเป็นในกรณีนี้ เพราะช่วงระยะเวลาของขบวนการหมักนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลในตอนต้นที่ใช้ต้ม ส่วนระยะเวลาการหมักจะใช้ประมาณ 5-14 วัน ส่วนในด้านเกี่ยวกับการควบคุมฟองที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักนั้น สามารถทำได้โดยการเติมสาร antifoam ลงไปเพื่อป้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันไม่ให้อาหารล้นออกนอกถังหมัก วิธีนี้มีปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตขึ้นร้อยละ 95 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยทั่วไปแล้วปริมาณการผลิตจะอยู่ในช่วงร้อยละ 70-90 ในเวลา 8-10 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

7. การแยกกรดซิตริก (วราวุฒิและรุ่งนภา , 2532)

ตามปกติในกระบวนการหมักมีขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอน ซึ่งประกอบด้วย การเตรียมวัตถุดิบ การหมักและการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ตามธรรมดาแล้วถ้าทำการหมักจนได้ผลผลิตสูง แต่ถ้าใช้วิธีการเก็บเกี่ยวที่ไม่เหมาะสมก็จะทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตลดต่ำลง การเก็บเกี่ยวกรดซิตริกออกมาจากการหมัก แสดงดังรูปที่ 2-6 เริ่มต้นด้วยการแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกมาจากน้ำหมักก่อน (ในกรณีที่ใช้การหมักในกระบวนการหมักที่เชื้อเจริญที่ผิวของอาหารและกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว) หรือต้องทำการสกัดเอากรดซิตริกด้วยน้ำหรือบัฟเฟอร์ออกมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักโดยกระบวนการหมักในสภาพอาหารแห้ง แล้วจึงกรองแยกเอาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ออกก่อน จากนั้นจึงนำน้ำหมักที่ได้มาผ่านกระบวนการตกตะกอน โดยในช่วงแรกทำการการตกตะกอนกรดออกซาลิกออกมาด้วยน้ำปูนใส (hydrated-lime) ปริมาณเล็กน้อยและปรับอุณหภูมิประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมน้ำปูนขาวลงไปอีกในอัตราส่วนน้ำปูนขาว 1 ส่วนต่อน้ำหมัก 2 ส่วน โดยใช้เวลาในการเติมมากกว่า 1 ชั่วโมง ในขณะเดียวกันเพิ่มอุณหภูมิให้สูงถึง 95 องศาเซลเซียส การเติมปูนขาวในช่วงนี้จะทำให้กรดซิตริกตกตะกอนออกมาในรูปของเกลือแคลเซียมซิเตรท (calcium citrate) ซึ่งจะถูกกรองและล้างด้วยน้ำหลายๆ ครั้งก่อนที่จะส่งเข้าเครื่องเติมกรด (acidulators) โดยการเติมกรดซัลฟูริกเข้าไป เพื่อแยกแคลเซียมออกไปในรูปแคลเซียมซัลเฟตแล้วกรองออกไป ส่วนสารละลายที่มีกรดซิตริกละลายอยู่ จะถูกนำไปกำจัดสีโดยถ่านกัมมันต์แล้วจึงนำไปผ่านคอลัมน์เรซินเพื่อแลกเปลี่ยนประจุ เพื่อทำให้กรดซิตริกที่ได้บริสุทธิ์ปราศจากสิ่งเจือปนก่อนที่จะนำไปทำให้เข้มข้นภายใต้สุญญากาศ แล้วจึงผ่านขั้นตอนการตกผลึกและขั้นตอนการทำแห้ง ซึ่งจะได้กรดซิตริกในรูป citric acid monohydrate ออกมาในที่สุด

สำหรับการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อยีสต์ เช่น Candida นอกจากกรดซิตริกที่ถูกสร้างขึ้นมาแล้วมักจะมีกรดไอโซซิตริกปนออกมาด้วยเสมอ ดังนั้นการเก็บเกี่ยวผลผลิตจึงจำเป็นต้องแยกกรดทั้งสองออกจากกันทั้งนี้สามารถทำได้โดยการเติมปูนขาว (ในรูปของไฮดรอกไซด์) ในอัตราส่วน 3:3 ส่วนน้ำหมักที่แยกเชื้อออกไปแล้วควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 85-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะทำให้กรดไอโซซิตริกตกตะกอนลงมา จากนั้นจึงนำทั้งเกลือซิเตรทและเกลือไอโซซิเตรทไปผ่านกระบวนการเก็บเกี่ยวดังที่กล่าวมาแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. การผลิตกรดซิตริกโดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์

แม้ว่าการผลิตกรดซิตริกโดยส่วนใหญ่จะใช้เชื้อรา *A.niger* และเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆ อีกก็ตาม แต่ยังมีเชื้อยีสต์อีกหลายชนิดที่พบว่ามีการสะสมกรดซิตริกในระหว่างการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อยีสต์ดังกล่าวนี้ได้แก่ Candida, Hansenula, Pichia, Debaryomyces Torulopsis, Kloeckera, Trichosporon, Torula, Rhodotorula, Sporobolomyces, Endomyces, Nocardia, Saccharomyces และ Zygosaccharomyces เป็นต้น ในบรรดาเชื้อยีสต์เหล่านี้ Candida จัดว่าเป็นเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกอย่างกว้างขวาง และมีหลาย สปีชีส์ (species) อาทีเช่น *C. lipolytica, C. tropicalis, C. zeryanoides, C.fibrae, C. intermedia, C. parapsilosis, C. petrophilum, C. subtropicalis, C. oleophila, C. hitachinica, C. citrica, C. guilliermondii* และ *C. sucrosa*

ในการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อยีสต์นี้มีวัตถุดิบที่ใช้หลายชนิดด้วยกัน เช่น กลูโคส อะซิเตท ไฮโดรคาร์บอน กากน้ำตาล แอลกอฮอล์ กรดไขมัน และน้ำมันธรรมชาติ (natural oils) ซึ่งการหมักกรดซิตริกจากวัตถุดิบแต่ละชนิด มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

8.1 การผลิตกรดซิตริกจากน้ำตาลกลูโคส

น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นเท่ากับ 10-18 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สารอาหารอื่นๆ ที่ใช้ประกอบด้วย NH_4Cl , KH_4PO_4, $MgSO_4.7H_2O$ และ $CaCO_3$ (ซึ่งเป็นสารที่ใช้สะเทินหรือ neutralizing agent อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของสารอาหารต่างๆ ที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์เป็นหลัก หลังจากถ่ายเชื้อยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วทำการหมักที่อุณหภูมิระหว่าง 22-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-6 วัน และในระหว่างการหมักจะต้องมีการให้อากาศอย่างเต็มที่ โดยอาจใช้การปั๊มอากาศบริสุทธิ์เข้าไปโดยตรงหรืออาศัยการกวนในอัตราที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้เพราะเชื้อยีสต์นำออกซิเจนที่ได้สำหรับการเจริญเติบและกระบวนการเมตาบอลิซึ่มของมัน

8.2 การผลิตกรดซิตริกจากกากน้ำตาล

เชื้อยีสต์ที่ใช้อยู่ในสายพันธุ์ Candida เช่น *C. guilliermondii* และ *C. lipolytica* สำหรับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วยกากน้ำตาล (50-250 กรัมต่อลิตร) แหล่งไนโตรเจน (ในรูปของ $(NH_4)_2SO_4$ NH_4Cl หรือ NH_4NO_3) แร่ธาตุและวิตามินบีรวม ปรับพีเอช 5.5-6.5 รวมทั้งให้อากาศแก่น้ำหมักในอัตรา 0.3-1.5 vvm ผลของการหมักจะได้กรดซิตริกในรูป citrate monohydrate เท่ากับ 1,119 กิโลกรัม เมื่อเทียบกับน้ำตาลในวัตถุดิบ 3,145 กิโลกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.3 การผลิตกรดซิตริกจากแอลกอฮอล์

แอลกอฮอล์ที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีหลายชนิดทั้งเมทานอล เอทานอล รวมถึงแอลกอฮอล์ที่มี 12-16 คาร์บอน ซึ่งเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในรูปนี้ ได้*แก่ C. fibrae C. subtropicalis , Pichia farinosa , C. lipolytica* และ *Torulopsis xylinus* เป็นต้น ทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลกอฮอล์ประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ จะได้กรดซิตริกประมาณ 28 กรัมต่อลิตร ภายใน 7 วัน

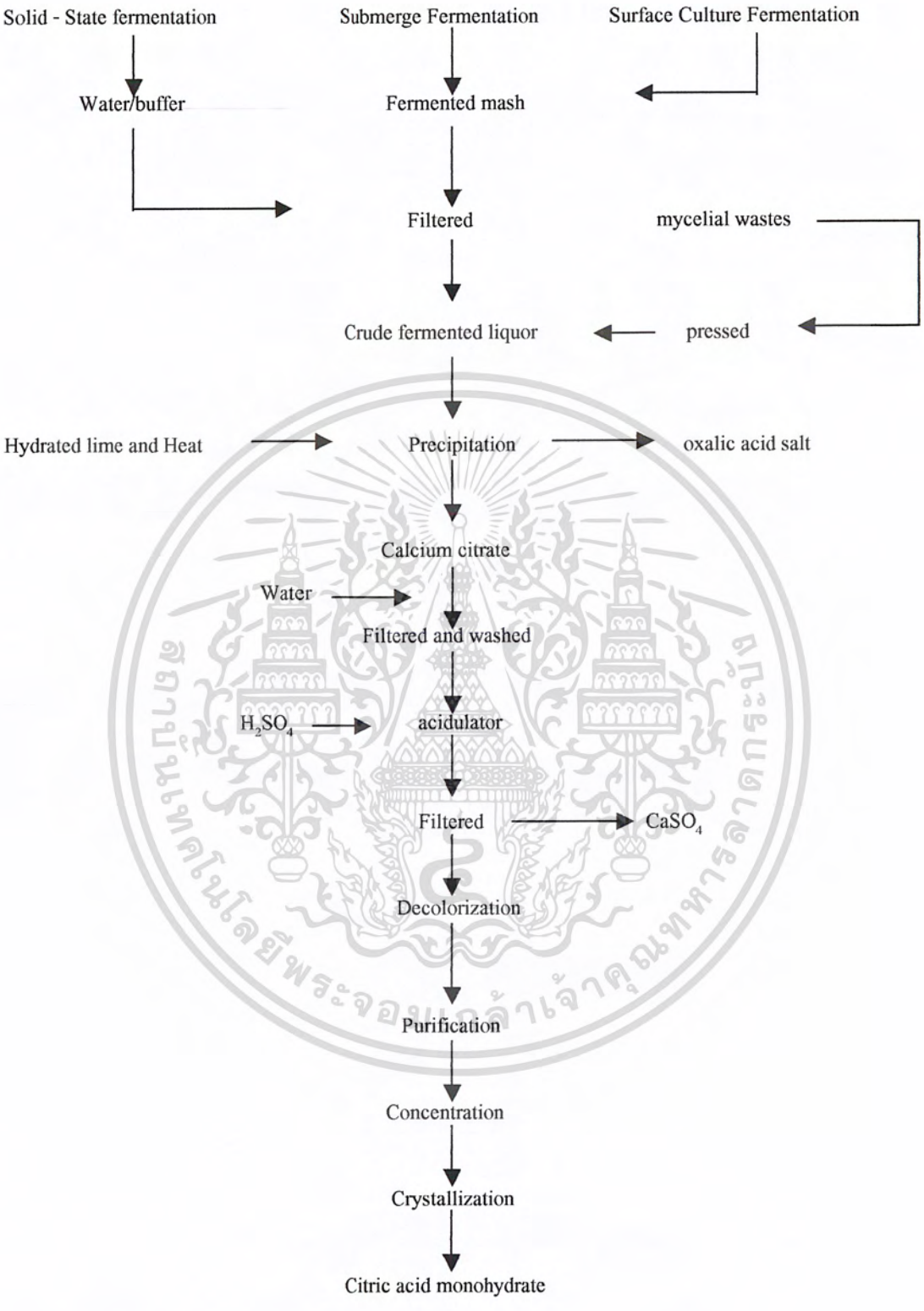
8.4 การผลิตกรดซิตริกจากกรดไขมัน น้ำมันธรรมชาติและไขมัน

ยีสต์สายพันธุ์ Candida , Hansenula และ Pichia สามารถใช้กรดไขมัน (fatty acid) น้ำมันธรรมชาติ (natural oils) และไขมัน (fats) เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริกได้ ผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้แต่ละอย่าง

ในการใช้เชื้อยีสต์เพื่อผลิตกรดซิตริก มักจะมีปัญหาการสะสมกรดไอโซซิตริก (isocitric acid) ควบคู่กันด้วย จึงทำให้ผลผลิตของกรดซิตริกลดลงเพราะส่วนหนึ่งของกรดซิตริกถูกเปลี่ยน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2-6 ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Lakshminarayans และ คณะ (1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

47322

ไปเป็นกรดไอโซซิตริก เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ aconitase สูง อย่างไรก็ตาม เราสามารถที่จะควบคุมการหมักให้มีการสะสมกรดไอโซซิตริกลดลง โดยอาศัยการควบคุมปริมาณเฟอริกไอออน (ferric ion) ให้อยู่ในระดับต่ำ แต่ปัญหาอยู่ที่การควบคุมปริมาณเฟอริกไอออนให้อยู่ในระดับที่ต้องการดังกล่าวสามารถทำได้ยาก ดังนั้นจึงได้มีการประยุกต์ใช้ การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมและให้กรดซิตริกสูง ในขณะที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ aconitase ต่ำ จึงทำให้ปริมาณกรดไอโซซิตริกลดลงไปด้วย ดังเช่น เชื้อ *C. lipolytica* สายพันธุ์ที่ไวต่อสารฟลูออโรอะซิเตท (fluoroacetate-sensitive strains) เป็นต้น

การเปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อยีสต์ และเชื้อรากลุ่ม Aspergilli พบว่าการหมักด้วยเชื้อยีสต์ให้ข้อได้เปรียบในด้านการพัฒนากระบวนการหมักให้เป็นกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่องเพราะการควบคุมให้เชื้อยีสต์เจริญและทำการหมักอย่างต่อเนื่อง สามารถทำได้ง่ายกว่าเชื้อรานั่นเอง

กระบวนการหมักสำหรับการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์ เป็นกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในประเทศอุตสาหกรรม เพราะว่าให้ผลผลิตสูงใช้แรงงานและพื้นที่น้อย มีการออกแบบถังหมักหลายรูปแบบโดยคำนึงถึงการกวน การให้อากาศและใช้วัสดุที่ทนกรดได้ดี ตัวอย่างเช่น ถังหมักแบบหอสูง (tower fermentor) ถังหมักแบบกวน (stirred tank fermentor) และถังหมักแบบแอร์ลิฟต์ (air-lift fermentor) ในการผลิตกรดซิตริกนิยมใช้ถังหมักแบบหอสูงและมีระบบการทำความเย็นที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากในระหว่างการหมักจะเกิดความร้อนขึ้น สำหรับขั้นตอนการหมักทำได้โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกสายพันธุ์แล้ว ในถังหมักขนาดเล็กเพื่อเตรียมหัวเชื้อ ถ่ายเชื้อที่เจริญเต็มที่ลงในถังหมักที่มีอาหารสำหรับการผลิตกรดซิตริก ควบคุมอุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส ขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต้องไม่ต่ำเกินไปซึ่งสามารถควบคุมโดยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตหรือใช้ด่างแก่ (Milsom และ Meers,1985)

กระบวนการหมักสำหรับการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์ ใช้การหมักแบบแบทช์ (batch fermentation process) เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากสามารถป้องกันการปนเปื้อนได้ง่ายและสามารถเพิ่มการผลิตในแต่ละครั้งได้ การใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องสำหรับการผลิตกรดซิตริกได้มีผู้รายงานเช่นกัน นอกจากการใช้กระบวนการหมักที่กล่าวมาแล้ว ปัจจุบันได้มีการศึกษาการผลิตกรดซิตริกโดยวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์ โดยใช้สารพวกโพลีอะคริลาไมด์เจล คาร์ราจีแนนและอัลจิเนต เป็นต้น ข้อดีของการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *A. niger* คือ อัตราการเจริญและการผลิตกรดซิตริกเร็วกว่า ใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด และสามารถพัฒนากระบวนการหมักให้เป็นการหมักแบบต่อเนื่องได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์

กระบวนการหมักสำหรับการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์ เป็นการหมักในสภาพอาหารเหลวจึงมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริกซึ่งได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดซิตริก

9.1 สายพันธุ์ของเชื้อยีสต์

ปัจจุบันพบว่ามียีสต์หลายสายพันธุ์ ที่สามารถผลิตกรดซิตริกในระหว่างการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น *Candida* sp., *Debaromyces* sp., *Endomyces* sp., *Hansenula* sp. *Kloeckera* sp., *Nocardia* sp., *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., *Sporobolomyces* sp. *Saccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Trichosporon* sp. และ *Zygosaccharomyces* sp. แต่พบว่ายีสต์สายพันธุ์ Candida เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง สายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ต้องมีความสามารถในการผลิตกรดซิตริกได้สูง

9.2 สภาวะที่เหมาะสำหรับการผลิตกรดซิตริก

9.2.1 แหล่งของคาร์บอน

การผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์สามารถใช้แหล่งของคาร์บอนได้หลายชนิดเช่น กลูโคส กากน้ำตาล ไฮโดรคาร์บอน อะซิเตท แอลกอฮอล์ กรดไขมันและน้ำมันธรรมชาติ เป็นต้น โดยแหล่งของคาร์บอนที่เลือกใช้ต้องมีราคาถูกและหาง่ายเพื่อลดต้นทุนการผลิต น้ำตาลกลูโคสจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อยีสต์นำไปใช้ได้ง่ายและรวดเร็วแต่มีราคาแพง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาแหล่งของคาร์บอนที่มีราคาถูกกว่า

9.2.2 แหล่งของไนโตรเจน

แหล่งของไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารสำหรับการผลิตกรดซิตริกอยู่ในรูปของอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน แหล่งของอินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เปปโตน (peptone) คอร์นสตีปลิเคอร์ (corn-steep liquor) ส่วนแหล่งของ อนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย แอมโมเนียมอะซิเตต และแอมโมเนีย เป็นต้น ชนิดของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 2 รูปแบบอาจจะใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือใช้ควบคู่กันก็ได้ แต่แหล่งไนโตรเจนต้องใช้ในปริมาณที่จำกัด เนื่องจากการสะสมกรดซิตริกจะเกิดขึ้นหลังจากที่แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้หมดแล้ว ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.5-1.0 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.2.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นสารที่จำเป็นสำหรับเชื้อยีสต์ในการเจริญและการผลิตกรดซิตริก ในระยะเริ่มต้นของการหมัก ขณะที่ยังมีเกลือฟอสเฟตในอาหาร เชื้อจะอยู่ในช่วงการเจริญโดยที่เกลือฟอสเฟตจะชะลอการสร้างกรดไว้ก่อน เมื่อเกลือฟอสเฟตหมดลงไปเชื้อจึงเริ่มการสังเคราะห์กรดขึ้น (Szuce, 1944) ส่วน Steel และคณะ (1955) ได้เติมเกลือฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากกากน้ำตาลของผักกาดหวาน ในปริมาณ 0.01-0.50 กรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีการสร้างกรดออกซาลิก แต่เม็ดเชื้อจะมีขนาดใหญ่ผิดปกติทำให้มีความหนืดเพิ่มขึ้นแล้ว ในที่สุดจะขัดขวางการทำงานของเครื่องให้อากาศ นอกจากนี้ Martin กับ Steel (1955) พบว่าถ้าเติมเกลือฟอสเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากกากน้ำตาลหัวผักกาดมากเกินไป นอกจากจะได้กรดซิตริกออกมาน้อยแล้ว รายังสร้างกรดกลูโคนิก กรดมาลิก เพิ่มขึ้นอีกด้วย และการสะสมของกรดซิตริกจะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อมีการจำกัดปริมาณฟอสเฟต Shimizu และคณะ (1970) ได้รายงานว่า โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งของฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซิตริก โดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Candida

9.2.4 แร่ธาตุ

ได้มีผู้รายงานเกี่ยวกับผลของแร่ธาตุบางชนิดที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์ เช่น แมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟตเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิตริก Fired (1972) ได้รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อ Candida ในอาหารที่มีตะกั่วปริมาณ 0.5 – 1.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงกว่าอาหารที่ไม่เติมตะกั่ว Furukawa และคณะ (1977) ได้ศึกษาผลของทองแดงไอออน ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเตส พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของทองแดงไอออน ทำให้การผลิตกรดไอโซซิตริกลดลงและความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เหล็กไอออนเป็นแร่ธาตุอีกชนิดหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก เนื่องจากเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเตส การเติมเหล็กไอออนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าจะทำให้เกิดการสร้างกรดไอโซซิตริกสูงขึ้นแต่การผลิตกรดซิตริกลดลง

9.2.5 สารเสริมอื่นๆ

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์นอกจากเติมสารต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีการเติมสารบางชนิดซึ่งเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการผลิตกรดซิตริก เช่น ไธอะมีน กรดนิโคตินิกและไบโอติน โดยเฉพาะไธอะมีนเป็นสารที่จำเป็นสำหรับเชื้อยีสต์ในการผลิตกรดซิตริก หรืออาจใช้ในรูปของสารประกอบเช่น สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) และคอร์นสตีปลิเคอร์ (corn-steep liquor) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.2.6 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ความเป็นกรด-ด่างนับว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การหมักบรรลุผลสำเร็จเมื่อใช้ความเป็นกรด-ด่างต่ำ ๆ นอกจากจะได้กรดซิตริกออกมามากยังช่วยลดการเกิดกรดออกซาลิกและลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นด้วย โดยไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อในอาหารเหลวที่อุณหภูมิสูงและเป็นเวลานาน ในการหมักจำเป็นต้องปรับกรด-ด่างเริ่มต้น ทั้งนี้ขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ การปรับกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในระดับที่ต่ำ (ความเป็นกรดต่ำ) ก่อให้เกิดผลดีดังนี้

9.2.6.1 ช่วยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ

9.2.6.2 ยับยั้งการสร้างและ/หรือ การสะสมกรดออกซาลิก

9.2.6.3 ช่วยทำให้กระบวนการฆ่าเชื้อที่ใช้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดซิตริกจะแตกต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์และวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน การผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์นั้น เมื่อมีการสะสมกรดซิตริกในระหว่างการหมัก ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงและไปยับยั้งการทำงานของเซลล์ทำให้การผลิตกรดซิตริกลดลง ดังนั้นจึงได้มีการเติมสารบางชนิดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อรักษาค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ ตัวอย่างเช่น แคลเซียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮดรอกไซด์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างสำหรับการผลิตกรดซิตริกในระดับขวดเขย่านิยมใช้แคลเซียมคาร์บอเนต โดยเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น ปริมาณที่เหมาะสมขึ้นกับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อผลิตขึ้น แต่ถ้าเป็นการผลิตกรดซิตริกในระดับถังหมักสามารถใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเติมในถังหมักตั้งแต่เริ่มต้น หรือใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เติมลงในถังหมักในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ส่วนแคลเซียมไฮดรอกไซด์เตรียมในรูปสารแขวนลอยในน้ำและเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการหมักเช่นกัน ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์อยู่ในช่วง 4.5-6.5 นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างถ้าสูงเกินไปเชื้อยีสต์จะผลิตสารโพลีออลส์ (polyols) อิริทริทอล (erythritol) และแมนนิทอล (mannitol) แทนการผลิตกรดซิตริก

9.2.7 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งสำหรับการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์ เนื่องจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดซิตริกแตกต่างกัน โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.2.8 การให้อากาศและการกวน

การผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์ เป็นการหมักในสภาวะที่ต้องการออกซิเจน ดังนั้นในระหว่างการหมักโดยเฉพาะในช่วงที่เชื้อมีการเจริญจำเป็นต้องให้อากาศอย่างเพียงพอ การถ่ายเทของออกซิเจนในถังหมักขึ้นกับองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน องค์ประกอบและสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความดันและอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก การหมักในสภาพอาหารเหลวนั้น อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนต้องใช้ควบคู่กันอย่างเหมาะสม Tabuchi และคณะ (1975) ได้รายงานว่า การผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดโดยเชื้อ *Candida lipolytica* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสนั้นต้องมีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอ ถ้าให้ออกซิเจนไม่เพียงพออัตราการผลิตกรดซิตริกจะลดลง

9.2.9 ฟองและการควบคุม

ในขณะที่หมักกรดซิตริกนั้นนอกจากจะมีการให้อากาศและการกวนแล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อยังมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่สูง ตลอดจนเชื้อจะมีการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาด้วย จึงทำให้มีฟองเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก ฟองที่เกิดขึ้นอาจควบคุมได้โดยการเติมสารพวก ไขมันหรือน้ำมันลงในน้ำหมัก น้ำมันที่เติมลงไปนอกจากลดปัญหาเรื่องฟองแล้วยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักอีกด้วย น้ำมันที่เติมอาจเป็น เนย เปรียง น้ำมันมะกอก น้ำมันหมู น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วลิสง และอื่นๆ (Noyes, 1969) Gold และ Kiber (1968) แนะนำว่าในช่วงแรกของการหมักควรปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.0 เมื่อหมักไประยะหนึ่งแล้วจะลดลงเหลือ 2.0-2.5 ถ้าความเป็นกรด-ด่างลงลงเหลือประมาณ 3.0 จะเริ่มมีปัญหาเรื่องฟอง จึงควรเติมสารป้องกันฟองจำพวกไขมันหรือน้ำมันลงไปประมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณที่ใช้นี้สามารถป้องกันฟองได้ตลอดช่วงของการหมัก

9.2.10 ระยะเวลาในการหมัก

ระยะเวลาที่ใช้สำหรับการผลิตกรดซิตริกขึ้นกับสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ อาหารและสภาวะที่ใช้ในการหมัก ซึ่งโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 3-6 วัน

9.2.11 ปัจจัยอื่นๆ

การปนเปื้อนของโลหะหนัก ที่มาจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตมีความสำคัญต่อการหมักกรดซิตริก จึงมีการพยายามเพิ่มผลผลิตที่ได้จากการหมักโดยการเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

9.2.11.1 Hexacyanoferrate

ใช้ในการกำจัดการปนเปื้อนของโลหะที่มีในแหล่งคาร์บอนโดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็น chelating agent พบว่าผลได้ของกรดซิตริกสูงขึ้น ถ้ามี Hexacyanoferrate ในสารละลายสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปกติเล็กน้อย เนื่องจากจะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 10-200 มิลลิกรัมต่อลิตร (Rohr และ Kubicek,1986)

9.2.11.2 Fatty material

Mills (1963) พบว่าน้ำมันธรรมชาติที่มีสัดส่วนของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงจะเพิ่มผลได้สุดท้ายของการผลิตกรดซิตริกโดยไม่มีผลต่อผลได้สุดท้ายของน้ำหนักแห้ง Fatty material ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักมักเป็นสารกำจัดฟอง ปริมาณกรดไขมันที่เหมาะสม คือ ร้อยละ0.05-0.3

9.2.11.3 สารประกอบอื่นๆ

สารประกอบอื่นที่มีผลเช่น H_2O_2 ซึ่งจะมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ aconitase และเพิ่ม oxygen tension ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ Benzoic acid , Amine oxide , EDTA , Iron cyanide และ Verniculite เป็นต้น (Rohr และ Kubicek, 1986)

10. การใช้ประโยชน์จากกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม (ดุษณี , 2537)

กรดซิตริกที่ผลิตขึ้นเพื่อเป็นการค้า จะผลิตในรูปปราศจากน้ำหรือในรูปโมโนไฮเดรต ซึ่งการผลิตกรดซิตริกในรูปปราศจากน้ำจะได้จากการตกผลึกของสารละลายที่กรดร้อน ในขณะที่กรดซิตริกในรูปโมโนไฮเดรตได้จากการตกผลึกสารละลายที่อุณหภูมิต่ำกว่า 36.5 องศาเซลเซียส เนื่องจากกรดซิตริกเป็นสารที่มีรสเปรี้ยว สามารถละลายในน้ำได้สูง ย่อยสลายได้ง่าย มีความเป็นพิษต่ำ มีคุณสมบัติในการจับโลหะหนักและการเป็นบัฟเฟอร์ จึงมีการนำเอากรดซิตริก เกลือ และเอสเทอร์ของกรดซิตริก ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ในอุตสาหกรรมยามีการใช้กรดซิตริกอย่างกว้างขวาง ประโยชน์ของการใช้กรดซิตริก เกลือ และเอสเทอร์ของกรดซิตริก มีดังนี้

10.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

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

ข้อกำหนดในการใช้กรดซิตริกเป็นวัตถุเจือปนในอาหาร ซึ่งอนุญาตให้ปนในอาหารบางชนิดเพื่อวัตถุประสงค์ต่างกันดังนี้

1. สำหรับปรับความเป็นกรด-ด่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สำหรับการปรุงแต่งกลิ่นรส และป้องกันการรวมตัวเป็นก้อนของน้ำตาล

3. สำหรับป้องกันการรวมตัวเป็นก้อน

4. สำหรับการป้องกันการเปลี่ยนสี กลิ่น รส และกันเสียของผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกรรมวิธีบรรจุกระป๋อง

5. สำหรับป้องกันการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็ง

6. สำหรับป้องกันการเกิดการเปลี่ยนสี กลิ่น รส และช่วยเสริมฤทธิ์วัตถุกันเสียของผลิตภัณฑ์อาหาร

7. สำหรับป้องกันการเกิดตะกอนของผลิตภัณฑ์อาหารดอง คือ มะกอกดอง ด้วยการใช้ปริมาณ 15,000 ppm (หนึ่งในล้านส่วน)

10.2 อุตสาหกรรมยา

ใช้เป็นส่วนผสมในการทำยาบางชนิด เป็นสารทำให้เกิดฟองฟู่เมื่อผสมกับคาร์บอเนตหรือไบคาร์บอเนต โดยใช้ในการเตรียมยาลดกรด หรือแอสไพรินที่ละลายน้ำได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็น stabilizer ในวิตามินซีอีกด้วย การใช้ผสมกับยาจะใช้ในรูปของเกลือ หรือเอสเทอร์ของกรดซิตริก

10.3 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

ใช้กรดซิตริกเป็นส่วนผสมเพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างและป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยโลหะหนักในการทำเครื่องสำอาง เช่น ยาสระผม ครีมนวดผม โลชั่น โดยจะควบคุมระดับพีเอชของผลิตภัณฑ์และช่วยเพิ่มความแวววาวและความอ่อนนุ่มของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังเป็นวัตถุกันเสียอีกด้วย

10.4 อุตสาหกรรมอื่นๆ

10.4.1 ใช้ทำความสะอาดโลหะล้างสนิม เนื่องจากกรดซิตริกสามารถรวมตัวกับโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ได้เป็นอย่างดี

10.4.2 ใช้ผสมกับผงซักฟอกในรูปของไตรโซเดียมซิเตรตแทนการใช้โพลีฟอสเฟต เพื่อช่วยในการทำความสะอาดให้ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10.4.3 ใช้เป็น plasticizer ในแผ่นฟิล์มพลาสติกที่ใช้ห่อหุ้มอาหารในรูปของไตรเอทิล (triethyl) ไตรบิวทิล (tributyl) และอะซิติลไตรบิวทิวเอสเทอร์ (acetyltributyl ester) เนื่องจากไม่มีความเป็นพิษ

10.4.4 ใช้เป็นส่วนผสมของหมึกพิมพ์ น้ำและสี

10.4.5 ใช้เป็น solftener ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น

10.4.6 ใช้ในการกำจัดของเหลือทิ้งมีพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน ซึ่งได้แก่ โลหะหนัก และสารกัมมันตภาพรังสี ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

10.4.6.1 การสกัดแยก โลหะหนักและสารกัมมันตรังสีออกจากดิน โดยวิธีการล้างดินด้วยสารละลายกรดซิตริก กรดซิตริกจะจับตัวกับเหล็กและสารกัมมันตภาพรังสี อยู่ในรูป metal citrate complex

10.4.6.2 การย่อยสลายทางชีวภาพ โดยแบคทีเรียจะทำการย่อยสลาย metal citrate complex ให้อยู่ในรูปที่ไม่มีอันตราย ยกเว้น uranyl citrate complex ซึ่งแบคทีเรียไม่สามารถย่อยได้ ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีการในขั้นที่ 3 คือการย่อยสลายทางกายภาพ

10.4.6.3 การย่อยสลายทางกายภาพ ได้แก่ การใช้แสงจากดวงอาทิตย์ แสงสามารถทำลายพันธะระหว่าง citrate และ uranium ได้

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

นอกจากประโยชน์ต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว เกลือของกรดซิตริกยังมีประโยชน์ในทางการแพทย์อีกด้วย เช่น เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรท (ferric ammonium citrate) ใช้ในการรักษาโรคโลหิตจาง หรือการใช้ไตรโซเดียมซิเตรท (trisodium citrate) ในการเก็บรักษาเลือด โดยป้องกันเลือดไม่ให้เกาะกันเป็นก้อน

อุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริกเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่รัฐบาลมีบทบาทมากในด้านการคุ้มครอง และส่งเสริมผู้ผลิตภายในประเทศ มาตรการคุ้มครองได้แก่ การเก็บภาษีศุลกากรนำเข้าและการเก็บค่าธรรมเนียมพิเศษ มาตรการคุ้มครองของรัฐบาลเป็นปัจจัยที่ทำให้อุตสาหกรรมกรดซิตริกอยู่รอดและสามารถแข่งขันกับกรดซิตริกนำเข้าได้ ซึ่งรัฐบาลให้การคุ้มครองโดยให้การต่ออายุการเก็บค่าธรรมเนียมพิเศษทุกปี

ถ้าหากพิจารณาทางด้านอุปสรรคในการเข้าสู่ตลาด จากการศึกษา (วิสุทธิ์ , 2534) พบว่าลักษณะโครงสร้างของอุตสาหกรรมกรดซิตริกบางประการ ได้เอื้อต่อการเกิดอุปสรรคในการเข้าสู่ตลาดของผู้ผลิตรายใหม่ กล่าวคือ ลักษณะของกรดซิตริกเอง มีขนาดไม่ใหญ่มากนัก จากขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตลาดที่ไม่ใหญ่พอทำให้การผลิตกรดซิตริกมีต้นทุนสูง และต้องมีการแข่งขันกับกรดซิตริกที่นำเข้าจากต่างประเทศ ทางด้านแนวโน้มในอนาคตเกี่ยวกับมาตรการและนโยบายของรัฐบาลที่จะส่งผลกระทบต่อการกีดกันผู้ลงทุนรายใหม่นั้นรัฐบาลได้มีมาตรการลดภาษีและการใช้ระบบภาษีมูลค่าเพิ่ม นับว่าเป็นมาตรการโดยทั่วไปเกี่ยวกับการส่งเสริมอุตสาหกรรม และเทคโนโลยีซึ่งส่งผลกระทบต่อการลงทุนในอุตสาหกรรมกรดซิตริกอีกด้วย และการศึกษาพบว่าความต้องการกรดซิตริกจะมีเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณการผลิตสินค้าที่ใช้กรดซิตริก เช่น เครื่องดื่ม ผักและผลไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

- *Candida lipolytica* TISTR 5655
- *Candida oleophila* TISTR 5678
- *Candida tropicalis* TISTR 5045

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารสูตร Yeast malt agar

2.2 น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ใช้น้ำส่วนที่ได้จากการบีบเมล็ดโกโก้สด

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1 เครื่องมือพื้นฐานทางชีววิทยา

3.2 เครื่องกั้นน้ำแบบบีดอัด

3.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.5 เครื่องกรองโดยใช้ความดัน

3.6 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

3.7 เครื่องอบสารร้อน (hot air oven)

3.8 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave)

3.9 เดซิเคเตอร์ (desicator)

4. วิธีการทดลอง

4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยวิเคราะห์

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง
- ไนโตรเจนทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ปริมาณโปรตีน
- ของแข็งแขวนลอย (suspended solid)
- ของแข็งทั้งหมด (total solid)
- น้ำตาลรีดิวซ์
- ปริมาณกรดซิตริกเริ่มต้น
- แร่ธาตุบางชนิด เช่น ทองแดง แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม แมงกานีส และสังกะสี (วิเคราะห์โดยเครื่อง Atomic Absorbtion)

4.2 คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ โดยยีสต์ที่นำมาใช้มีดังนี้

- *Candida lipolytica* TISTR 5655
- *Candida oleophila* TISTR 5687
- *Candida tropicalis* TISTR 5045

4.2.1 การเก็บรักษาเชื้อยีสต์

ถ่ายเชื้อโดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ลากบนอาหารแข็งลาดเอียง (YM slant) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เก็บเชื้อในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อ (sub – culture) ทุกเดือน

4.2.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อยีสต์

เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็งลาดเอียง (YM slant) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำเป็นเซลล์แขวนลอยโดยใช้น้ำกลั่นที่กำจัดไอออน (deionized water) และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5.0 มิลลิลิตร ต่อหลอดอาหารแข็งลาดเอียง

4.2.3 การเตรียมหัวเชื้อ

ปิเปตต์เซลล์แขวนลอยที่เตรียมได้ในข้อ 4.2.2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (YM broth) ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง นำสารละลายของเชื้อยีสต์มาวัด ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ให้ได้ OD = 0.5 (ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ยีสต์ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เพื่อนำมาเป็นหัวเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 การเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อผลิตกรดซิตริกในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design) โดยมีจำนวน ซ้ำ 3 ซ้ำ นำน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อขวดละ 5 มิลลิลิตร (ร้อยละ10) เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 2 4 6 8 10 และ 12 ทำการวิเคราะห์หากรดซิตริก ด้วยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ การเจริญเติบโตของยีสต์โดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ทางสถิติ และทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

4.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (ความเข้นข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้) ที่มีต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อที่คัดเลือกได้

โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 50 75 และ 100 (เจือจางโดยใช้น้ำกลั่น) บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 4.2.3 ขวดละ 5 มิลลิลิตร (ร้อยละ10) เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 2 4 6 และ 8 ทำการวิเคราะห์กรดซิตริก ด้วยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่างด้วย pH meter วัดการเจริญเติบโตโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

4.4 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ที่มีต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อที่คัดเลือกได้

4.4.1 ศึกษาความเข้มข้นของเปปโตน

โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ และเติมเปปโตนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0 0.3 0.5 0.7 บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 4.2.3 ขวดละ 5 มิลลิลิตร (ร้อยละ10) เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วันในวันที่ 0 2 4 6 และ 8 วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ และเติมสารสกัดจากยีสต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0 0.1 0.3 และ 0.5 บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 4.2.3 ขวดละ 5 มิลลิลิตร (ร้อยละ10) เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 4.3

4.4.3 ศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)

โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ และเติมแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0 0.1 0.2 และ 0.3 บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 4.2.3 ขวดละ 5 มิลลิลิตร (ร้อยละ10) เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 4.3

4.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 4.3 และเติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.4 โดยบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 4.2.3 ขวดละ 5 มิลลิลิตร (ร้อยละ 10) เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน วิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

ลักษณะของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ได้จะมีสีขาวขุ่น มีความหนืด มีกลิ่นหอมอ่อนๆ มีรสเปรี้ยวอมหวานเล็กน้อย เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่อนข้างเป็นกรด มีปริมาณไนโตรเจน ของแข็งแขวนลอย ของแข็งทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

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)	0.138×10^2 (พีพีเอ็ม)
-แมงกานีส (Mn)	0.333 (พีพีเอ็ม)
-แคลเซียม (Ca)	9.240 (พีพีเอ็ม)
-สังกะสี (Zn)	0.385 (พีพีเอ็ม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลของการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

จากการศึกษาการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ *Candida oleophila* TISTR 5687 *Candida tropicalis* TISTR 5045 และ *Candida lipolytica* TISTR 5655 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่าเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณสูงสุดคือ 12.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการหมัก (ตารางที่ 4-2) ขณะที่ *C. lipolytica* TISTR 5655 ผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดในวันที่ 12 คือ 12.03 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4-3) สำหรับ *C. tropicalis* TISTR 5045 ผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดในวันที่ 5 คือ 11.22 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4-4) ดังนั้นจึงเลือก *C. oleophila* TISTR 5687 มาใช้ในการศึกษาต่อไป เนื่องจากสามารถผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นที่นำมาใช้ในการทดลอง

3. ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตกรดซิตริก

จากการศึกษาการผลิตกรดซิตริกโดย *Candida oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 50 75 และ 100 (เจือจางโดยใช้น้ำกลั่น) และใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ในสภาวะของการหมักอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน พบว่า ที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 25 จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด เป็น 13.21 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก (ดังตารางที่ 4-5) ในขณะที่การเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 50 75 และ 100 มีปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 6 8 และ 8 ของการหมัก ตามลำดับ คือ 13.21 12.01 และ 12.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4-6 4-7 และ 4-8) เมื่อนำปริมาณกรดซิตริกที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 50 75 และ 100

การศึกษาความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 25 มีค่าต่ำสุด ในวันที่ 4 ของการหมัก คือ 3.44 และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 50 75 และ 100 มีค่าต่ำสุด ในวันที่ 6 8 และ 8 ของการหมัก คือ 3.42 3.41 และ 4.10 ตามลำดับ

การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 25 50 75 และ 100 จะลดลงอย่างต่อเนื่องและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีค่าต่ำสุดในวันสุดท้ายของการหมัก โดยมีค่า 0.0489 0.0096 0.0265 และ 0.0489 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4-2 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)
0	6.73	0.00	1.20
1	6.50	0.04	2.40
2	6.01	0.07	5.27
3	5.40	0.11	7.35
4	3.42	0.19	10.61
5	3.42	0.19	12.03
6	3.41	0.19	12.03
7	3.40	0.19	12.03
8	3.40	0.19	12.03
9	3.39	0.19	12.03
10	3.39	0.19	12.03
11	3.39	0.19	12.03
12	3.39	0.19	12.03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-3 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. lipolytica* TISTR 5655 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

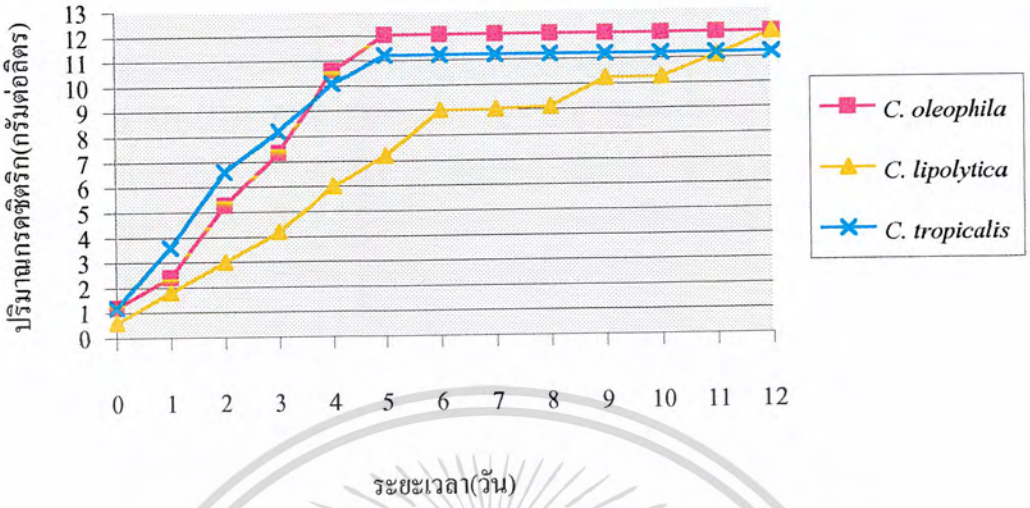
วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)
0	6.73	0.00	0.60
1	6.51	0.02	1.80
2	6.48	0.05	3.00
3	6.44	0.07	4.20
4	6.42	0.09	6.01
5	6.36	0.10	7.21
6	6.29	0.12	9.01
7	6.11	0.14	9.03
8	5.60	0.16	9.12
9	3.45	0.19	10.25
10	3.44	0.19	10.27
11	3.42	0.19	11.12
12	3.42	0.19	12.03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-4 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้งและ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)
0	6.73	0.00	1.20
1	6.50	0.04	3.60
2	6.10	0.06	6.61
3	5.70	0.12	8.21
4	5.30	0.15	10.10
5	3.46	0.19	11.22
6	3.45	0.19	11.22
7	3.45	0.19	11.22
8	3.44	0.19	11.22
9	3.43	0.19	11.22
10	3.42	0.19	11.22
11	3.42	0.19	11.22
12	3.42	0.19	11.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-1 ปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อ *Candida oleophila* TISTR 5687 *Candida lipolytica* TISTR 5655 และ *Candida tropicalis* TISTR 5045 สามารถผลิตได้

ตารางที่ 4-5 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะ เวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.74	0.00	1.20	0.1700
2	6.01	0.14	6.61	0.1400
4	3.44	0.17	13.21	0.1350
6	3.44	0.18	13.21	0.0898
8	3.44	0.18	13.21	0.0489

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-6 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.74	0.00	1.20	0.1800
2	5.70	0.15	7.81	0.1570
4	3.50	0.16	12.10	0.0998
6	3.42	0.18	13.21	0.0096
8	3.42	0.18	13.21	0.0096

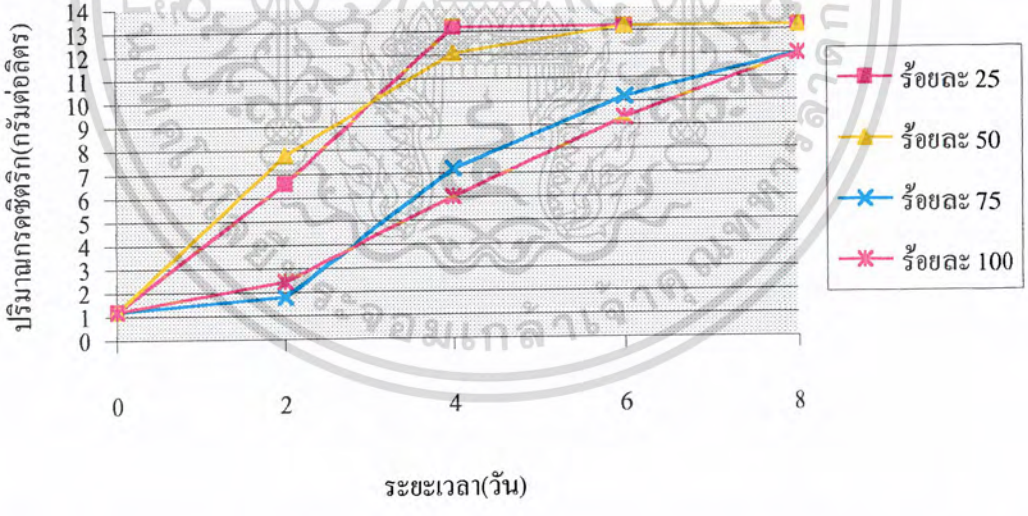
ตารางที่ 4-7 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะ เวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 75

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.73	0.00	1.20	0.2000
2	5.90	0.17	1.80	0.1570
4	5.40	0.18	7.20	0.0898
6	4.80	0.19	10.21	0.0489
8	3.41	0.19	12.01	0.0265

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-8 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะ เวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 100

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.73	0.00	1.20	0.2100
2	5.70	0.16	2.45	0.1350
4	5.10	0.17	6.01	0.1120
6	4.60	0.17	9.32	0.0898
8	4.60	0.17	12.01	0.0489



รูปที่ 4-2 ปริมาณกรดซิตริก ที่เชื้อ *Candida oleophila* TISTR 5687 ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดซิตริก

4.1 ศึกษาความเข้มข้นของเปปโตน (peptone)

จากการศึกษาการผลิตกรดซิตริกโดย *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 0 0.3 0.5 และ 0.7 ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะของการหมักอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน พบว่า ที่ความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 0.3 จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด เป็น 10.21 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก (ตารางที่ 4-9) ในขณะที่การเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 0.5 และ 0.7 มีปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก คือ 10.21 และ 8.41 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4-10 และ 4-11)

การศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 0.3 มีค่าสูงสุด คือ 0.18 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก ในขณะที่การเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 0.5 และ 0.7 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เป็น 0.20 และ0.23 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การศึกษาความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 0.3 มีค่าต่ำสุด ในวันที่ 4 ของการหมัก คือ 4.30และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 0.5 และ 0.7 มีค่าต่ำสุด ในวันที่ 4 ของการหมัก คือ 4.47 และ 4.50 ตามลำดับ

การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 0.3 0.5 และ 0.7 ลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าต่ำสุดในวันที่ 4 ของการหมัก โดยมีค่า 0.0900 0.1000 และ 0.0900 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-9 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้เปปโตนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.3 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.74	0.00	1.20	0.2100
2	5.30	0.14	8.41	0.1600
4	4.30	0.18	10.21	0.0900
6	4.30	0.18	10.21	0.0900
8	4.30	0.18	10.21	0.0900

ตารางที่ 4-10 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้เปปโตนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.72	0.00	1.20	0.2100
2	5.40	0.18	7.20	0.1900
4	4.47	0.20	10.21	0.1000
6	4.47	0.20	10.21	0.1000
8	4.47	0.20	10.21	0.1000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

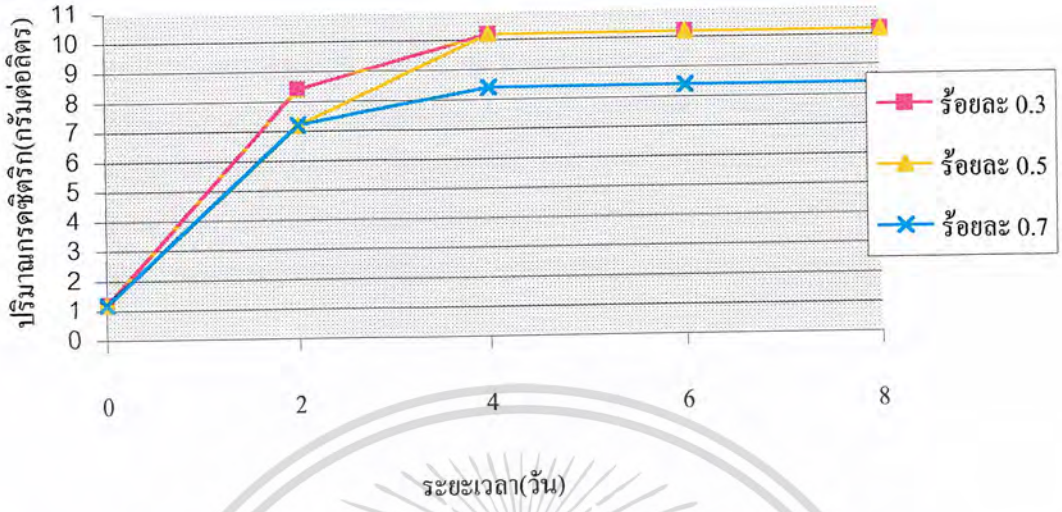
ตารางที่ 4-11 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้เปปโตนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.7 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.72	0.00	1.20	0.2100
2	5.50	0.18	7.21	0.1900
4	4.50	0.23	8.41	0.0900
6	4.52	0.23	8.41	0.0900
8	4.52	0.23	8.41	0.0900

ตารางที่ 4-12 เปรียบเทียบปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ในวันที่ 4 ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้เปปโตนในความเข้มข้นต่างๆ กัน

เปปโตน (ร้อยละ)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	5.10	0.17	6.01	0.1120
0.3	4.30	0.18	10.21	0.0900
0.5	4.47	0.20	10.21	0.1000
0.7	4.50	0.23	8.41	0.0900

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-3 ปริมาณกรดซิตริก ที่เชื้อ *Candida oleophila* TISTR 5687 ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของเปปโตนแตกต่างกัน

4.2 ศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

จากการศึกษาการผลิตกรดซิตริกโดย *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.1 0.3 และ 0.5 และใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะของการหมักอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.1 จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด เป็น 13.81 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก (ดังตารางที่ 4-13) ในขณะที่การเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.3 และ 0.5 มีปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก คือ 11.41 และ 9.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4-14 และ 4-15)

การศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.1 มีค่าสูงสุด คือ 0.17 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก ในขณะที่การเลี้ยงที่มีความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.3 และ 0.5 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เป็น 0.20 และ 0.23 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การศึกษาความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.1 มีค่าต่ำสุด ในวันที่ 4 ของการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมัก คือ 4.04 และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.3 และ 0.5 มีค่าต่ำสุด ในวันที่ 4 ของการหมัก คือ 4.16 และ 4.21 ตามลำดับ

การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.1 0.3 และ0.5 ลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าต่ำสุดในวันสุดท้ายของการหมัก โดยมีค่า 0.0085 0.2480 และ 0.1204 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4-13 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะ เวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้สารสกัดจากยีสต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.74	0.00	1.20	0.2100
2	5.09	0.15	10.21	0.0700
4	4.04	0.17	13.81	0.0150
6	4.04	0.17	13.81	0.0100
8	4.03	0.17	13.81	0.0085

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-14 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้สารสกัดจากยีสต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.3 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.74	0.00	1.20	0.2100
2	5.10	0.17	9.61	0.1005
4	4.16	0.20	11.41	0.0620
6	4.16	0.20	11.41	0.0620
8	4.16	0.20	11.41	0.2480

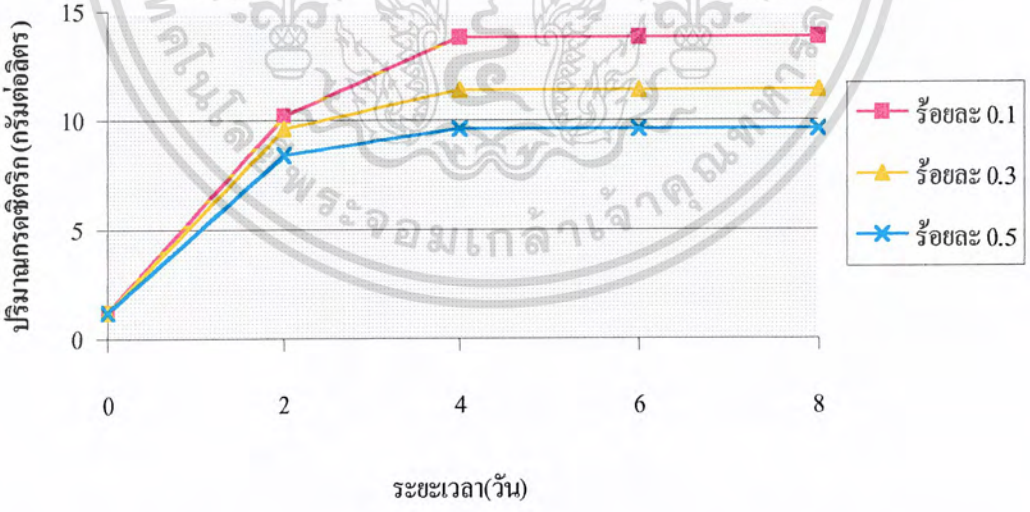
ตารางที่ 4-15 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้สารสกัดจากยีสต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.74	0.00	1.20	0.2100
2	6.09	0.19	8.41	0.1609
4	4.21	0.23	9.61	0.1204
6	4.21	0.24	9.61	0.1204
8	4.21	0.24	9.61	0.1204

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-16 เปรียบเทียบปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ในวันที่ 4 ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้สารสกัดจากยีสต์ในความเข้มข้นต่างๆ กัน

สารสกัดจากยีสต์ (ร้อยละ)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	5.10	0.17	6.01	0.1120
0.1	4.04	0.17	13.81	0.0150
0.3	4.16	0.20	11.21	0.0620
0.5	4.21	0.23	9.61	0.1204



รูปที่ 4-4 ปริมาณกรดซิตริก ที่เชื้อ *Candida oleophila* TISTR 5687 ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)

จากการศึกษาการผลิตกรดซิตริกโดย *Candida oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต ร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.3 ใช้เป็นอาหาร เลี้ยงเชื้อในสภาวะของการหมักอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน พบว่า ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต ร้อยละ 0.2 ให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด เป็น 10.81 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก (ดังตารางที่ 4-18) ในขณะที่การเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต ร้อยละ 0.1 และ 0.3 มีปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก คือ 9.61 และ 8.41 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4-17 และ 4-19)

การศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต ร้อยละ 0.2 มีค่าสูงสุด คือ 0.20 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก ในขณะที่การเลี้ยงที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียมไนเตรต ร้อยละ 0.1 และ 0.3 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เป็น คือ 0.18 และ 0.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การศึกษาความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต ร้อยละ 0.2 มีค่าต่ำสุด ในวันที่ 4 ของการหมัก คือ 6.29 และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมไนเตรต ร้อยละ 0.1 และ 0.3 มีค่าต่ำสุด ในวันที่ 4 ของการหมัก คือ 6.32 และ 6.24 ตามลำดับ

การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต ร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.3 ลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าต่ำสุดในวันสุดท้ายของการหมัก โดยมีค่า 0.0707 0.0344 และ 0.0219 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-17 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้แอมโมเนียมไนเตรตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.74	0.00	1.20	0.2100
2	6.40	0.15	6.61	0.1800
4	6.32	0.18	9.61	0.0707
6	6.32	0.18	9.61	0.0707
8	6.32	0.18	9.61	0.0707

ตารางที่ 4-18 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้แอมโมเนียมไนเตรตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.74	0.00	1.20	0.2100
2	6.47	0.17	8.41	0.1000
4	6.29	0.20	10.81	0.0535
6	6.29	0.21	10.81	0.0535
8	6.29	0.21	11.41	0.0344

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

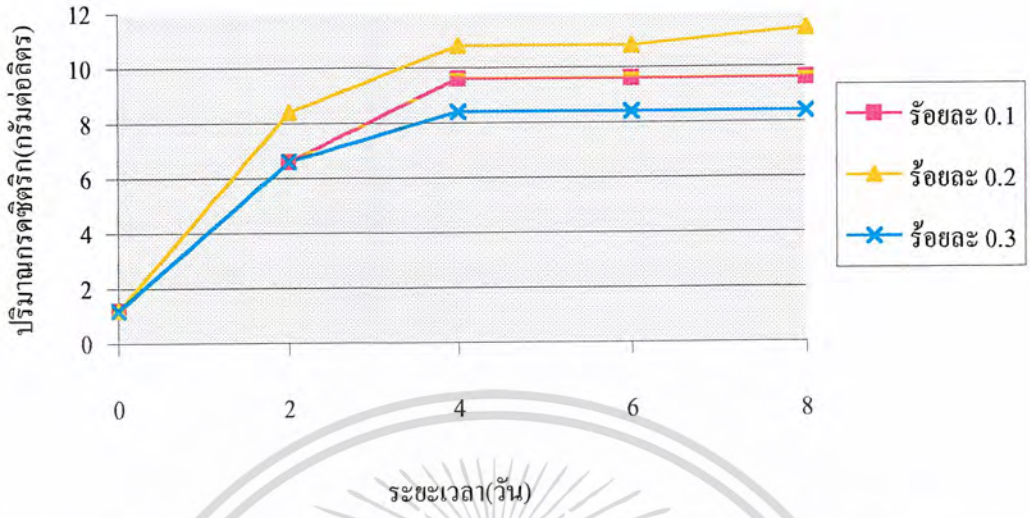
ตารางที่ 4-19 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้แอมโมเนียมไนเตรตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.3 เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.74	0.00	1.20	0.2100
2	6.50	0.20	6.61	0.0900
4	6.24	0.24	8.41	0.0403
6	6.24	0.24	8.41	0.0403
8	6.24	0.24	8.41	0.0219

ตารางที่ 4-20 เปรียบเทียบปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ในวันที่ 4 ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้แอมโมเนียมไนเตรตในความเข้มข้นต่างๆ กัน

แอมโมเนียมไนเตรต (ร้อยละ)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0.1	6.32	0.18	9.61	0.0707
0.2	6.29	0.20	10.81	0.0535
0.3	6.24	0.24	8.41	0.0403

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-5 ปริมาณกรดซิตริก ที่เชื้อ *Candida oleophila* TISTR 5687 ผลิตได้ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตแตกต่างกัน

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ คือ สารสกัดจากยีสต์ และ เปปโตน และแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ คือ แอมโมเนียมไนเตรต ที่ใช้เติมในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เพื่อใช้ในการผลิตกรดซิตริก พบว่า การใช้สารสกัดจากยีสต์ในความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด 13.81 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้เปปโตนในความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และแอมโมเนียมไนเตรตในความเข้มข้นร้อยละ 0.2 จะให้ปริมาณกรดซิตริก 10.21 และ 10.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 4 ของการหมัก (ตารางที่ 4-21)

5. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อยีสต์ในระดับขวดเขย่า

จากการศึกษาในหัวข้อ 3 พบว่าการใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้นร้อยละ 25 จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก และจากการศึกษาในหัวข้อ 4 พบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0 .1 จะให้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจะนำสภาวะที่ได้จากหัวข้อดังกล่าวแล้ว มาศึกษาเพื่อดูปริมาณกรดซิตริกที่ได้ จากการทดลองพบว่า จากการใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ความเข้มข้น ร้อยละ25 และใช้สารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.1 จะทำให้ได้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 4 คือ 14.41 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4-22)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-21 เปรียบเทียบปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน ในวันที่ 4 ของการหมัก

แหล่งไนโตรเจน (ร้อยละ)	ปริมาณกรดซิตริกที่ได้สูงสุด (กรัมต่อลิตร)
เปปโตน ร้อยละ0.3	10.21
สารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 0.1	13.81
แอมโมเนียมไนเตรต ร้อยละ 0.2	10.81

ตารางที่ 4-22 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 และสารสกัดจากยีสต์ที่มีที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.74	0.00	1.20	0.2100
2	5.40	0.21	10.21	0.1800
4	4.30	0.26	14.41	0.0700
6	4.30	0.26	14.41	0.0700
8	4.30	0.26	14.41	0.0700

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการคัดเลือกยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ *Candida lipolytica* TISTR 5655 *Candida oleophila* TISTR 5678 และ *Candida tropicalis* TISTR 5045 พบว่ายีสต์เหล่านี้ผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณต่างกัน โดย *C. oleophila* TISTR 5678 ผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดในวันที่ 5 คือ 12.03 กรัมต่อลิตร สำหรับ *C. lipolytica* TISTR 5655 และ *C. tropicalis* TISTR 5045 ผลิตกรดซิตริกได้ 12.03 และ 11.22 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 และ 5 ตามลำดับ จึงได้คัดเลือก *C. oleophila* TISTR 5678 เพื่อทำการศึกษาต่อไป

จากการศึกษาการผลิตกรดซิตริกโดย *C. oleophila* TISTR 5687 ในสภาวะการเลี้ยงแบบขวดเขย่า ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อาหารที่ใช้ในการเลี้ยง คือ น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ โดยมีการเจือจางที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 25 50 75 และ 100 และมีการศึกษาแหล่งไนโตรเจนโดยมีการเติมสารอาหาร เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรต ลงในอาหารดังกล่าว พบว่า ในสภาวะการผลิตกรดซิตริกที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้) ร้อยละ 25 ให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด คือ 13.21 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติกับปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงที่ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ความเข้มข้นอื่น พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งจะเห็นว่า ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิตกรดซิตริก ซึ่งช่วยให้มีการผลิตกรดซิตริกเพิ่มมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง จะสัมพันธ์กับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อผลิตขึ้น โดยพบว่าเมื่อปริมาณกรดซิตริกสูง ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดต่ำลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็จะลดลงเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการหมัก และน้ำหนักเซลล์แห้งมีการเปลี่ยนแปลงไปในทางเดียวกันกับปริมาณกรดที่เชื้อผลิตขึ้น

ในสภาวะการหมักกรดซิตริกที่เติมเปปโตน ลงในน้ำสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของ เปปโตน คือ ร้อยละ 0.3 และให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงที่สุดคือ 10.21 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติกับปริมาณของกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงที่ความเข้มข้นของเปปโตนอื่นๆ รวมทั้งที่ไม่เติม เปปโตน พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งจะเห็นว่าการเติม เปปโตน มีผลช่วยให้มีการผลิตกรดซิตริกเพิ่มสูงขึ้น สำหรับการเปลี่ยนแปลงของ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ให้ผลสอดคล้องกับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อผลิตขึ้นเช่นเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ในสภาวะการหมักกรดซิตริกที่เติมสารสกัดจากยีสต์ ลงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของสารสกัดจากยีสต์ คือ ร้อยละ 0.1 และให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงที่สุดคือ 13.81 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติกับปริมาณของกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์อื่นๆ รวมทั้งที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งจะเห็นว่าการเติมสารสกัดจากยีสต์ มีผลช่วยให้มีการผลิตกรดซิตริกเพิ่มสูงขึ้น สำหรับการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ให้ผลสอดคล้องกับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อผลิตขึ้นเช่นเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ในสภาวะการหมักกรดซิตริกที่เติมแอมโมเนียมไนเตรต ลงในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของแอมโมเนียมไนเตรต คือ ร้อยละ 0.2 และให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงที่สุดคือ 10.81 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติกับปริมาณของกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต อื่นๆ รวมทั้งที่ไม่เติมแอมโมเนียมไนเตรต พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งจะเห็นว่าการเติม แอมโมเนียมไนเตรต มีผลช่วยให้มีการผลิตกรดซิตริกเพิ่มสูงขึ้น สำหรับการเปลี่ยนแปลงของ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ให้ผลสอดคล้องกับปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อผลิตขึ้น

จากการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อ *C. oleophila* TISTR 5687 และได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะดังกล่าว ทำให้ได้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมักคือ 14.41 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ: 415 น.

ประเสริฐ หาญเมืองใจ. 2536. **การผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยยีสต์ *Candida oleophila* C-73**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กรุงเทพฯ. 2526. **มาตรฐานอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริก**. มอก :464.

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

Dittmar, E.K. 1956. **A composcidao da polpa diferents variedades de cacau da Bahai**. Instituto de Techmologia da Bahai. Boletim 14 : 9 p.

Fried, J.H. 1972. **Production of citric acid by fermentation with Candida strains**. (Pfizer Inc.) Brit. Patent 1, 164,578. 23 February, 1972, Appl. 26, 395/70, 01 June.

Kubicek, CP. and Rohr M. 1986. **Citric acid fermentation**. CRC critical reviews in biotechnology. 3 : 331-373.

Lakshiminarayana, K.; K. Chaudhary; S. Ethiraj and P. Tauro. 1975. **A solid state fermentation method for citric acid production using sugarcane bagasse**. Biotechmol. Bioeng. 17 : 291-293.

Mattey, M. **The production of organic acids**. Crit. Rev. Biotechmol. 1992,12,87-112.

Milsom PE, Meers JL. 1985. **Citric acid**. In : Blanch H, Drew S, Wang D (eds), Comprehensive Biotechnology, Vol. 3, Pergamon Press, London, pp 665-681.

Mueller, H. M. 1975. **Organic acid production**. Pp. 140-157. in The Filamentous Fungi. Vol.1. Industrial Mycology. Edited by J.E. Smith and D.R. Berry. John Wiley and Sons, New York.

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

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

Steel, R., S.M. Martin and C.P. Lentz. 1955. **A standard inoculum for citric acid**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

production in submerged culture. Can. J. Microbiolo. 1: 150-157.

Stern, J.R., 1957. **Assay of tricarboxylic acid**. In colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds.) , Method in Enzymology, vol. 32 PP. 425-428. New York : Academic Press.

Tabuchi, T.; N. Serizawa and H. Uchiyama. 1974. **A novel pathway for the partial oxidation of propionyl-pyruvate via seven-carbon tricarbowylic acids in yeast.** Agric. Biol. Chem. 38 : 2571-2572.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

ก. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Bernfeld, 1955)

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการทำเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 0.2 กรัมต่อลิตร หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

ข. การหาน้ำหนักแห้ง

<u>วิธีการ</u>

1. นำกระดาษกรอง Whatman อบที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำไปตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง (desicator) แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งที่แน่นอน (W_1)
2. นำตัวอย่างที่ทำการแยกโดยผ่านกระดาษกรอง นำตะกอนที่ได้พร้อมกระดาษกรองไปอบ
3. อบที่ 80 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ประมาณ 24-48 ชั่วโมง
4. นำมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งหาน้ำหนัก (W_2)
5. นำค่าน้ำหนักมาทำการคำนวณก็จะได้ค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ในอาหารต่อปริมาตรตัวอย่าง

<u>การคำนวณ</u>

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

ค. การวิเคราะห์หาระดับความเป็นกรด-ด่าง

<u>วิธีการ</u>

ใช้เครื่อง pH meter ในการวัดจากตัวอย่าง ทำการอ่านค่าที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (โดยวิธีบอริก)

<u>สารเคมี</u>

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4,000 กรัมในน้ำกลั่น 10 ลิตร

- กรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 ผสมกับบรอมครีซอล กรีน และเมทิลเรด

ละลายกรดบอริก 400 กรัม ในน้ำกลั่น 6 ลิตร นำไปตั้งบน hot plate ต้มจนละลายหมด เติมน้ำกลั่นที่ร้อน 3 ลิตร ทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง เติม บรอมครีซอล กรีน 100 มิลลิลิตร และ เมทิลเรด 70 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 ลิตร คนให้เข้ากันดี

ดูดสารละลายกรดบอริกมา 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ถ้าสารละลายนขวดรูปชมพู่ยังคงมีสีแดง ให้ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งกลายเป็นสีม่วงเทา คำนวณปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่จำเป็นต้องเติมลงในกรดบอริก 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 หาความเข้มข้นที่แน่นอนโดยไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณ

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

- การทำ standardize กรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล (เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอน)

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

2. หยดเมทิล ออเรนจ์ 2 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ จะได้สารละลายสีเหลือง

3. ใส่กรดไฮโดรคลอริกที่ต้องการทราบความเข้มข้นในบิวเรต

4. นำสารละลาย Na_2CO_3 ที่อยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่มาไทเทรต กับกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีจำปา จดปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้

5. นำไปให้ความร้อน จนเดือดน้อยๆ เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเหลือง ให้ทิ้งไว้จนเย็นแล้วนำมาไทเทรตจนถึงจุดยุติอีก

6. นำปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรตได้มารวมกัน

7. ทำซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย

คำนวณ

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

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 0.9-1.0 กรัม ใส่ลงในกระดาษกรองแล้วใส่ลงใน digestion tube

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

3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตรเขย่าเบาๆ

4. นำ digestion tube วางลงในเครื่องย่อย ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 องศาเซลเซียส แล้วเปิดเครื่องดูดควัน

5. ย่อยเป็นเวลา 50 นาที จนได้สารละลายใสสีเขียวหรือสีฟ้า นำออกมาจากเครื่องย่อยตั้งทิ้งไว้ในเครื่องดูดควัน เพื่อให้หมดควัน เติมน้ำลงใน digestion tube พอประมาณแล้วนำไปเข้าเครื่องกลั่น

6. เปิดก๊อกน้ำเพื่อหล่อเย็นเครื่องควบแน่นและเปิด power ของเครื่องกลั่น (kjeltec)

7. เปิดปุ่ม Akali =2-3 จนแน่ใจว่าในท่อต่างๆ ไม่มีฟองอากาศเหลืออยู่

8. warm เครื่องกลั่น โดยใช้ขวดแก้วรูปชมพู่และ digestion tube เปล่า steam กลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 5 นาที

9. เปิด steam และ digestion tube และขวดแก้วรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น

10. Set Akali = 2 Delay time = 0.2 steam = 3.6

11. นำขวดแก้วรูปชมพู่ซึ่งมีกรดบอริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ไปตั้งบน platform ของเครื่องกลั่น กดปุ่ม auto ยก platform ขึ้นเพื่อให้ digestion tube จุ่มลงในสารละลาย ปิด Safety door เครื่องจะทำงานโดยมีน้ำกลั่นลงมาเจือจางสารตัวอย่าง แล้วตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอดไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้น steam จะทำงาน

12. เมื่อกลั่นจนเสร็จแล้ว นำขวดแก้วรูปชมพู่และ digestion tube ออกจากเครื่อง แล้วทำการกลั่นตัวอย่างใหม่ต่อไป

13. นำขวดแก้วรูปชมพู่ซึ่งมี distillate เป็นสารละลายสีเขียวไปไทเทรตกับกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล จนถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเทา

คำนวณ

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

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

จ. สารแขวนลอย (Suspened Solid)

อุปกรณ์

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

วิธีวิเคราะห์

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

2. เลือกปริมาตรน้ำหนักตัวอย่างที่จะให้ค่าสารแขวนลอยอย่างน้อยสุดประมาณ 2.5 มิลลิกรัม (ไม่รวมน้ำหนักกระดาษกรองใยแก้ว)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. วางกระดาษกรองลงในกรวยที่ต่อเข้าเครื่องดูดอากาศ

4. ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษกรองให้เปียกเพื่อให้ติดแน่นกับกรวย

5. เทตัวอย่างน้ำปริมาตรตามต้องการผ่านกระดาษกรองโดยอาศัยแรงดูดจากเครื่องดูดอากาศ

6. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างของแข็งที่ตกค้างอยู่ข้างกรวยกรองจนหมด รอจนเครื่องดูดน้ำหมด

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

8. ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองที่เพิ่มขึ้น

คำนวณ

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

ฉ. ของแข็งทั้งหมด (Total Solids)

อุปกรณ์

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

วิธีวิเคราะห์

1. นำจานระเหยไปอบให้แห้งและมีน้ำหนักคงที่ในตู้อบอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์แล้วชั่งหาน้ำหนักของจานระเหย

2. เลือกใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำที่เหมาะสม (50.0-100.0 มิลลิลิตร)

3. ค่อยๆ รินตัวอย่างน้ำที่ต้องการลงในจานระเหย นำไปอังบนเครื่องอังไอน้ำเมื่อน้ำระเหยหมด นำจานไปอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์

4. ชั่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือน้ำหนักของแข็งทั้งหมด

คำนวณ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการตรวจสอบกรดซิตริก

วิธีการวิเคราะห์

1. การละลายเกลือแคลเซียมในน้ำหมัก (Nakanishi และ คณะ,1972)

เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลาร์ ลงในน้ำหมักจนเกลือแคลเซียมละลายหมด ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.0 ปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้วและมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0

2. การวัดการเจริญของเชื้อยีสต์ โดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตต์สารละลายที่ได้จากข้อ 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ ล้างเซลล์ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว 20.0 มิลลิลิตร นำเซลล์ที่ได้บนกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้ หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองเอาเซลล์ออกแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดซิตริกและน้ำตาลที่เหลือต่อไป

3. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโปรโมอะซีโตน (Stern, 1957)

3.1. การเปลี่ยนกรดมะนาวเป็นเพนตาโบรโมอะซีโตน

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ได้จากการกรองในข้อ 2 และผ่านการทำการเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาเกลียว เติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโปแทสเซียมโบรไมด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ลงไป 5 หยด เติมสารละลาย โปแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไป 10 หยดทันที เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3.2 การสกัดเพนตาโบรโมอะซีโตนด้วยเฮปเทน

นำหลอดทดลองที่ได้จากข้อ 2 แช่ในอ่างน้ำแข็ง หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในหลอดทดลองปิดฝาให้สนิท สกัดโดยให้เครื่องผสมนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การสกัดด้วยไทโอยูเรีย

ปิเปตต์ส่วนบน (ชั้นเฮปเทน) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาเกลียวชุดใหม่ ที่มีสารละลายไทโอยูเรีย ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท สกัดด้วยเครื่องผสมนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดเอาชั้นล่าง (ชั้นไทโอยูเรีย) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ใช้สารละลายไทโอยูเรียเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณกรดมะนาวได้จาก กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0-40 มิลลิกรัมต่อลิตร หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (Yeast Malt Extract Medium)

อาหารเหลว

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	3.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม

ใส่อาหารในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตรต่อขวดนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารแข็ง

อาหารแข็งลาดเอียง (YM-slant) เตรียมได้โดยเติมวุ้นผง 15.0 กรัม ลงในสูตรอาหารเหลวในข้อ 1.1 ปิเปตต์ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 6.0 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดซิตริก

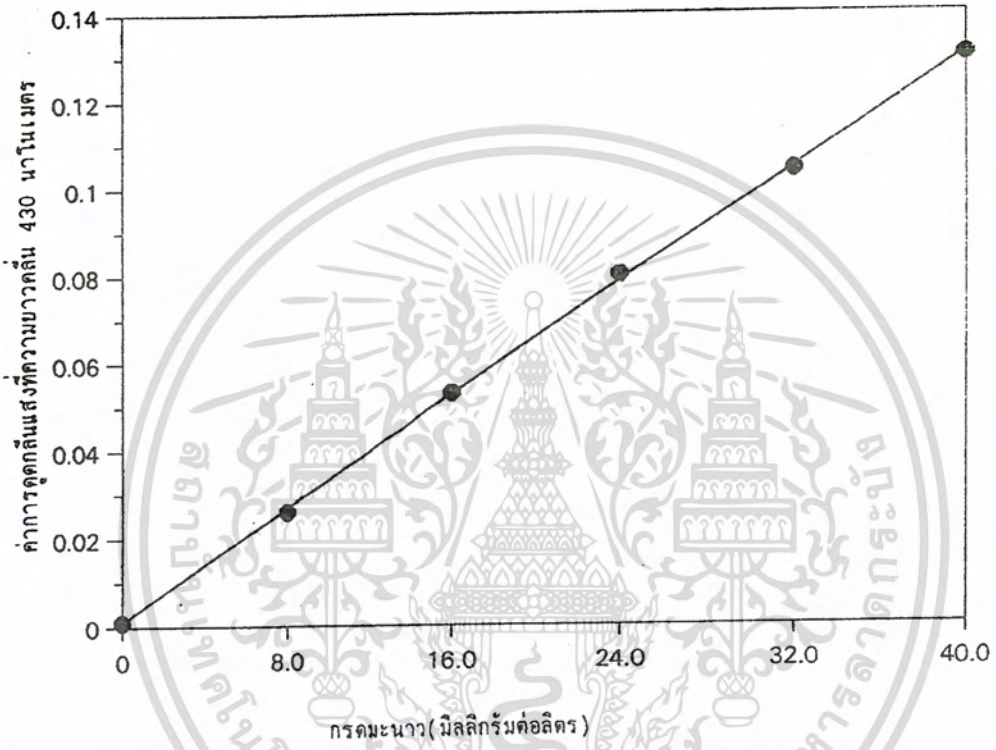
ใช้น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เป็นอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดซิตริกและเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยที่ต้องการศึกษา โดยเลี้ยงเชื้อในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของกรดซิตริกโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซิโตน

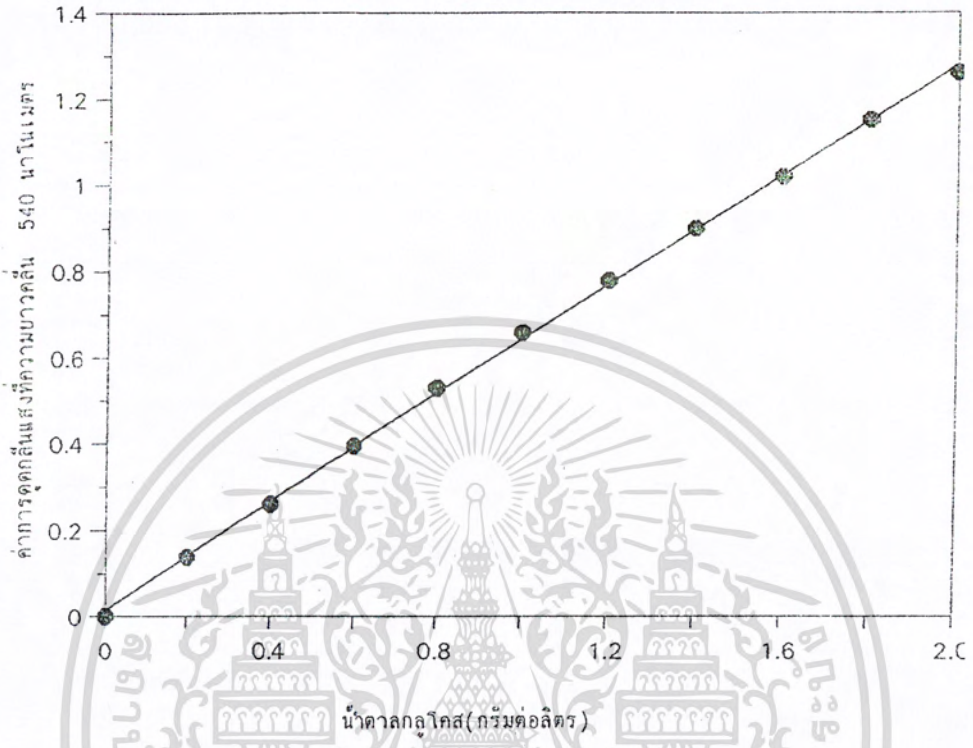


<u>การคำนวณ</u>

กรดมะนาว = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 นาโนเมตร x $\frac{1}{\text{ความชัน}}$ x ความเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์



การคำนวณ

น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร x $\frac{1}{\text{ความชัน}}$ x ความเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 1 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21f
วันที่ 1	2.41e
วันที่ 2	5.27d
วันที่ 3	7.35c
วันที่ 4	10.62b
วันที่ 5	12.03a
วันที่ 6	12.04a
วันที่ 7	12.04a
วันที่ 8	12.04a
วันที่ 9	12.04a
วันที่ 10	12.04a
วันที่ 11	12.04a
วันที่ 12	12.04a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Candida lipolytica* TISTR 5655 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	0.61m
วันที่ 1	1.81l
วันที่ 2	3.01k
วันที่ 3	4.21j
วันที่ 4	6.02i
วันที่ 5	7.22h
วันที่ 6	9.02g
วันที่ 7	9.04f
วันที่ 8	9.13e
วันที่ 9	10.26d
วันที่ 10	10.28c
วันที่ 11	11.13b
วันที่ 12	12.04a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21f
วันที่ 1	3.61e
วันที่ 2	6.62d
วันที่ 3	8.21c
วันที่ 4	10.11b
วันที่ 5	11.22a
วันที่ 6	11.22a
วันที่ 7	11.22a
วันที่ 8	11.22a
วันที่ 9	11.22a
วันที่ 10	11.23a
วันที่ 11	11.23a
วันที่ 12	11.23a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* TISTR 5687 *Candida lipolytica* TISTR 5655 และ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้	ระยะเวลาในการหมัก (วัน)												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C.oleophila	1.21v	2.41t	5.27p	7.35l	10.62d	12.04a	12.04a	12.04a	12.04a	12.04a	12.03a	12.04a	12.04a
C.lipolytica	0.16w	1.81u	3.01s	4.21q	6.02o	7.22m	9.02j	9.04i	9.13h	10.26f	10.28e	11.13c	12.04a
C.tropicalis	1.21v	3.61r	6.12n	8.21k	10.11g	11.22b	11.22b	11.22b	11.22b	11.22b	11.23b	11.23b	11.23b

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 5 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687 ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 28 องเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21c
วันที่ 2	6.62b
วันที่ 4	13.22a
วันที่ 6	13.22a
วันที่ 8	13.22a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 6 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ50 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21d
วันที่ 2	7.82c
วันที่ 4	12.11b
วันที่ 6	13.22a
วันที่ 8	13.22a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 7 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ75 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21c
วันที่ 2	1.81d
วันที่ 4	7.20c
วันที่ 6	10.22b
วันที่ 8	12.02a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 8 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 100 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21e
วันที่ 2	2.46d
วันที่ 4	6.02c
วันที่ 6	9.33b
วันที่ 8	12.01a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 9 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (ร้อยละ)	ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)				
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8
25	1.21l	6.62h	13.22a	13.22a	13.22a
50	1.21l	7.82f	12.12b	13.22a	13.22a
75	1.21l	1.81k	7.20g	10.22d	10.22d
100	1.21l	2.46j	6.02i	9.32e	12.02c

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 10 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21c
วันที่ 2	8.42b
วันที่ 4	10.22a
วันที่ 6	10.22a
วันที่ 8	10.22a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 11 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21c
วันที่ 2	7.21b
วันที่ 4	10.22a
วันที่ 6	10.22a
วันที่ 8	10.22a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 12 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.7 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21c
วันที่ 2	7.22b
วันที่ 4	8.41a
วันที่ 6	8.41a
วันที่ 8	8.42a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 13 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีเปปโตนความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของเปปโตน (ร้อยละ)	ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)				
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8
0.3	1.21d	8.42b	10.22a	10.22a	10.22a
0.5	1.21d	7.21c	10.22a	10.22a	10.22a
0.7	1.21d	7.22c	8.41b	8.41b	8.42b

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 14 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ใน น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21c
วันที่ 2	10.22b
วันที่ 4	13.82a
วันที่ 6	13.82a
วันที่ 8	13.82a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 15 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ใน น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21c
วันที่ 2	9.62b
วันที่ 4	11.42a
วันที่ 6	11.42a
วันที่ 8	11.42a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 16 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ใน น้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21c
วันที่ 2	8.42b
วันที่ 4	9.62a
วันที่ 6	9.62a
วันที่ 8	9.62a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 17 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำ สกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์(ร้อยละ)	ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)				
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8
0.1	1.21f	10.22c	13.82a	13.82a	13.82a
0.3	1.21f	9.62d	11.42b	11.42b	11.42b
0.5	1.21f	8.42e	9.62d	9.62d	9.62d

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 18 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21c
วันที่ 2	6.62b
วันที่ 4	9.62a
วันที่ 6	9.62a
วันที่ 8	9.62a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 19 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21d
วันที่ 2	8.42c
วันที่ 4	10.82b
วันที่ 6	10.82b
วันที่ 8	11.42a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 20 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21c
วันที่ 2	6.62b
วันที่ 4	8.42a
วันที่ 6	8.42a
วันที่ 8	8.42a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 21 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต (ร้อยละ)	ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)				
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8
0.1	1.21f	6.62e	6.62c	6.62c	6.62c
0.2	1.21f	8.42d	10.82b	10.82b	11.42a
0.3	1.21f	6.62e	8.42d	8.42d	8.42d

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 22 ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากการเลี้ยง *Candida oleophila* TISTR 5687ในน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 และสารสกัดจากยีสต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้
วันที่ 0	1.21c
วันที่ 2	10.22b
วันที่ 4	14.41a
วันที่ 6	14.41a
วันที่ 8	14.41a

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้