รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

กระบวนการหมักเปลือกกล้วยซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการแปรรูปอาหารเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger*

Fermentation of banana peel by-product from food processing for citric acid production by *Aspergillus niger*

นางสาว ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ

ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย

จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) กระบวนหมักเปลือกกล้วยซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการแปรรูปอาหารเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger*

แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2561 **จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน** 420,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2560 ถึง 30 กันยายน 2562 (ขยายเวลา 12 เดือน)

หัวหน้าโครงการ นางสาวธีรินทร์ ฉายศิริโชติ

ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก โดยทำการหมักบนอาหารแข็งด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยใช้เปลือกกล้วยเหลือใช้จากอุตสาหกรรมอาหาร เป็นซับสเตรทในถังหมักแบบแพคเบด ซึ่งการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ 1) การศึกษาค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมของเปลือกกล้วยสำหรับการผลิตกรดซิตริก โดยทำการหมักแบบอาหารแข็งในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร (ไม่มีการเติมอากาศ; ค่าพีเอช 3 4 5 และ 6) และ 2) การศึกษาผลของอัตราการเติมอากาศต่อการผลิตกรดซิตริกด้วยการหมักแบบอาหารแข็งในโหลแก้วปริมาตร 1 ลิตร โดยทำการศึกษาอัตราการเติมอากาศที่ 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 vvm การหมักเริ่มจากการเพาะเชื้อรา *A.niger* $1x10^5$ สปอร์ต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ลงบนเปลือกกล้วยที่มีความชื้นร้อยละ 60 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าที่ค่า pH เริ่มต้นของเปลือกกล้วยเท่ากับ 5 ได้รับอัตราการผลิตกรดซิตริกสูงที่สุด คือ 0.99±0.27 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้งต่อวัน และพบว่าการเติมอากาศมีผลต่อการเพิ่มอัตราการผลิตของกรดซิตริก โดยที่ 1.0 vvm เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดซิตริก (3.66±0.59 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้งต่อวัน) จากผลการทดลองการหาค่า pH เริ่มต้นและอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมนี้ เมื่อนำไปดำเนินการหมักเปลือกกล้วยในถังหมักแบบแพคเบดปริมาตร 10 ลิตร (Ø 45 เซนติเมตร, H 50 เซนติเมตร; ปริมาตรสุทธิ 20 ลิตร) พบว่าถังหมักที่มีการควบคุมอุณหภูมิมีอัตราการผลิตของกรดซิตริกสูงที่สุดในวันที่ 2 คือ 5.79±0.19 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้งต่อวัน

คำสำคัญ: *Aspergillus niger*, ถังหมักแบบแพคเบด, การหมักแบบอาหารแข็ง, อัตราการเติมอากาศ, กรดซิตริก, เปลือกกล้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Fermentation of banana peel by-product from food processing for citric acid production by *Aspergillus niger*
Researcher: Miss Teerin Chysirichote
Faculty: Engineering **Department:** Food Engineering

ABSTRACT

This research aims to investigate the appropriate conditions of citric acid (CA) production by solid-state fermentation (SSF) of *Aspergillus niger* on banana peel (BP) which was residue from food industry in a packed-bed bioreactor. The experiment consisted of 1) studying the optimum initial pH of BP for the CA production by conducting the SSF in 250 mL flask and 2) studying the effect of aeration rate on the CA production by performing the SSF in the 1 L glass column aerated at 0.1, 0.5 and 1.0 vvm. The SSF was carried out by inoculating spores of *A.niger* $1x10^5$ spores/$g_{dry\ substrate}$ on the sterilized BP (60% moisture content) and incubating at 30 °C. It was found that pH 5 was the optimum initial pH of a BP for CA production which obtained a highest production rate at 0.99±0.27 mg/$g_{dry\ substrate}$/d. The aeration increased the production rate of CA and the aeration at 1.0 vvm was found to be appropriated for the CA production (3.66±0.59 mg/$g_{dry\ substrate}$/d). The obtained optimum initial pH and aeration rate were applied for the SSF in the 10 L packed-bed bioreactor (Ø 45 cm, height 50 cm; bed volume 20 L). It was found that jacketed packed-bed bioreactor which obtained a highest production rate at 5.79±0.19 mg/$g_{dry\ substrate}$/d.

Keyword: *Aspergillus niger*, packed-bed bioreactor, solid-state fermentation, aeration rate, citric acid, banana peel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุลวงไปด้วยดี โดยได้รับการสนับสนุนการวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนงบประมาณเงินแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบคุณคณาจารย์ ประจำภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ทุกท่านสำหรับการให้คำแนะนำและแนวคิดต่างๆ ในการทำโครงงานนี้เพื่อให้โครงงานมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบคุณ ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการบริการด้านเครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย และวิเคราะห์ต่างๆ

สุดท้ายนี้ คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากปริญญานิพนธ์เล่มนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ
หัวหน้าโครงการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	vi
สารบัญรูปภาพ	vii
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงาน	1
1.2 จุดประสงค์โครงงาน	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 กรดซิตริก	3
2.2 เปลือกกล้วยหอม	5
2.3 เชื้อรา	5
2.4 การหมัก	7
2.5 ถังหมัก	8
2.6 การผลิตกรดซิตริกจากการหมักแบบอาหารแข็ง	13
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการ	
3.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ	15
3.1.1 วัสดุ	15
3.1.2 อุปกรณ์	15
3.1.3 เครื่องมือ	16
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย	17
3.2.1 วิธีการเตรียมเชื้อราและอาหาร	17
3.2.2 การเตรียมซับสเตรทสำหรับการหมัก	17
3.2.3 การศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของเปลือกกล้วย ต่อการผลิตกรดซิตริก	17
3.2.4 การศึกษาผลของอัตราการเติมอากาศต่อการผลิตกรดซิตริก	17
3.2.5 การศึกษาการผลิตกรดซิตริกในถังหมักแบบแพคเบด	18
3.2.6 การทดลองการหมักเปลือกกล้วยหอมในถังหมักแบบแพคเบด	20
3.3 การวิเคราะห์ผล	20
3.3.1 การวัดปริมาณกรดซิตริก	20
3.3.2 การวัดความชื้น	20
3.3.3 การคิดปริมาณลมที่นำไปลดความร้อนภายในถัง	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์การทดลอง
4.1 ผลของค่า pH เริ่มต้นของเปลือกกล้วยต่อการผลิตกรดซิตริกของ *A.niger* 22
4.2 ผลของอัตราการเติมอากาศต่อการผลิตกรดซิตริกของ *A.niger* 25
4.2.1 การผลิตกรดซิตริก 25
4.2.2 ปริมาณความชื้น 26
4.2.3 ปริมาณออกซิเจนที่เหลือ 27
4.3 ผลของการหมักกรดซิตริกของ *A.niger* ในถังหมักแบบแพคเบดที่มีแจ็กเก็ตลม เพื่อลดความร้อนสะสม 27
4.3.1 การผลิตกรดซิตริก 27
4.3.2 อุณหภูมิภายในถังหมัก 28
4.3.3 ปริมาณความชื้น 29
4.3.4 ปริมาณออกซิเจนที่เหลือ 30
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ
5.1 สรุปผลการทดลอง 31
5.2 ข้อเสนอแนะ 31
บทที่ 6 สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย 32
เอกสารอ้างอิง 33
ภาคผนวก 35
ภาคผนวก ก เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต จากบทที่ 6 36
ภาคผนวก ข สรุปการใช้จ่ายเงิน 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ส่วนประกอบทางเคมีของเปลือกกล้วย	5
2.2	ส่วนประกอบทางเคมีของเปลือกกล้วย	5
4.1	การเลือกใช้สภาวะความเป็นกรดที่เหมาะสมโดยพิจารณาอัตราการผลิตกรดซิตริก	22
4.2	ลักษณะของเชื้อรา *A.niger* ที่เจริญบนเปลือกกล้วยที่ค่า pH เริ่มต้นต่างกัน	23
4.3	การเลือกใช้สภาวะการเติมอากาศที่เหมาะสมโดยพิจารณาอัตราการผลิตกรดซิตริก	26
4.4	ลักษณะของเชื้อรา *A.niger* ที่เจริญบนเปลือกกล้วยที่อัตราการเติมอากาศต่างกัน	26
4.5	อัตราการผลิตกรดซิตริกที่ค่า pH 5 และ 1.0 vvm ในถังหมักแบบแพคเบด	28
4.6	ลักษณะของเชื้อรา *A.niger* ที่เจริญบนเปลือกกล้วยในถังหมักแบบแพคเบด	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1.1	ปริมาณการผลิตของกล้วยในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2504 – 2558	1
2.1	สูตรโครงสร้างของกรดซิตริก	3
2.2	การสังเคราะห์กรดซิตริกจากน้ำตาลกลูโคสด้วยเชื้อรา	4
2.3	ตัวอย่างเชื้อรา *Aspergillus* ชนิดต่าง ๆ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA	6
2.4	ลักษณะเชื้อรา *Aspergillus niger*	7
2.5	ถังหมักแบบถาด	9
2.6	ถังหมักแบบหมุน	10
2.7	ถังหมักแบบแพคเบด	11
2.8	ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด	12
2.9	ถังหมักแบบกวน	13
3.1	ชุดถังหมักแบบแพคเบด	18
3.2	ขนาดของถังหมักแบบแพคเบดแบบมีแจ็กเก็ตของงานวิจัยนี้	19
4.1	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ของ *A.niger* จากการหมักเปลือกกล้วย ที่ค่า pH เริ่มต้น เท่ากับ 3 4 5 และ 6	22
4.2	ปริมาณความชื้นฐานเปียกจากการหมักเปลือกกล้วย ที่ค่า pH เริ่มต้น เท่ากับ 3 4 5 และ 6	24
4.3	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ของ *A. niger* จากการหมักเปลือกกล้วย ที่อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 vvm	25
4.4	ปริมาณความชื้นฐานเปียกจากการหมักเปลือกกล้วย ที่อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 vvm	26
4.5	ปริมาณออกซิเจนที่เหลือในโหลแก้ว ที่อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 vvm	27
4.6	ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ของ *A.niger* จากการหมักเปลือกกล้วย ที่ pH 5 และ 1.0 vvm ในถังหมักแบบแพคเบดที่มีแจ็กเก็ตและไม่มีแจ็กเก็ต	28
4.7	อุณหภูมิ ณ ตำแหน่งต่าง ๆ ภายในถังหมักแบบแพคเบดที่มีแจ็กเก็ตและไม่มีแจ็กเก็ต	29
4.8	ปริมาณความชื้นฐานเปียกจากการหมักเปลือกกล้วยที่ pH 5 และ 1.0 vvm ในถังหมักแบบแพคเบดที่มีแจ็กเก็ตและไม่มีแจ็กเก็ต	29
4.9	ปริมาณออกซิเจนที่เหลือจากการหมักเปลือกกล้วยที่ pH 5 และ 1.0 vvm ในถังหมักแบบแพคเบดที่มีแจ็กเก็ตและไม่มีแจ็กเก็ต	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

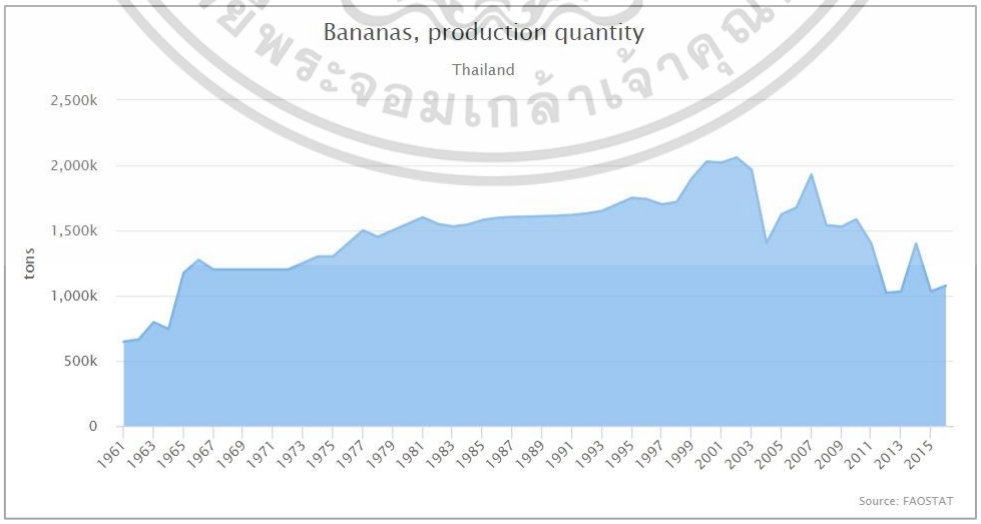
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงาน

กรดซิตริกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีความเป็นกรดอ่อนมีบทบาทสำคัญในชีวิตประจำวัน ประเทศที่มีการผลิตสูงที่สุดคือประเทศจีน รองลงมาอยู่ในแถบยุโรปและอเมริกา กรดซิตริกส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในการบริโภคในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อาหารแปรรูป การซักฟอก (ทำความสะอาด) และเครื่องสำอางค์ กรดซิตริกพบได้ตามธรรมชาติทั่วไปในผักและผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะนาว สับปะรด และส้ม การผลิตกรดซิตริกโดยการใช้มะนาวมาคั้นเพื่อเอาน้ำจะมีองค์ประกอบของกรดซิตริกประมาณร้อยละ 7-9 ในปัจจุบันการผลิตกรดซิตริกสามารถผลิตได้จากน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีไกลโคไลซิส โดยใช้จุลินทรีย์ประเภทเชื้อรา เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตต่ำและมีการผลิตทั่วโลกประมาณ 1.7 ล้านตันต่อปี และยังสามารถนำผลผลิตจาก การเกษตรมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดซิตริกได้อีกด้วย

การค้นหาวัตถุดิบเพื่อที่จะนำมาเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตกรดซิตริก โดยสารตั้งต้นที่มีราคาไม่สูงนับว่ามีความสำคัญในการลดต้นทุนในการผลิตกรดซิตริก จึงมีการมุ่งความสนใจไปยังการเลือกใช้สิ่งที่เหลือทิ้งจากผลผลิตทางการเกษตรสำหรับการนำมาเป็นสารตั้งต้น เนื่องจาก เกิดปัญหาในเรื่องของการจัดการขยะที่มาจากอุตสาหกรรมทางการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของประเทศที่กำลังพัฒนา ในปัจจุบันมีการให้ความสำคัญกับการเพิ่มมูลค่าสิ่งเหล่านี้ หรือนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป (Angumeenal และคณะ, 2005) และในงานวิจัยนี้ ได้ทำการเลือกเปลือกกล้วยหอมมาเป็นสารตั้งต้นหรือซับสเตรทในการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริก ซึ่งกล้วยหอมสามารถปลูกได้เกือบทุกประเทศที่มีภูมิอากาศร้อนชื้นหลายแห่ง สำหรับประเทศไทยสามารถปลูกกล้วยหอมได้ทั่วทุกภาค ทั้งยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญโดยมีการเพาะปลูกภายในประเทศสูงถึง 240,394 ตันต่อปีและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เปลือกของกล้วยยังสามารถนำมาแปรรูปหรือนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อีกหลายอย่าง (พีรศักดิ์ และคณะ, 2544) เช่น การนำมาทำปุ๋ยหมักสำหรับอุตสาหกรรมเกษตร การนำไปเป็น อาหารสัตว์ และการนำมาหมักเพื่อให้ได้กรดซิตริก เป็นต้น



รูปที่ 1.1 ปริมาณการผลิตของกล้วยในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2504 - 2558
ที่มา : Bernhard Slominski (2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการหมักบนอาหารแข็งในถังหมักแบบแพคเบค เป็นกระบวนการการแปรสภาพทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยอาศัยน้ำในรูปของความชื้นที่ดูดซับในซับสเตรท ถังหมักจึงถือว่าเป็นอุปกรณ์หนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากต้องทำหน้าที่รักษาสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ และปริมาณอากาศ ให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิดตลอดระยะเวลาของกระบวนการหมัก ถังหมักแบบแพคเบดมีข้อดี คือ ใช้พลังงานต่ำ เนื่องจากไม่มีการกวน และมีน้ำเสียที่เกิดขึ้นน้อยกว่าการหมักแบบอาหารเหลว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* ในถังหมักแบบแพคเบดที่สามารถลดความร้อนสะสมได้โดยใช้เปลือกกล้วยหอมเป็นซับสเตรท

1.2 จุดประสงค์ของโครงงาน

เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักบนอาหารแข็งเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* ในถังหมักแบบแพคเบดที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ขอบเขตตัวแปรที่ศึกษา เป็นดังนี้

1.3.1.1 ตัวแปรต้น

- ค่า pH เริ่มต้นของเปลือกกล้วยก่อนเริ่มทำการหมัก
- อัตราการเติมอากาศ 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm (vvm คือ ลิตรของอากาศต่อลิตรของวัสดุการหมักต่อนาที)
- ลักษณะของถังหมักแบบแพคเบด (แบบไม่มีแจ็กเก็ตและแบบมีแจ็กเก็ต)

1.3.1.2 ตัวแปรตาม

- ปริมาณกรดซิตริก
- ปริมาณ O_2 ในถังหมัก
- ความชื้นของซับสเตรท
- อุณหภูมิ ณ ใจกลางของซับสเตรท และอุณหภูมิขาออกของถังหมัก

1.3.1.3 ตัวแปรควบคุม

- ชนิดของเชื้อรา คือ *Aspergillus niger*
- ปริมาณเชื้อราเริ่มต้น 1×10^5 สปอร์ต่อกรัมซับสเตรทแห้ง
- ปริมาตรของซับสเตรทแห้ง มี 3 แบบ
  - สำหรับการหมักในขวดรูปชมพู่ 25 กรัม
  - สำหรับการหมักในโหลแก้ว 300 กรัม
  - สำหรับการหมักในถังหมักแบบแพคเบด 2,500 กรัม
- ความชื้นเริ่มต้นของซับสเตรทร้อยละ 60 (ฐานเปียก)
  - อุณหภูมิในการหมัก (30 องศาเซลเซียส)

1.3.2 พัฒนาถังหมักแบบแพคเบด โดยให้สามารถควบคุมอุณหภูมิและลดความร้อนสะสมภายในถังหมักได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

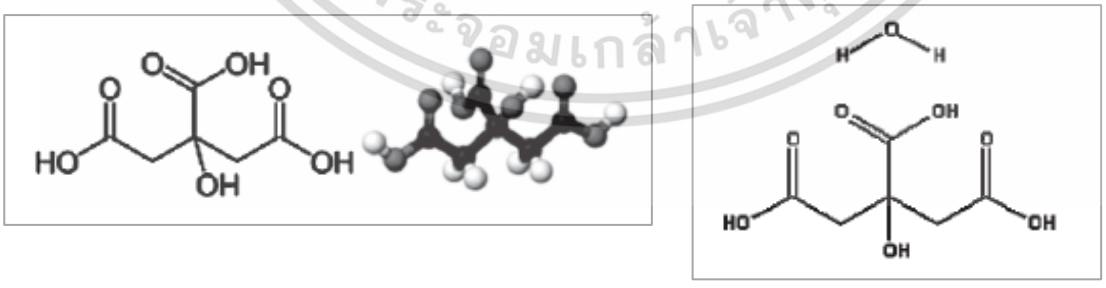
2.1 กรดซิตริก

กรดซิตริก (citric acid) หรือกรดมะนาว เป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปและอาหารกึ่งสำเร็จรูปต่าง ๆ เช่น น้ำผลไม้ ลูกกวาด เจลลี่ น้ำมะนาวเทียมจะใช้กรดซิตริกเป็นสารให้รสเปรี้ยว นอกจากนี้ยังใช้กรดซิตริกเป็นสารลดความฝาด ควบคุมความเป็นกรด-เบส ป้องกันการเน่าเสียของเครื่องดื่มป้องกันการตกผลึกของน้ำผึ้ง และป้องกันน้ำผลไม้ขุ่นได้อีกด้วย (อภิษฐา, 2552)

กรดซิตริกเป็นกรดอ่อนใช้ประโยชน์เพื่อการถนอมอาหารโดยมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มรสชาติให้กับอาหารให้มีรสเปรี้ยว และมีกลิ่นหอมชวนรับประทาน ได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค สามารถเติมลงไปในอาหารโดยไม่เกิดอันตราย และสามารถย่อยสลายได้ง่ายและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ในระยะแรก ๆ การผลิตกรดซิตริกทำโดยคั้นมะนาวโดยตรง เพื่อให้ได้น้ำมะนาวซึ่งจะมีส่วนประกอบของกรดซิตริกประมาณร้อยละ 7-9 แต่ในปัจจุบันมีโรงงานผลิตกรดซิตริกจำนวนน้อยกว่า 100 โรงงานทั่วโลก

2.1.1 คุณสมบัติของกรดซิตริก

กรดซิตริกมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxy-1,2,3-propane tricarboxylic acid สำหรับกรดซิตริกที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในท้องตลาดมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือกรดชนิดแอนไฮดรัส (citric acid anhydrous) หรือชื่อทางเคมี 2-hydroxy-1,2,3-propane tricarboxylic acid, anhydrous มีสูตรโมเลกุล $C_6H_8O_7$ น้ำหนักโมเลกุล 192.124 กรัมต่อโมล จุดหลอมเหลว 153 องศาเซลเซียส และอีกชนิดก็คือกรดซิตริกชนิดโมโนไฮเดรต (citric acid monohydrate; hydrous citric acid) หรือชื่อทางเคมี 2-hydroxy-1,2,3-propane tricarboxylic acid, monohydrate มีสูตรโมเลกุล $C_6H_8O_7{\bullet}H_2O$ น้ำหนักโมเลกุล 210.14 กรัมต่อโมล จุดหลอมเหลว 100 องศาเซลเซียส ลักษณะทางกายภาพทั่วไป มีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่มีกลิ่น มีรสเปรี้ยว สามารถละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์



ก. กรดซิตริกชนิดแอนไฮดรัส (Citric Acid Anhydrous)

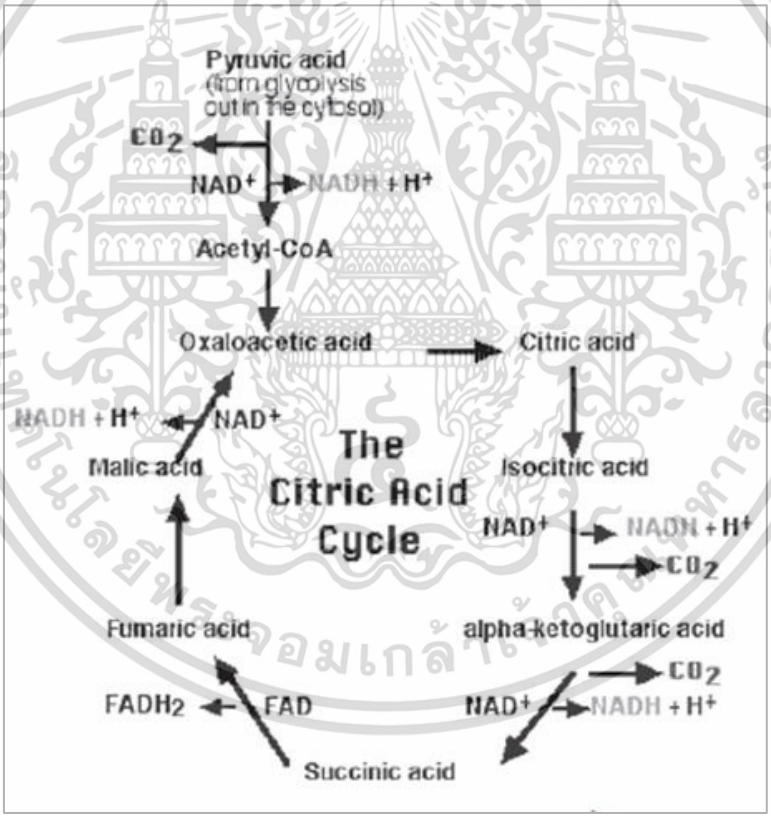
ข. กรดซิตริกชนิดโมโนไฮเดรต (Citric Acid Monohydrate)

รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของกรดซิตริก
ที่มา : อภิษฐา (2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 การผลิตกรดซิตริก

พบทั่วไปในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่นมะนาว ส้ม สับปะรด เป็นต้น การผลิตกรดซิตริกในระยะแรกใช้วิธีการสกัดจากผลไม้ที่มีรสเปรี้ยวโดยตรง เช่น มะนาว ซึ่งมีกรดซิตริกประมาณร้อยละ 7-9 แต่ในปัจจุบันนิยมผลิตด้วยวิธีการหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยจุลินทรีย์ กรรมวิธีการสังเคราะห์กรดซิตริกจากน้ำตาลกลูโคส แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นการย่อยสลายกลูโคสด้วยจุลินทรีย์ผ่านวิธีไกลโคไลซิส (glycolysis) ได้เป็นไพรูเวท (pyruvate) และอะซิติลโคเอนไซม์เอ (acetyl CoA) ขั้นตอนต่อมาเอนไซม์ไพรูเวทคาร์บอกซิเลส (pyruvatecarboxylase) จะเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวกันของไพรูเวทกับคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) ได้เป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการสะสมกรดซิตริก เมื่อได้สารละลายกรดซิตริกแล้วจะนำไป ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านถ่านกัมมันต์และเรซิ่น ระเหยน้ำออกและตกผลึก การตกผลึกถ้าทำที่อุณหภูมิ สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะได้กรดซิตริกชนิดแอนไฮดรัส แต่ถ้าทำที่อุณหภูมิต่ำกว่า 36.5 องศาเซลเซียส จะได้กรดซิตริกผงที่มีน้ำอยู่หนึ่งโมเลกุล จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตกรดซิตริก ในปัจจุบัน คือ เชื้อรา *Aspergillus niger* และในโรงงานบางแห่งใช้ยีสต์ในการหมัก เช่น *Candida lipolytica* แต่ปริมาณการผลิตน้อยกว่าใช้เชื้อรามาก



รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์กรดซิตริกจากน้ำตาลกลูโคสด้วยเชื้อรา
ที่มา : อภิษฐา (2552)

2.2 เปลือกกล้วยหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากประเทศไทยปลูกกล้วยหอมได้ทั่วทุกภาค ทั้งยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมีการเพาะปลูกภายในประเทศสูงถึง 240,394 ตันต่อปี และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ผลสุกนอกจากจะใช้รับประทานเป็นผลไม้แล้ว เปลือกของกล้วยยังสามารถนำมาแปรรูปหรือนำมาใช้ประโยชน์ได้อีกหลายอย่าง (พีรศักดิ์ และคณะ, 2544) เช่น การนำมาทำปุ๋ยหมัก อาหารสัตว์ เป็นต้น

2.2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของเปลือกกล้วย

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของเปลือกกล้วย (Gane และคณะ, 1993)

ส่วนประกอบ (%)	
แป้ง	31.3
โปรตีน	3.2
เซลลูโลส	3.1
เฮมิเซลลูโลส	5.5
เยื่อใย	1.3
เถ้า	3.7
NDF	8.9
ADF	3.8
ลิกนิน (ADL)	1.0

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบทางเคมีของเปลือกกล้วย (ธานุวัฒน์ และคณะ, 2556)

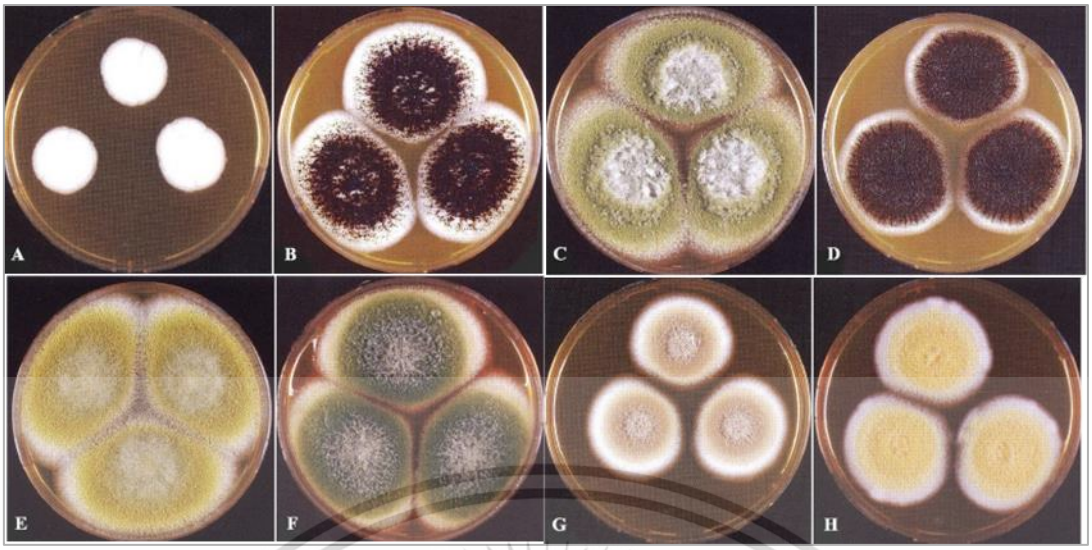
ส่วนประกอบ (%)	
สารอินทรีย์คาร์บอน	41.37
คาร์โบไฮเดรต	23.44
เซลลูโลส	11.11
ไนโตรเจน	1.06

2.3 เชื้อรา

2.3.1 เชื้อรา *Aspergillus*

เชื้อรา *Aspergillus* จัดอยู่ในกลุ่ม Duteromycetes ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อราที่พบเพียงสภาวะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ อย่างไรก็ตามมีบางสายพันธุ์ที่มีรูปแบบ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในบางสภาวะ โดยการสร้างสปอร์ (conidia) ในปัจจุบันสามารถจัดจำแนกได้มากกว่า 250 สปีชีส์ การจัดจำแนกเชื้อราในจีนัส *Aspergillus* ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ลักษณะรูปร่าง) ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์วิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) โดยใช้วิธีอณูชีววิทยา เชื้อรา *Aspergillus* มีความหลากหลายมากโดยมีทั้งสีขาว เช่น *A.candidus* สีเหลือง เช่น *A.ochraceous* สีเขียว เช่น *A.flavus, A.parasiticus, A.oryzae* สีส้ม เช่น *A.terreus* เป็นต้น ภาพแสดงเชื้อราชนิดต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 2.3 โดยเชื้อรา *Aspergillus* แต่ละชนิดมีลักษณะแหล่งที่พบ การสร้างสารพิษ และ การนำไปใช้ที่แตกต่างกันไป (ปารมี, ม.ป.ป.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ตัวอย่างเชื้อรา *Aspergillus* ชนิดต่าง ๆ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ที่สภาวะ 25 °ซ เป็นเวลา 7 วัน A) *A. candidus* B) *A. carbonarius* C) *A. flavus* D) *A. niger* E) *A. oryzae* F) *A. parasiticus* G) *A. terreus* H) *A. westerdijkiae*
ที่มา : ปารมี (ม.ป.ป.)

เชื้อรา *Aspergillus* มีบทบาทสำหรับในการผลิตอาหารพื้นเมืองในประเทศทางด้านตะวันออก ซึ่งได้แก่ประเทศ จีน ญี่ปุ่น ไทย และ อินโดนิเซีย เป็นต้น นอกจากนั้นเชื้อราสกุลนี้มีบทบาทสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์ และ กรดอินทรีย์ เป็นต้น *และยัง*เป็นเชื้อรากลุ่มหลักที่มีความสำคัญในการเป็นผู้ย่อยสลายสารต่าง ๆ ในระบบนิเวศ โดยมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดเพื่อสร้างออกมาย่อยเซลล์ของพืชในธรรมชาติได้ (ชลนิชา และคณะ, ม.ป.ป.)

2.3.1.1 เชื้อรา *Aspergillus* ที่ใช้ประโยชน์ในการผลิตอาหารและเทคโนโลยีชีวภาพ

เชื้อราในจีนัส *Aspergillus* หลายชนิด มีการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร และเทคโนโลยีชีวภาพ ทั้งในแง่การเป็นหัวเชื้อที่ช่วยในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร หลากหลายชนิด รวมทั้งการผลิตกรดอินทรีย์ สารเมตาบอไลท์ หรือเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

Aspergillus oryzae และ *A. sojae* เป็นเชื้อราที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาหลายศตวรรษ โดยใช้ในการผลิตโคจิสำหรับผลิตซอสถั่วเหลือง และเต้าเจี้ยว และมีรายงานว่าเชื้อ *A. glaucus*, *A. melleus*, *A. rape*ns และ *A. candidus* เป็นเชื้อเจ้าถิ่นในการหมักปลาของประเทศญี่ปุ่น นอกจากนั้น ได้รายงานการใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพของเชื้อรา *Aspergillus* ชนิดต่าง ๆ ไว้ดังนี้ (ปารมี, ม.ป.ป.)

A. carbonarius ใช้ในการผลิตกรดซิตริก

A. clavatus ใช้ในการผลิตสาร sarcins

A. niger ใช้ในการผลิตกรดซิตริก กรดกลูโคนิก และกรดออกซาลิก ใช้ในการผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น อะไมเลส ไลเปส เพคติเนส อะไมโลกลูโคซิเดส และอื่น ๆ

A. oryzae ใช้สำหรับการหมักปลาทูน่าในประเทศญี่ปุ่น (katsuobushi) ใช้ในการผลิตซอสถั่วเหลือง ใช้ในการผลิตสาเก เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น อะไมเลส เป็นต้น

2.3.2 เชื้อรา *Aspergillus niger*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรามีโคโลนีสีดำ ตรงกลางสีเข้มที่สุดและจางลงไปเรื่อย ๆ เมื่อห่างจากจุดศูนย์กลางของโคโลนี เพราะบริเวณตรงกลางของโคโลนีมี conidial head ที่มีอายุแก่กว่าและขึ้นอยู่อย่างหนาแน่น ส่วนขอบของโคโลนีจะเห็น conidal head ชัดเจนกว่าและจะเห็นก้าน conidiophore ยาว เส้นใยของเชื้อเจริญอยู่ใต้อาหารอย่างบาง ๆ โคโลนีใต้อาหารไม่มีสีและตั้งแต่จุดศูนย์กลางจนถึงส่วนกลางของโคโลนีจะมีรอยปุ่มลงในอาหารเป็นทางยาว conidial head เมื่อยังอ่อนอยู่มีรูปร่างกลม ไม่มีสี เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีดำ รูปร่างกลม แผ่เป็นรัศมี หรือแตกออกเป็น 3-4 แฉกหรือมากกว่า conidiophore มีสีน้ำตาลอ่อน และจะค่อย ๆ เข้มขึ้น เมื่อถึง vesicle และ conidiophore บริเวณนี้จะเป็นรอยคอดเล็กน้อย ผนังเรียบ ส่วนมากยาวมากกว่า 1 มิลลิเมตร vesicle มีรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม sterigma ขึ้นคลุมทั้ง vesicle มี 2 ชั้น สีน้ำตาลอ่อน conidia รูปร่างกลม มีสีน้ำตาลอ่อน ผนังขรุขระ (โสพิศ, 2540) ดังรูปที่ 2.4

ก. ข. ค. ง.

รูปที่ 2.4 ลักษณะเชื้อรา *Aspergillus niger*
ก. ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Czapek's solusion agar และ
ข. ลักษณะโคโลนีใต้อาหาร Czapek's solusion agar ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส
ค. Conidial head รูปร่างกลม แผ่เป็นรัศมีหรือแตกเป็นแฉกหลายแฉก (400x)
ง. Vesicle รูปร่างกลม มี sterigma สองชั้น (400x)
ที่มา : โสพิศ (2540)

2.4 การหมัก

2.4.1 การหมักแบบอาหารแข็ง (Solid-State Fermentation)

เป็นการหมักจุลินทรีย์ที่เจริญโดยการใช้น้ำและทำการหมักบนซับสเตรท ซึ่งได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากใช้พลังงานต่ำ และมีน้ำเสียที่เกิดขึ้นน้อยกว่าการหมักแบบอาหารเหลว อีกทั้ง ยังสามารถแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมจากขยะประเภทของแข็ง โดยนำมาเป็นซับสเตรทสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์ (Minyuan และคณะ, 1997) ลดต้นทุนในการผลิตและใช้พื้นที่ในการดำเนินการน้อย และ ลดการปล่อยน้ำเสีย การหมักวิธีนี้เหมาะสมกับการหมักจุลินทรีย์ประเภทรา ซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารหมักที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบน้อย การหมักแบบอาหารแข็งได้รับความสนใจเนื่องจากมีข้อดีมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว ถึงแม้วิธีนี้จะมีประสิทธิผลเพียงใดแต่ในแง่ของการผลิตผลิตภัณฑ์ในปัจจุบันยังมีปัญหาในการใช้งานเชิงพาณิชย์ คือ ไม่สามารถออกแบบและสร้างการหมักในถังหมัก ที่มีขนาดใหญ่ได้ ปัญหาในการควบคุมปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อที่สำคัญ เช่น การควบคุมความร้อน ที่เกิดขึ้นภายในถังหมัก (Kalogeris และคณะ, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การหมักบนอาหารเหลว (Submerged fermentation)

การหมักประเภทนี้เชื้อจุลินทรีย์จะเจริญอยู่บนซับสเตรทที่อยู่ในสถานะของเหลวซึ่งส่วนมากจะเป็นกลุ่มที่ต้องการความชื้นสูง ในซับสเตรทจะประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ ของเชื้อรา ซึ่งในถังหมักจะมีด้วยกันอยู่ 2 เฟส คือ ส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่เป็นแก๊ส ในการผลิตนั้นสามารถทำได้อย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับการหมักแบบอาหารแข็งที่สามารถ ทำได้เพียงแบบ Batch ในการผลิตจำเป็นต้องใช้ถังบรรจุขนาดใหญ่ในการหมัก จึงมีน้ำเสียจำนวนมากและใช้พลังงานสูง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จำเป็นต้องผ่านกระบวนการกรองหรือทำแห้งเสียก่อน โดยผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่นั้นมักจะเป็นจำพวกแอลกอฮอล์หรือกรด (Kunamneni และคณะ, 2005)

2.4.3 การเปรียบเทียบระหว่างการหมักแบบอาหารแข็งและการหมักแบบอาหารเหลว

- การหมักแบบอาหารแข็งเหมาะกับเชื้อราที่มีโครงสร้างแบบเส้นใย เช่น *A. niger* เพราะกระบวนการหมักมีความคล้ายกับธรรมชาติของเชื้อรามากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว
- กระบวนการหมักจะใช้สิ่งที่เหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นอาหารแข็งซึ่งจะมาเป็นซับสเตรททำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานเพราะมีคาร์บอนอยู่ในปริมาณมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว
- การหมักแบบอาหารแข็งเป็นการหมักที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าอาหารเหลว โดยมีข้อดี คือ ไม่สร้างมลภาวะให้กับสิ่งแวดล้อม และลดการสะสมของของเหลือทางการเกษตร (Brahmachari และคณะ, 2017)

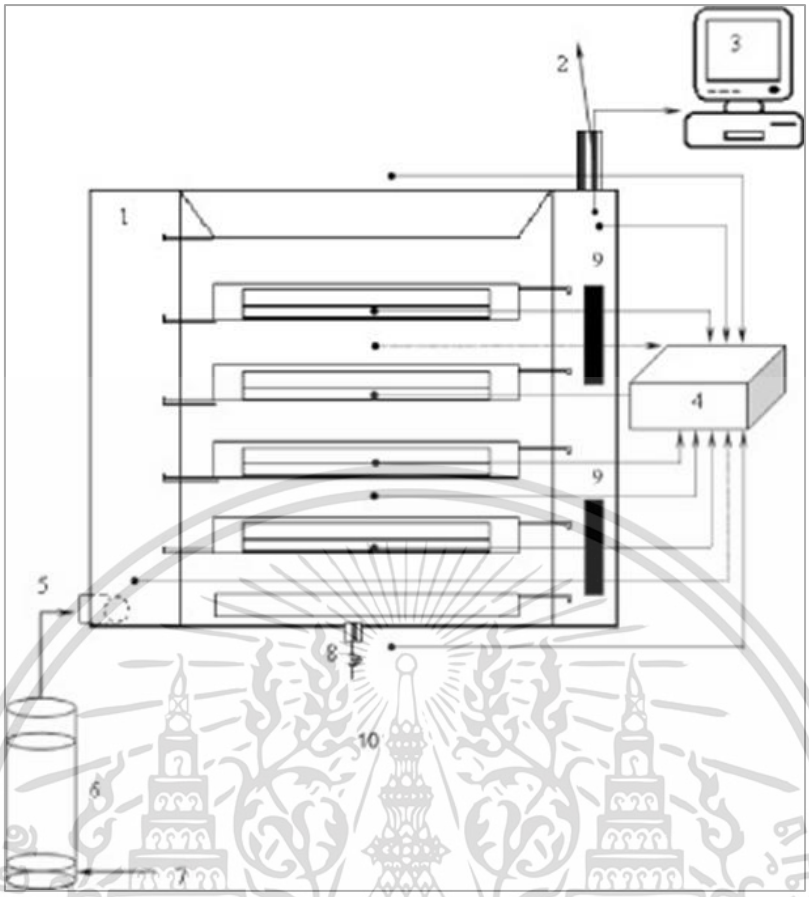
2.5 ถังหมัก

ถังหมักเป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับรองรับการเกิดปฏิกิริยาเคมีภายใน ซึ่งสามารถจำลองสภาพแวดล้อมทางกายภาพที่เหมาะสมให้กับชีวเคมีที่สามารถใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนเพื่อการเจริญทางชีวภาพ ไม่ว่าจะเป็นอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณความชื้น การละลายของออกซิเจน อัตราการเติมอากาศ เป็นต้น ลักษณะโดยทั่วไปจะเป็นทรงกระบอก มีหลากหลายขนาดขึ้นอยู่กับระดับของการผลิต วัสดุที่นำมาทำเป็นถังหมักนั้นควรเป็นวัสดุที่ทนทานต่อการกัดกร่อน มีความแข็งแรง สามารถทนต่ออุณหภูมิฆ่าเชื้อได้ สามารถทำความสะอาดได้ง่าย และต้องไม่เกิดสนิม (Nagel และคณะ, 1992)

2.5.1 ถังหมักแบบถาด (Tray Fermentor)

ถังหมักแบบถาดเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในห้องปฏิบัติการและในอุตสาหกรรม ถังหมักแบบถาดประกอบด้วย ถาดสำหรับใส่ซับสเตรทมีความหนาประมาณ 1.5 หรือ 2 เซนติเมตร (Arturo และคณะ, 2011) ซึ่งส่วนมากจะทำจากวัสดุที่ไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อและไม่เกิดปฏิกิริยาเคมีกับซับสเตรท ถาดจะถูกบ่มโดยมีการควบคุมอุณหภูมิกับการเติมอากาศแบบแพสซีฟ การใช้ถังหมักแบบถาดในอุตสาหกรรมมีข้อดี คือ ในการหมักไม่จำเป็นต้องผสมกันระหว่างหมักทำให้มีการใช้พลังงานน้อยและใช้งานสะดวก เนื่องจากพึ่งพาเทคโนโลยี แต่มีข้อเสียคือ มีอัตราการใช้พื้นที่ต่ออาหารสูง เนื่องจากแต่ละถาดบรรจุได้สูงสุด 5 เซนติเมตร หากทำการเพิ่มอาหารลงไปมากขึ้นจะก่อให้เกิดปัญหาที่ตามมา คือ ความร้อนสะสมที่มากขึ้น ซึ่งยากต่อการถ่ายเทความร้อน (Byndoor และคณะ, ม.ม.ป.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



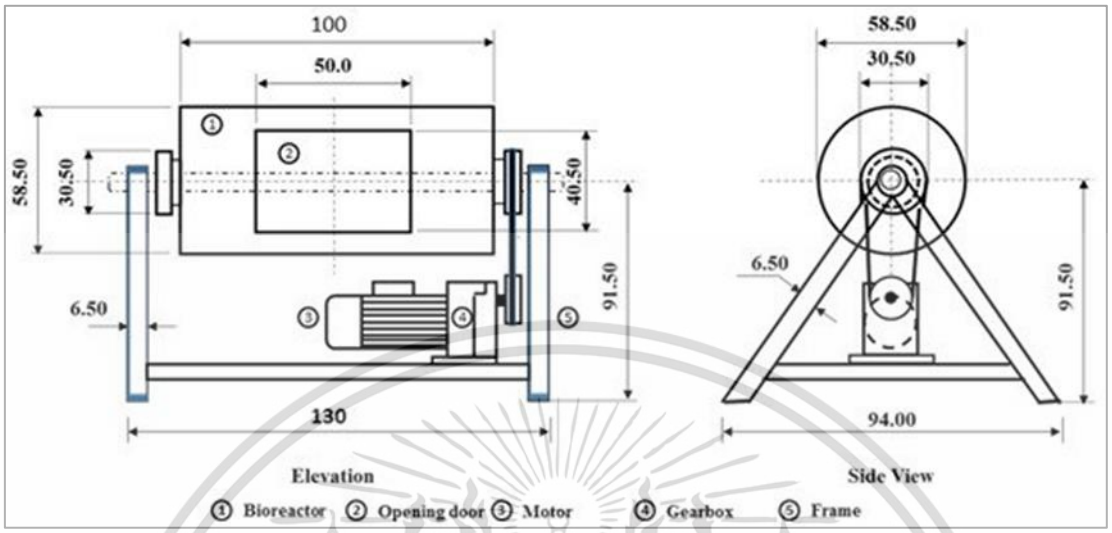
รูปที่ 2.5 ถังหมักแบบถาด
1: bioreactor, 2: air exit, 3: determination and registering of CO_2,
4: determination and registering of temperature (digital thermometer),
5: saturated air entry, 6: column for saturation of air, 7: dry air inlet, 8: purge, 9: fans
ที่มา : Arturo และคณะ (2011)

2.5.2 ถังหมักแบบหมุน (Rotating Drum Fermentor)

ถังหมักแบบหมุน ประเภทนี้ลักษณะโดยทั่วไปจะออกแบบให้ถังหมักอยู่ในแนวนอนเป็นรูปทรงกระบอก หมุนรอบแกนกลางของถัง จะทำให้มีระบบปลอดเชื้อ เกิดการผสมกันอย่างทั่วถึงของซับสเตรทและสามารถทำงานได้อย่างอัตโนมัติ (Han, 1975) และในถังอาจมีแผ่นกั้น (Baffle) เพื่อทำให้แยกซับสเตรทกับผิวถังนั้นแยกออกจากกัน (สราวุฒิ และคณะ, 2547) ถังหมักแบบหมุน จะมีการเคลื่อนที่อย่างช้า เพื่อให้ซับสเตรทเกิดการคลุกเคล้ากันอย่างทั่วถึงและลดความเสียหายของไมซีเลียมเชื้อรา (Brahmachari, 2017) ซึ่งความเร็วรอบของการหมุนนั้นนิยมใช้กัน คือ 1-15 รอบต่อนาที ควรมีซับสเตรทประมาณร้อยละ 10-40 ของปริมาตรถังหมัก โดยควรประกอบด้วยซับสเตรทที่มีขนาดอนุภาคเล็กจำนวนมาก ความชื้นในถังหมักขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการหมัก ถังหมักแบบหมุนมีลักษณะสำคัญ 2 อย่าง คือ การบรรจุซับสเตรทจะบรรจุในแนวนอน เมื่อมีการหมุนจะทำให้เกิดการผสมกัน ที่ด้านบนจะมีการเป่าลมเพื่อให้เกิดการถ่ายเทความร้อนกันระหว่างอากาศกับซับสเตรท การปรับปรุงโดยการติดบัฟเฟิลด้านในถังบริเวณผนังของถัง เพื่อการผสมที่ดีขึ้น โดยถังหมักแบบหมุนมีข้อดี คือ มีการถ่ายเทออกซิเจนดี ผสมได้ดี ข้อเสีย คือ เพิ่มขนาดสเกลได้ยากและซับส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรทมีโอกาสเกิดการรวมกลุ่ม (substrate agglomeration) ขณะกระบวนการหมัก (Krishna, 2005; Matthew และคณะ, 2000)

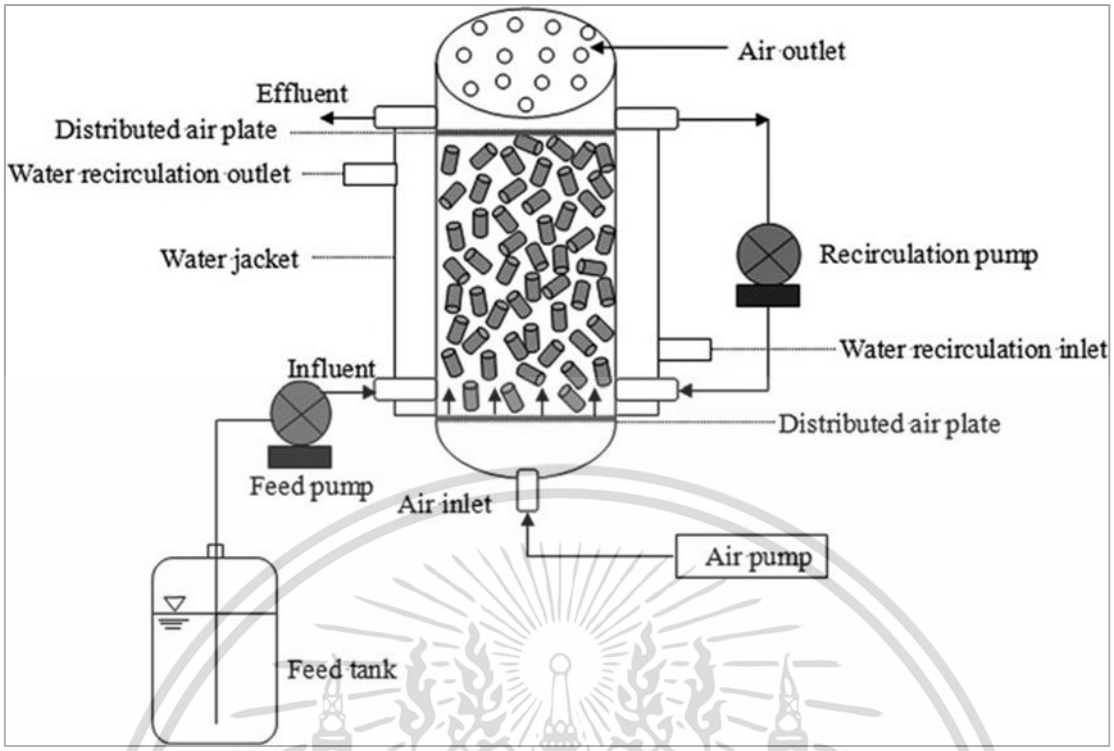


รูปที่ 2.6 ถังหมักแบบหมุน
ที่มา : Abdel-Razzak (2018)

2.5.3 ถังหมักแบบแพคเบด (Packed-Bed Fermentor)

ถังหมักแบบแพคเบด จะมีลักษณะที่เป็นทรงกระบอก ขนาดของถังจะขึ้นอยู่กับระดับในการใช้งาน ถ้าถังในระดับห้องปฏิบัติการจะทำจากแก้วหรือพลาสติก และในระดับอุตสาหกรรมจะทำด้วยสแตนเลส เพื่อความทนทาน ประสิทธิภาพในการทำความสะอาดได้ และทนการกัดกร่อน (Lonsane และคณะ, 1985; Annunziato และคณะ, 1986; Pandey, 1996; Minyuan และคณะ, 1996) ภายในจะมีการเจาะรูเพื่อให้อากาศผ่านทางด้านข้างหรือด้านล่างของถังจะมีท่อ เพื่อให้อากาศชื้นเข้าไปในถังหมักเพื่อรักษาความชื้นสัมพัทธ์และควบคุมอุณหภูมิ เมื่อทำการหมักไประยะหนึ่งจะเกิดความร้อนสะสม จึงต้องมีการลดความร้อน ซึ่งมีวิธีดังนี้ คือการใช้หลักของการนำความร้อน เช่น การใช้น้ำหล่อเย็นเป็นตัวกลางไหลผ่านแจ็กเก็ตหรือผ่านท่อขด และการใช้การพาความร้อน เช่น การใช้พัดลมเพื่อพัดอากาศ แพคเบดแต่ละชั้นไม่ควรสูงมาก เพื่อป้องกันการเกิดอุณหภูมิสูงที่บริเวณท่ออากาศขาออก เนื่องจากอุณหภูมิอากาศขาเข้าจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อไหลผ่านท่อโดยการไหลของอากาศภายในถังหมักแบบแพคเบดจะไหลไปทางเดียวตลอดระหว่างการหมักความดันตกคร่อม (ΔP) จะเพิ่มมากขึ้นเป็นผลมาจากช่องว่างระหว่างอนุภาคของซับสเตรทลดลงซึ่งเกิดจากการเจริญของจุลินทรีย์ และความดันตกคร่อมระหว่างชั้นสามารถ ทำให้ลดลงได้โดยนำชั้นออกจากถังหมักทำให้มีช่องว่างเพื่อให้อากาศผ่านมากขึ้น ถังหมักแบบแพคเบดมีข้อดี คือ ควบคุมระบบได้ง่ายและราคาถูก แต่มีข้อเสีย คือ มีการสะสมความร้อนภายในชั้น (สราวุฒิ และคณะ, 2547; David และคณะ, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

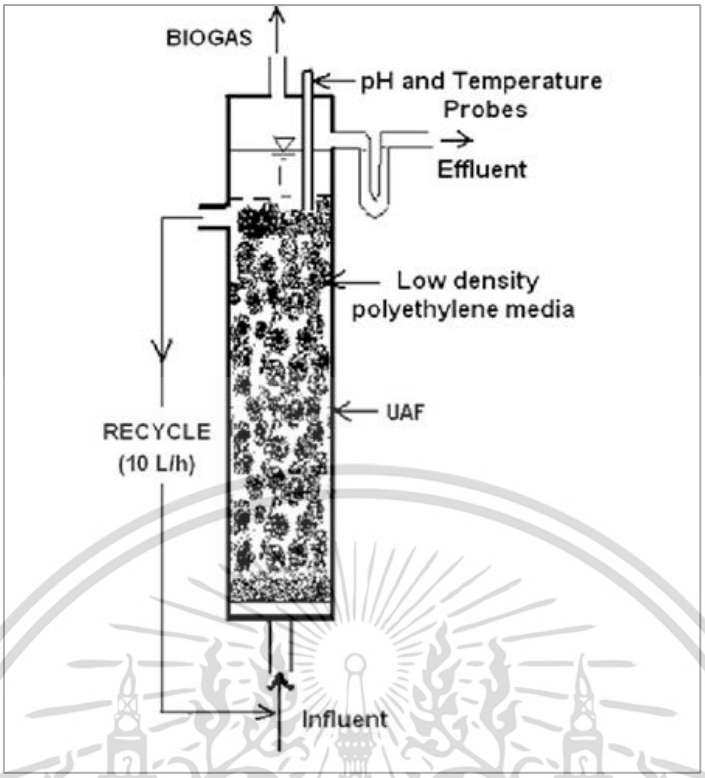


รูปที่ 2.7 ถังหมักแบบแพคเบด
ที่มา : Yen-Hui และคณะ (2015)

2.5.4 ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด (Fluidized-bed Fermentor)

ถังหมักแบบฟลูอิไดซ์เบดโดยส่วนใหญ่จะใช้กันในทั้งชีวเคมีและปิโตรเคมีเป็นถังหมักที่อาศัยการทำปฏิกิริยาทางเคมีของสารภายใน ซึ่งหลัก ๆ จะมีอยู่ด้วยกัน 3 เฟส โดยในเฟสแรก เอนไซม์จะทำการตรึงตัวเร่งปฏิกิริยามาทำปฏิกิริยาเคมี ผลิตภัณฑ์จะเกิดขึ้นในเฟสที่สอง ซึ่งเป็นของเหลว และจะมีตะกอนเกิดขึ้น และในเฟสที่สาม ตะกอนเหล่านี้จะเกิดเป็นฟิล์มเกาะอยู่บนชั้นบนผิวของของเหลว (Patnaik, 2010) ถังหมักประเภทนี้จะใช้ก๊าซหรือของเหลวส่งผ่านวัสดุขนาดเล็กที่มีสถานะของแข็งซึ่งในที่นี้ใช้เป็นซับสเตรทสำหรับการหมักที่ความเร็วสูงมากพอที่สามารถทำให้ของแข็งลอยได้ ทำให้ของแข็งเกิดการแขวนลอยอยู่ในก๊าซหรือของเหลว โดยมีข้อดี คือ อุณหภูมิในถังหมักนี้จะค่อนข้างเท่ากันสม่ำเสมอในทุก ๆ ตำแหน่ง จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการหายใจ สามารถเจริญได้ดี ไม่เกิดความร้อนสะสมภายในถังหมักนี้ สามารถดำเนินงานในกระบวนการต่อเนื่องได้ (Brahmachari, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

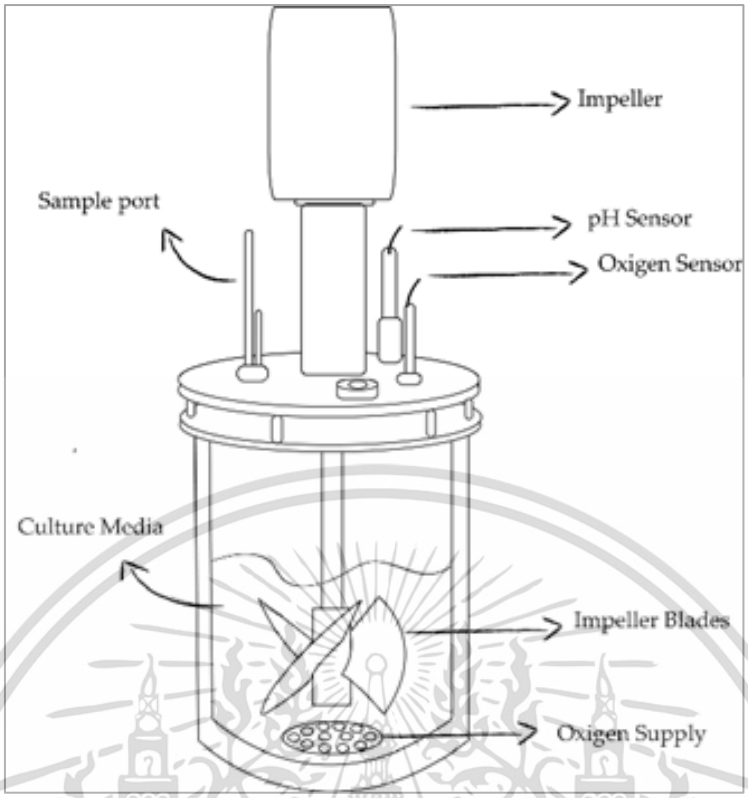


รูปที่ 2.8 ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด
ที่มา : Rajinikanth และคณะ (2009)

2.5.5 ถังหมักแบบกวน (Stirred-tank Fermentor)

ถังหมักแบบกวน เป็นถังหมักที่มีความคล้ายคลึงกับถังหมักแบบหมุน แต่ภายในถังหมักจะมีใบกวน หรือใบขูด ใช้สำหรับผสมซับสเตรทแทนการหมุนตัวถังหมัก อีกทั้งใบกวนจะช่วยทำให้ปฏิกิริยาภายในมีความเข้มข้นและอุณหภูมิที่เท่ากัน อีกทั้งยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการถ่ายเทความร้อนระหว่างซับสเตรท ทำให้มีอากาศภายในทั่วถัง เมื่อนำถังหมักแบบกวนมาเปรียบเทียบกับถังหมักแบบหมุนถังหมักแบบกวนสามารถบรรจุซับเสตรทได้มากกว่าถังหมักแบบหมุน นอกจากนี้การกวน กับมีระบบพ่นน้ำของถังหมักจะช่วยลดความร้อนสะสมได้ ทำให้ถังหมักแบบกวนเป็นถังหมักที่นิยมใช้งานในระดับอุตสาหกรรมการหมักและเป็นที่ยอมรับของกระบวนการทางชีววิทยา เหมาะกับการที่จะควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ที่ต้องการจะศึกษา เช่น ค่า pH อุณหภูมิอากาศ อัตราการเติมอากาศ การปั่นป่วน และการเติมซับสเตรท มีข้อดี คือ การเกิดการปนเปื้อนจากภายนอก และการกลายพันธุ์ของเชื้อต่ำ และระยะเวลาในการหมักสั้น แต่มีข้อเสีย คือ ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสูง เวลาในการฆ่าเชื้อและทำความสะอาดถังนาน (สราวุฒิ และคณะ, 2547; Germeca และคณะ, 2018; Garcia-Ochoa และคณะ, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 ถังหมักแบบกวน
ที่มา : Lucas และคณะ (2017)

2.6 การผลิตกรดซิตริกจากการหมักแบบอาหารแข็ง

Minyuan และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการหมักบนอาหารแข็งโดยการใช้เชื้อรา *A.niger* สำหรับการผลิตกรดซิตริกจากมันหวาน มีการออกแบบและดำเนินการในถังหมักแบบแพคเบดบรรจุหลายชั้น เพื่อศึกษาการถ่ายเทมวล และการถ่ายเทความร้อนระหว่างการหมักจากการเปรียบเทียบถังหมักแบบแพคเบดบรรจุหลายชั้นกับถังหมักแบบแพคเบดบรรจุชั้นเดียว โดยมีซับสเตรทที่เหมือนกัน รวมทั้งมีการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ กรดซิตริก แป้ง และการเจริญของเชื้อราภายในถังหมักแบบแพคเบดบรรจุหลายชั้น

Seyed และคณะ (2007) ได้ศึกษากลยุทธ์การควบคุมความแตกต่างของอุณหภูมิของซับสเตรทและความชื้น โดยการเติมอากาศเข้าด้วยอุณหภูมิต่าง ๆ และการไหลของอากาศทั้งในถังหมักแบบแพคเบดที่ไม่มีน้ำหล่อเย็นในแจ็กเก็ต และถังหมักแบบแพคเบดที่มีน้ำหล่อเย็นในแจ็กเก็ต การทดลองได้ดำเนินการภายในถังหมัก 1 ลิตรที่บรรจุเบดเป็นรำข้าวและเชื้อรา *A. niger* มีการวัดปริมาณแก๊สออกซิเจนในอากาศขาออก อุณหภูมิของเบด และการไหลของอากาศที่ไหลเข้า ถังหมักทั้งสองประเภท ผลกระทบของกลยุทธ์การควบคุมอัตราการเจริญของเชื้อราได้ถูกเปรียบเทียบทั้งในถังหมักทั้งสองประเภท จากผลการทดลอง ถังหมักแบบแพคเบดที่มีน้ำหล่อเย็นในแจ็คเก็ตเป็นกลยุทธ์ที่ดีกว่าสำหรับการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นของการหมักบนอาหารแข็งแบบแพคเบด การใช้ออกซิเจนที่สะสมในถังหมักนี้ประมาณ 1.7 เท่า ซึ่งสูงกว่าการควบคุมอื่น ๆ Minyuan และคณะ (1997) ได้ศึกษาการใช้มันหวาน ซึ่งเป็นพืชรากที่มีการเติบโตอย่างกว้างขวางในนิวซีแลนด์มาใช้เป็นซับสเตรทสำหรับการผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อรา *A. niger* ในการหมักบนอาหารแข็ง เมื่อกระบวนการได้ดำเนินการในถังหมักแบบแพคเบดโดยน้ำหนักของเบดเป็นตัวแปรที่สำคัญที่สุดในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดำเนินการ อัตราการเติมอากาศ และขนาดของซับสเตรทนั้นยังมีความสำคัญแต่ผลกระทบที่ได้นั้นจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับตัวแปรอื่น ๆ เช่น อัตราการไหลของอากาศมาก จะเป็นปัจจัยที่เอื้อต่อการผลิตกรดซิตริก ยกเว้นภายใต้สภาพการใช้งานบางอย่าง เช่น พื้นผิวขนาดอนุภาค ซึ่งเป็นการยับยั้งการเจริญของเชื้อราอาจเป็นเพราะความเค้นเฉือน จากการวิเคราะห์การเคลื่อนไหวของระบบแสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตกรดซิตริกภายในถังหมักได้ 0.82 กรัมซิเตรทต่อกิโลกรัมซับสเตรทเปียก ซึ่งเป็นครั้งที่สองในการหมักในขวด ในกรณีนี้ผลของการหมักในถังหมักแบบแพคเบดดีกว่าผลของการหมักในขวดอาจเป็นเพราะมีการเติมอากาศจึงทำให้ผลสำเร็จ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 วัสดุ

1) เชื้อรา *Aspergillus niger*
2) เปลือกกล้วยหอม
3) ชุดทดลอง Citric acid assay kit
4) สารเคมี
   - น้ำกลั่น
   - Sulfuric acid (H_2SO_4)
   - Sodium hydroxide (NaOH)
   - น้ำกลั่น
   - Potassium bisulfate ($KHSO_4$)
   - Sodium nitrite ($NaNO_2$)
   - Ammonium sulfamate ($H_6N_2SO_3$)
   - methyl -2- benzothai zolinone hydrazine hydrochloride (MBTH)
   - Iron(III) chloride hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)
   - D-(+)-Glucosamine hydrochloride
   - Potato dextrose broth (Difco)
   - Agar (Difco)

3.1.2 อุปกรณ์

1) มีด
2) เขียง
3) กรรไกร
5) กะละมัง
6) ถุงพลาสติก
7) ทัพพี
8) บีกเกอร์
9) อลูมิเนียมฟอยล์
10) ช้อนตักสาร
11) ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ
12) แท่งเขี่ยเชื้อ
13) แท่งแก้วสามเหลี่ยม
14) ตะเกียงแอลกอฮอล์
15) จานเพาะเชื้อ
16) ขวดรูปชมพู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17) ผ้าก๊อซ
18) เทปกาว
19) ตัวกรองอากาศ
20) สายยางซิลิโคน
21) โหลแก้ว
22) ลวดอลูมิเนียม
23) คีมตัดลวด
24) ตาข่ายอลูมิเนียม
25) ซิลิโคน
26) เชือก
27) ขาตั้งถังหมัก
28) ถ้วยอลูมิเนียมใส่วัดความชื้น
29) ที่คีบซับสเตรท
30) ถุงมือกันความร้อน
31) หลอดทดลอง
32) ฟิล์มยืดห่ออาหาร
33) ตะแกรงเหล็ก
34) กระบอกตวง
35) แท่งแก้วหยดสาร
36) คิวเวตต์
37) กรวยกรองเซรามิก
38) กระดาษกรอง
39) พาราฟิล์ม

3.1.3 เครื่องมือ

1) เครื่องวัดปริมาณออกซิเจน
2) เครื่องอบแห้งแบบถาด (Tray dryer)
3) เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง
4) เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5) หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง (Autoclave)
6) เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
7) ไมโครปิเปต
8) ตู้ปลอดเชื้อ
9) ตู้บ่มเชื้อ
10) โรตามิเตอร์
11) เครื่องทำความชื้น
12) ถังหมักแบบแพคเบด
13) ถังน้ำควบคุมอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14) เครื่องทำความร้อน (ฮีทเตอร์)
15) เครื่องทำความเย็น (ชิลเลอร์)
16) เซนเซอร์วัดอุณหภูมิ
17) ถังควบคุมความชื้น
18) เครื่องปั่น
19) ปั๊มลม
20) เครื่องกวนผสมและแท่งแม่เหล็กกวนสาร
21) เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของสาร (Biochrom Libra, S12)

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 วิธีการเตรียมเชื้อราและอาหาร

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ PD (Potato Dextrose) ในจานเพาะเชื้อ 24 กรัม และ Agar 15 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที เทอาหารลงในจานเพาะเชื้อจนอาหารแข็งตัว จึงทำการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหาร จากนั้นนำไปเก็บในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ทำการเก็บสปอร์โดยน้ำกลั่นที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว และปรับความเข้มข้นเป็น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2 การเตรียมซับสเตรทสำหรับการหมัก

ในงานวิจัยนี้ใช้เปลือกกล้วยหอมเป็นซับสเตรทในการหมัก (ความชื้นร้อยละ 9.68 โปรตีนร้อยละ 7.72 ไขมันร้อยละ 4.13 เยื่อใยร้อยละ 10.26 และเถ้าร้อยละ 14.36) ขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร นำเปลือกกล้วยมาอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบถาดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความชื้นเป็นร้อยละ 60 ฐานเปียก โดยใช้น้ำกลั่น หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 20 นาที พักไว้ให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของซับสเตรทลดลงจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วจึงผสมเชื้อ *A.niger* ลงในซับสเตรท

3.2.3 การศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของเปลือกกล้วยต่อการผลิตกรดซิตริก

ทำการศึกษาเพื่อหาค่า pH เริ่มต้นของซับสเตรท โดยนำเปลือกกล้วยที่ถูกผสมแล้วกับความเป็นกรดต่างๆ คือ pH 3 4 5 และ 6 เติมลงไปในขวดรูปชมพู่ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ต่อมาทำการเก็บตัวอย่างวันละ 1 ขวด จนกระทั่งครบทั้ง 5 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์การผลิตกรดซิตริก เพื่อความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของเปลือกกล้วยที่ทำให้ *A.niger* สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด แล้วนำไปเป็นตัวแปรในการหมักในถังหมักแบบแพคเบดต่อไป

3.2.4 การศึกษาผลของอัตราการเติมอากาศต่อการผลิตกรดซิตริก

ทำการศึกษาการจำลองสภาวะอัตราการเติมอากาศต่าง ๆ พบว่ามีการผลิตกรดซิตริกที่ต่างกันโดยการใช้อัตราการเติมอากาศที่ 0.1 vvm จะเป็นสภาวะที่อากาศภายในน้อยมากเมื่อ เทียบกับปริมาณซับสเตรท ต่อมาที่ 0.5 vvm จะเป็นการสร้างสภาวะที่มีอากาศเพียงครึ่งหนึ่งของปริมาณซับสเตรท ส่วน 1.0 vvm นั้นจะเป็นการเติมอากาศที่มีอากาศเทียบเท่ากับปริมาณซับสเตรท และ 1.5 vvm จะเป็นสภาวะที่มีอากาศภายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

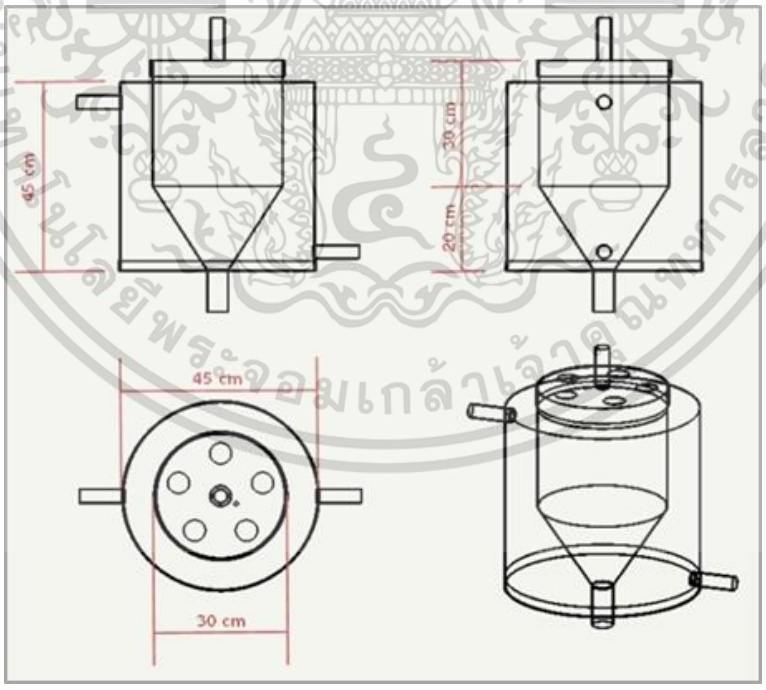
มากกว่าปริมาณซับสเตรท โดยจะดำเนินการ เพื่อนำไปออกแบบและสร้างถังหมักแบบแพคแบคในการกำหนดปริมาณอากาศที่เหมาะสม

3.2.5 การศึกษาการผลิตกรดซิตริกในถังหมักแบบแพคเบด

เมื่อทำการศึกษาจากการทดลองเบื้องต้นจากค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของซับสเตรท ก่อนเริ่มทำการหมัก และอัตราการเติมอากาศที่มีอัตราการผลิตกรดซิตริกสูงสุดจะนำมาเป็นตัวแปร ที่จะนำมาใช้ในการหมักในถังหมักแบบแจ็กเก็ต โดยมีการควบคุมอุณหภูมิภายใน 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักเป็นระยะเวลา 5 วัน โดยในแต่ละวันของการหมัก จะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างประมาณ 25 กรัม เพื่อนำไปวัดความชื้น การผลิตกรดซิตริก และการเจริญของเชื้อรา

3.2.5.1 การออกแบบและสร้างถังหมัก

ถังหมักแบบแพคเบด โดยตัวถังจะทำจากอลูมิเนียมเพราะมีความแข็งแรง สามารถทนต่อการกัดกร่อนได้ในระดับหนึ่ง มีความสามารถในการนำความร้อนสูง และมีราคาถูก เนื่องจากอากาศร้อนภายในจะอยู่ที่ด้านบนของถังสูง 50 เซนติเมตร กว้าง 45 เซนติเมตร อากาศจะถูกป้อนเข้าทางด้านล่างของถังผ่านท่อซิลิโคนที่ทำการเจาะรูเพื่อกระจายอากาศให้กับซับสเตรท อากาศจะผ่านชั้นของตะแกรงเหล็กที่รองรับซับสเตรท เมื่อระยะเวลาของการหมักผ่านไปจะเกิดความชื้นและความร้อนสะสม เพื่อป้องกันไม่ให้ความชื้นภายในถังหมักเปลี่ยน จึงต้องออกแบบให้ถังด้านล่างมีความชันเพื่อให้เกิดการระบายน้ำได้ภายในถังหมัก และมีการติดตั้งแจ็กเก็ตเพื่อระบายความร้อนภายในถัง และบริเวณแจ็กเก็ตจะมีการติดตั้งฉนวนเพื่อป้องกันการถ่ายเทความร้อนจากสิ่งแวดล้อม รวมถึงด้านบนของถังจะมีช่องเพื่อเก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ดังรูปที่ 3.1

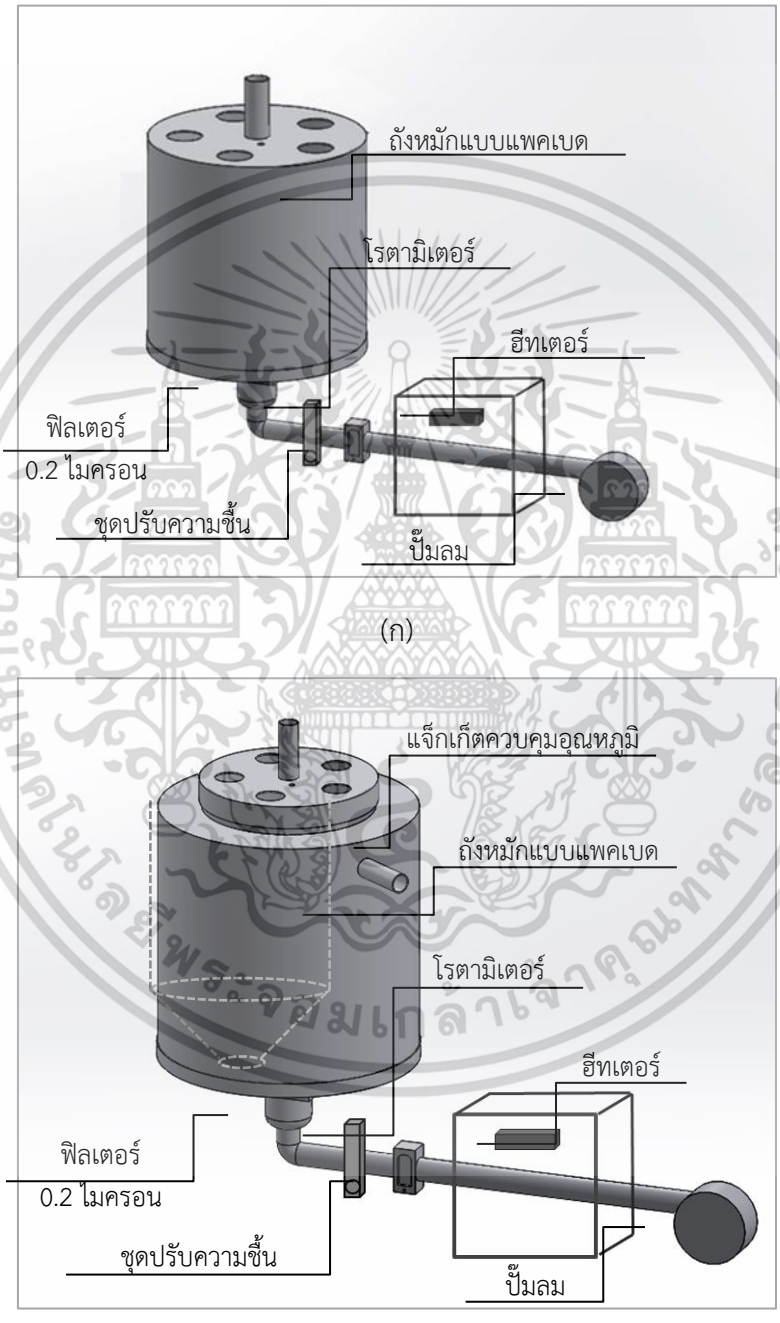


รูปที่ 3.1 ขนาดของถังหมักแบบแพคเบดแบบมีแจ็กเก็ตของงานวิจัยนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.2 การควบคุมอุณหภูมิภายในถัง

ได้ทำการศึกษาว่าภายในถังมีความร้อนสะสมภายในถัง จึงได้มีการลดความร้อน โดยการใช้ปั๊มลมปริมาตร 7 ลิตรต่อนาที ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3.1-3.3 และนำมาต่อท่อยางซิลิโคนแล้วนำไปหล่อเย็นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจากนั้นนำท่อซิลิโคนต่อเข้าไปในถังชั้นนอกเพื่อลดความร้อนสะสมภายใน ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ชุดถังหมักแบบแพคเบด
(ก) ถังหมักแบบไม่มีแจ็กเก็ต (ข) ถังหมักแบบมีแจ็กเก็ต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6 การทดลองการหมักเปลือกกล้วยหอมในถังหมักแบบแพคเบด

โดยการศึกษาการควบคุมอุณหภูมิภายในถังหมักจากการเปรียบเทียบระหว่างถังหมักที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (มีแจ็กเก็ต) และถังหมักที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ (ไม่มีแจ็กเก็ต) โดยใช้ ถังหมักแบบแพคเบด ปริมาตร 20 ลิตร สำหรับบรรจุซับสเตรทปริมาตร 7 ลิตร มีอัตราการเติมอากาศและค่าความเป็นกรด คือ 1.0 vvm และ pH 5 ตามลำดับ ความเข้มข้นของเชื้อรา *A.niger* เท่ากับ 1×10^5 สปอร์ต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน และสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อราสามารถผลิตได้ และบันทึกลักษณะของเชื้อรา รวมทั้งวัดปริมาณแก๊สออกซิเจนในถังหมัก

3.3 การวิเคราะห์ผล

3.3.1 การวัดปริมาณกรดซิตริก

ทำการเก็บตัวอย่างมา 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทำการผสมสารเป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปกรอง จากนั้นนำไปวัดปริมาณกรดซิตริกด้วยชุดทดสอบกรดซิตริก Citric acid assay kit ของบริษัท Megazyme

3.3.2 การวัดความชื้น

ทำการเก็บตัวอย่างมา 3.0000-5.0000 กรัม ด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง หลังจากนั้นนำไปเข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการอบแล้วมาชั่งในเครื่องชั่งใหม่อีกครั้งเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างก่อนอบและตัวอย่างหลังอบ

3.3.3 การคิดปริมาณลมที่นำไปลดความร้อนภายในถัง

ทำการติดตั้งเทอร์โมคัปเปิลวัดอุณหภูมิที่บริเวณใจกลางของซับสเตรทและฝาถัง เพื่อตรวจสอบว่าอุณหภูมิเฉลี่ยที่เกิดขึ้น ณ ตำแหน่งนั้นมีค่าเท่าไหร่ จากนั้นจะทำการคำนวณค่าความจุความร้อนรวมของถังดังสมการที่ 3.1 3.2 และ 3.3 (Hsu และคณะ, 1991)

$$C_{p,รวม} = (C_{p,อากาศที่อุณหภูมิเฉลี่ย} \times ความชื้น) + (C_{p,แพคเบด} \times ความชื้น) \quad (3.1)$$

$$C_{p,แพคเบด} = 4180[0.406 + (1.46 \times 10^{-3} \times T_{เฉลี่ย}) + (0.203 \times ความชื้น) - (2.49\times10^{-3}\times ความชื้น^{2})] \quad (3.2)$$

โดย C_p คือ ค่าความจุความร้อน (จูลต่อกิโลกรัมองศาเซลเซียส)

T คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

จากนั้นนำไปหาปริมาตรลมได้จากปริมาณความร้อนที่ลดลงภายในถังเท่ากับความร้อนที่ลมได้รับ

$$m_{รวม}\times C_{p,รวม} \times ((T_{เฉลี่ย}-T)/1440) = \rho_{อากาศ} \times V_{ลม} \times C_{p,อากาศ} \times (\Delta T/1440) \quad (3.3)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดย $m_{รวม}$ คือ มวลรวมในถัง (อากาศ, ซับสเตรท, น้ำ) (กิโลกรัม)
T คือ อุณหภูมิที่ต้องการ (องศาเซลเซียส)
$\rho_{อากาศ}$ คือ ความหนาแน่นของอากาศที่ 25 องศาเซลเซียส (กิโลกรัมต่อลิตร)
$V_{ลม}$ คือ ปริมาตรลม (ลิตร)
$C_{p,อากาศ}$ คือ ความจุความร้อนจำเพาะของอากาศที่ 25 องศาเซลเซียส (จูลต่อกิโลกรัมองศาเซลเซียส)
ΔT คือ อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น – อุณหภูมิอากาศ (องศาเซลเซียส)
1440 คือ นาทีในหนึ่งวัน

จากสมการข้างต้นจะได้ปริมาตรอากาศ (ลิตร) ที่สามารถลดอุณหภูมิภายในถังระหว่างกระบวนการหมักได้

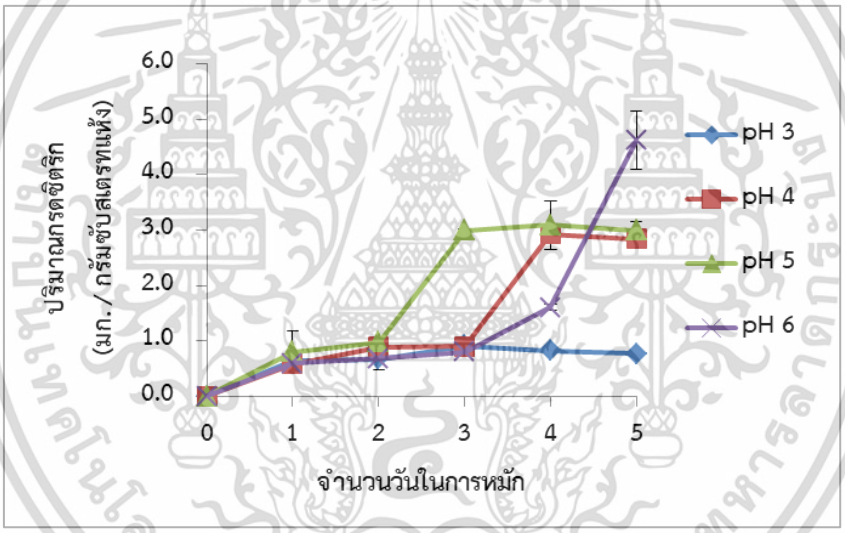
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของค่า pH เริ่มต้นของเปลือกกล้วยต่อการผลิตกรดซิตริกของ *A. niger*

จากรูปที่ 4.1 พบว่าที่สภาวะความเป็นกรดเริ่มต้นเท่ากับ 5 มีปริมาณการผลิตกรดซิตริกสูงที่สุดในวันที่ 3 เท่ากับ 2.99±0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง โดยมีอัตราการผลิตกรดซิตริกสูงที่สุด เท่ากับ 0.99±0.27 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้งต่อวัน ดังตารางที่ 4.1 และหลังจากนั้นปริมาณกรดซิตริกจะคงที่ไปจนตลอดการหมัก ดังนั้นค่า pH เริ่มต้นของซับสเตรทที่เลือกใช้ในการศึกษาอัตราการเติมอากาศในโหลแก้ว คือ pH 5 เนื่องจากมีปริมาณการผลิตกรดซิตริกมากที่สุด ซึ่งใช้จำนวนวันในการหมักน้อยที่สุด ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อราสามารถเจริญได้ในช่วงค่า pH เท่ากับ 3-6 และจากงานวิจัยนี้ พบว่าเชื้อรา *A. niger* สามารถเจริญได้ดีที่ค่า pH เท่ากับ 5 เนื่องจากพบว่าตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 มีปริมาณเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* มากกว่าที่ค่า pH เริ่มต้นอื่น ๆ เส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาวพุ่มและสปอร์กระจายอยู่ทั่วทั้งซับสเตรทอย่างเห็นได้ชัดเมื่อมองด้วยตาเปล่า ดังตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.1 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ของ *A.niger* จากการหมักเปลือกกล้วยที่ค่า pH เริ่มต้น เท่ากับ 3 4 5 และ 6

ตารางที่ 4.1 การเลือกใช้สภาวะความเป็นกรดที่เหมาะสมโดยพิจารณาอัตราการผลิตกรดซิตริก

ค่า pH เริ่มต้นของเปลือกกล้วย	จำนวนวันที่ได้อัตราผลิตกรดซิตริกสูงสุด	ปริมาณกรดซิตริก (มก.ต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)	อัตราการผลิตกรดซิตริก (มก.ต่อกรัมซับสเตรทแห้งต่อวัน)
pH 3	1	0.63±0.02	0.63±1.35
pH 4	4	2.84±0.00	0.73±0.57
pH 5	3	2.99±0.03	0.99±0.27
pH 6	5	4.62±0.52	0.92±0.19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของเชื้อรา *A. niger* ที่เจริญบนเปลือกกล้วยที่ค่า pH เริ่มต้นต่างกัน

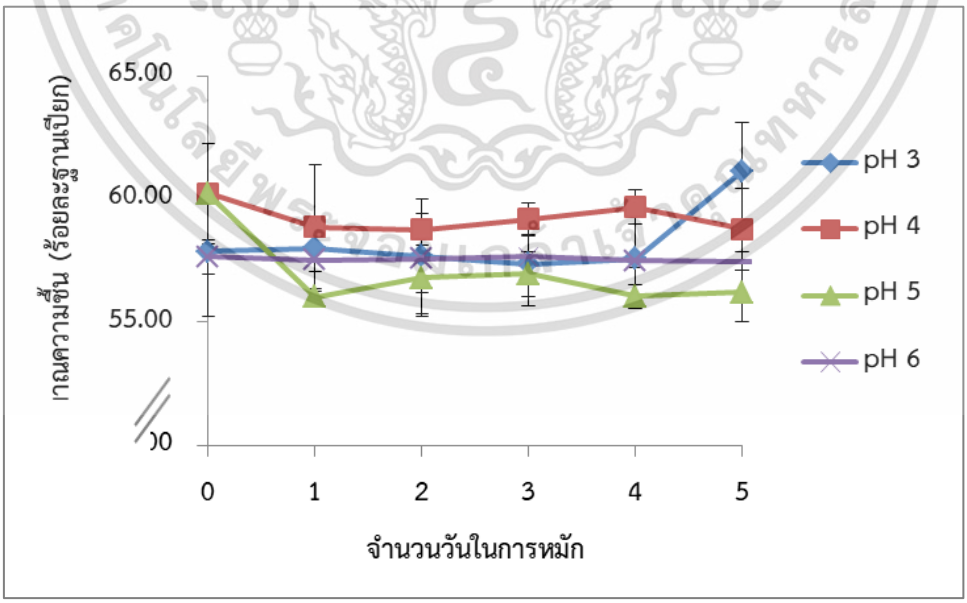
ค่า pH เริ่มต้นของเปลือกกล้วย	ลักษณะทางกายภาพของเชื้อรา *A. niger* ในวันที่ 5 ของการหมัก
pH 3	 มีการเกิดเส้นใยเป็นพุ่มและมีสปอร์เพียงเล็กน้อย
pH 4	 มีการเกิดเส้นใยเป็นพุ่มกระจายอยู่ในซับสเตรทและมีสปอร์เพียงเล็กน้อย
pH 5	 มีการเกิดเส้นใยเป็นพุ่มและมีสปอร์กระจายอยู่ทั่วทั้งซับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะของเชื้อรา *A. niger* ที่เจริญบนเปลือกกล้วยที่ค่า pH เริ่มต้นต่างกัน

pH 6	 มีการเกิดเส้นใยเป็นพุ่มและมีสปอร์กระจายอยู่ในซับสเตรท

จากรูปที่ 4.2 เป็นปริมาณความชื้นฐานเปียกที่ได้จากการหมักเปลือกกล้วยในขวดรูปชมพู่ โดยไม่มีการเติมอากาศ ทำให้ความชื้นของซับสเตรทในแต่ละวันของแต่ละสภาวะความเป็นกรด ต่าง ๆ มีค่าปริมาณความชื้นฐานเปียกเฉลี่ยร้อยละ 58.03±1.33 ซึ่งความชื้นเป็นปัจจัยที่จำเป็น ต่อการเจริญของเชื้อรา ทั้งนี้การลดลงของปริมาณความชื้นในวันแรก เนื่องจากเชื้อรามีการนำความชื้นไปใช้ในการทำกิจกรรมภายในเซลล์ และหลังจากนั้นความชื้นเริ่มคงที่ เนื่องจากเชื้อรามีการหายใจจากการทำกิจกรรมภายในเซลล์ รวมถึงการหมักที่ไม่มีการเติมอากาศแต่มีการถ่ายเทอากาศผ่านสำลีที่ปิดด้านบนของขวดรูปชมพู่เท่านั้น



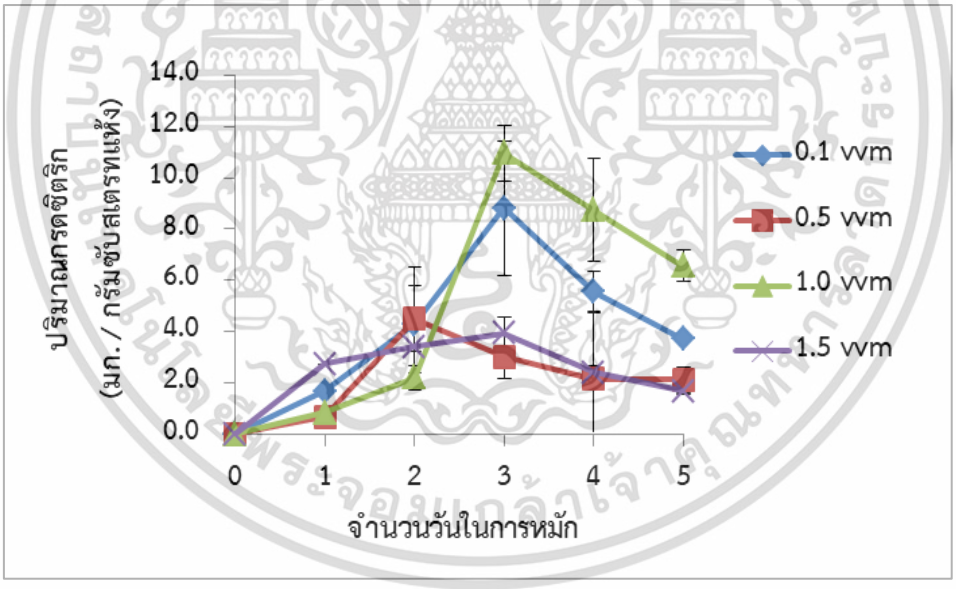
รูปที่ 4.2 ปริมาณความชื้นฐานเปียกจากการหมักเปลือกกล้วยที่ค่า pH เริ่มต้น เท่ากับ 3 4 5 และ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของอัตราการเติมอากาศต่อการผลิตกรดซิตริกของ *A. niger*

4.2.1 การผลิตกรดซิตริก

จากรูปที่ 4.3 การผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 1 และ 2 สำหรับการเติมอากาศที่อัตรา 1.5 และ 0.5 vvm ตามลำดับ ส่วนที่ 0.1 และ 1.0 vvm การผลิตกรดซิตริกสูงจนถึงวันที่ 3 จากนั้นลดลง เนื่องจากอาจมีสภาวะที่ไม่เหมาะสม กล่าวคือ ที่ 0.1 vvm มีการเติมอากาศที่ไม่เพียงพอ ส่งผลให้เกิดความร้อนสะสมมากเกินไป และที่ 1.0 vvm เชื้อราอาจเจริญได้ดี แต่เมื่อเริ่มเกิดเส้นใยเป็นพุ่มทั่วทั้งซับสเตรท ทำให้ความสามารถในการระบายความร้อนสะสมลดลงและจากตารางที่ 4.4 พบว่าที่อัตราการเติมอากาศ 0.1 vvm ไม่มีการเกิดเส้นใยแต่มีการผลิตกรดซิตริก แสดงว่า การเกิดเส้นใยอาจไม่ได้มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก และสาเหตุที่ทำให้ 0.1 vvm มีการผลิตกรดซิตริกสูงเทียบเท่า 1.0 vvm อาจเป็นเพราะว่ามีการเกิดสปอร์กระจายอยู่ทั่วทั้งซับสเตรทเช่นเดียวกัน และอัตราการผลิตกรดซิตริกในตารางที่ 4.3 พบว่าอัตราการผลิตกรดซิตริกจะมีค่าสูงที่สุด เมื่อใช้อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm โดยจะมีอัตราการผลิตกรดซิตริก เท่ากับ 3.66±0.59 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้งต่อวัน และสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงที่สุด เท่ากับ 10.97±0.85 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 3 ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เพื่อทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบดต่อไป ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อราต้องการใช้ออกซิเจน ในการทำกิจกรรมภายในเซลล์เพื่อการเจริญ ดังนั้นในกระบวนการหมักจึงต้องมีอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมและออกซิเจนที่มากเพียงพอสำหรับการเจริญของเชื้อรา



รูปที่ 4.3 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ของ *A.niger* จากการหมักเปลือกกล้วย ที่อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 vvm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การเลือกใช้สภาวะการเติมอากาศที่เหมาะสมโดยพิจารณาอัตราการผลิตกรดซิตริก

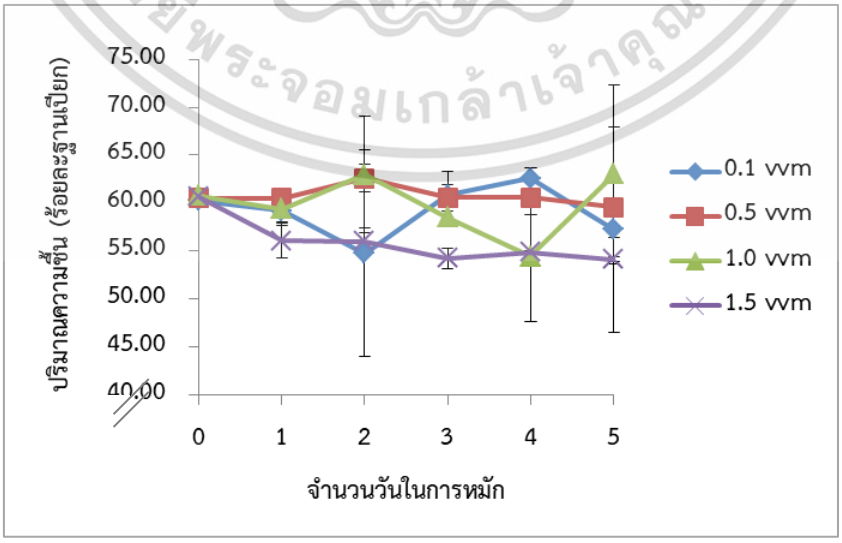
อัตราการเติมอากาศ	จำนวนวันที่ได้อัตราผลิตกรดซิตริกสูงสุด	ปริมาณกรดซิตริก (มก.ต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)	อัตราการผลิตกรดซิตริก (มก.ต่อกรัมซับสเตรทแห้งต่อวัน)
0.1 vvm	3	8.81±1.09	2.94±0.19
0.5 vvm	2	4.50±2.22	2.25±0.39
1.0 vvm	3	10.97±0.85	3.66±0.59
1.5 vvm	1	2.73±0.00	2.73±0.01

ตารางที่ 4.4 ลักษณะของเชื้อรา *A.niger* ที่เจริญบนเปลือกกล้วยที่อัตราการเติมอากาศต่างกัน

อัตราการเติมอากาศ	ลักษณะทางกายภาพของเชื้อรา *A.niger*
0.1 vvm	ไม่มีการเกิดเส้นใย แต่มีการเกิดสปอร์กระจายอยู่ทั่วทั้งซับสเตรท
0.5 vvm	มีการเกิดเส้นใยและมีสปอร์เพียงเล็กน้อย
1.0 vvm	มีการเกิดเส้นใยเป็นพุ่มและมีสปอร์กระจายอยู่ทั่วทั้งซับสเตรท
1.5 vvm	มีการเกิดเส้นใยแต่ไม่เป็นพุ่ม และมีการเกิดสปอร์กระจายอยู่ทั่วทั้งซับสเตรท

4.2.2 ปริมาณความชื้น

จากรูปที่ 4.4 พบว่าที่ 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 vvm มีปริมาณความชื้นฐานเปียกเฉลี่ยร้อยละ 59.15±2.77 60.74±0.99 59.85±3.21 และ 55.99±2.42 ตามลำดับ บ่งบอกได้ว่าเมื่อมีอัตรา การเติมอากาศที่เพิ่มขึ้น จะทำให้ความชื้นฐานเปียกของซับสเตรทลดลง เนื่องจากในกระบวนการหมักมีช่องทางการระบายอากาศ (รูลมขาออก) ทำให้อากาศที่เติมเข้ามาในกระบวนการหมักมีผลต่อความชื้นของซับสเตรท กล่าวคือ กระบวนการหมักที่มีการเติมอากาศจะมีการแลกเปลี่ยนความร้อนระหว่างอากาศกับความร้อนสะสมของซับสเตรท ในขณะเดียวกันยังเป็นการถ่ายเทมวลของความชื้นของซับสเตรท ซึ่งหากเลือกใช้อัตราการเติมอากาศที่มากเกินไป จะส่งผลให้ความชื้นของซับสเตรท ลดน้อยลงจนอาจเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

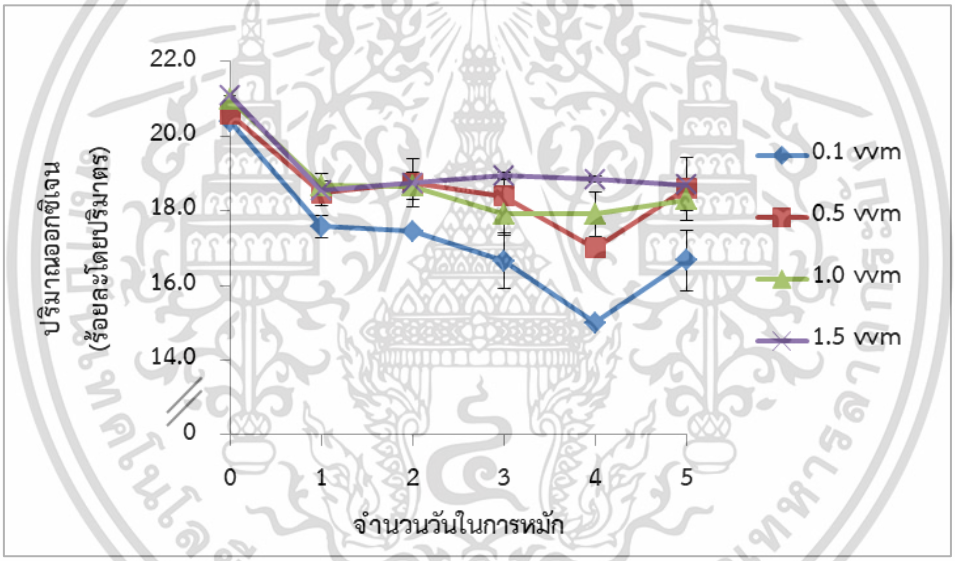


รูปที่ 4.4 ความชื้นเปลือกกล้วยระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 vvm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ปริมาณออกซิเจนในโหลแก้ว

จากรูปที่ 4.3 และ 4.5 จะเห็นว่าที่อัตราการเติมอากาศต่าง ๆ ส่งผลต่อการเจริญของ เชื้อรา *A.niger* โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm มีอัตราการผลิตกรดซิตริกสูงที่สุด ซึ่งเกิดจากปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริก กล่าวคือ เชื้อราต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญ เพื่อทำกิจกรรมภายในเซลล์ จึงส่งผลต่อการผลิตกรดซิตริก และจากรูปที่ 4.3 จะพบว่าแม้ว่า 1.0 vvm จะเหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกมากที่สุด แต่จากการสังเกตลักษณะทางกายภาพของเชื้อรา ดังตารางที่ 4.4 ในระหว่างกระบวนการหมักของ 0.1 vvm ซึ่งไม่มีการเกิดเส้นใยของเชื้อรา แต่มีการเกิดสปอร์กระจายอยู่ทั่วทั้งซับสเตรท ในขณะที่ 1.0 vvm เกิดเส้นใยสีขาวเป็นพุ่มหย่อม ๆ และในขณะเดียวกันก็มีสปอร์กระจายอยู่ทั่วทั้งซับสเตรทเช่นเดียวกัน และที่อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm เป็นอัตราการเติมอากาศที่มีออกซิเจนที่มากเพียงพอและมีผลต่อการเจริญของเชื้อรามากที่สุด ถึงแม้ว่าลักษณะเส้นใยของเชื้อราจะเกิดเป็นเส้นใยสีขาวและมีสปอร์กระจายอยู่ทั่วซับสเตรท แต่จำนวนเชื้อราที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้อาจมีปริมาณน้อยกว่าอัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เนื่องจากอัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm อาจมีความแรงของลมมากเกินไปสำหรับการเจริญของเชื้อราและทำให้เส้นใยมีลักษณะขาดไม่เป็นพุ่ม



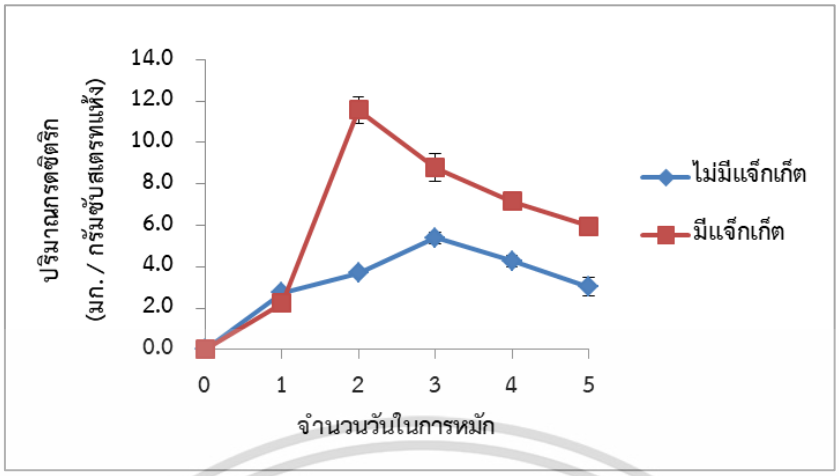
รูปที่ 4.5 ปริมาณออกซิเจนที่เหลือในโหลแก้วที่อัตราการเติมอากาศ 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 vvm

4.3 การหมักกรดซิตริกของ *A.niger* ในถังหมักแบบแพคเบดที่มีแจ็กเก็ตลม

4.3.1 การผลิตกรดซิตริก

จากรูปที่ 4.6 และอัตราการผลิตกรดซิตริกในตารางที่ 4.3 สำหรับถังหมักแบบแพคเบดที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ (ไม่มีแจ็กเก็ต) พบว่าอัตราการผลิตกรดซิตริกจะมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 1 คือ 2.74±0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้งต่อวัน ลักษณะทางกายภาพของเชื้อราจะมีการสร้างเส้นใยเพียงเล็กน้อย และสำหรับถังหมักแบบแพคเบดที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (มีแจ็กเก็ต) พบว่าอัตราการผลิตกรดซิตริกจะมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 2 คือ 5.79±0.19 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้งต่อวัน และพบว่าเชื้อรามีการสร้างเส้นใยมากกว่าการหมักใน ถังหมักที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ ดังนั้น การควบคุมอุณหภูมิของถังหมักจึงมีผลต่ออัตราการผลิตของกรดซิตริก เนื่องจากสามารถลดความร้อนสะสมภายในถังหมัก ดังรูปที่ 4.7 ทำให้การผลิตกรดซิตริกเกิดขึ้นในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ของ *A.niger* จากการหมักเปลือกกล้วยที่ pH 5 และ 1.0 vvm ในถังหมักแบบแพคเบดที่มีแจ็กเก็ตและไม่มีแจ็กเก็ต

ตารางที่ 4.5 อัตราการผลิตกรดซิตริกที่ค่า pH 5 และ 1.0 vvm ในถังหมักแบบแพคเบด

การควบคุมอุณหภูมิ	จำนวนวันที่ได้อัตราผลิตกรดซิตริกสูงสุด	ปริมาณกรดซิตริก (มก.ต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)	อัตราการผลิตกรดซิตริก (มก.ต่อกรัมซับสเตรทแห้งต่อวัน)
ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ	1	2.74±0.06	2.74±0.03
มีการควบคุมอุณหภูมิ	2	11.58±0.65	5.79±0.19

ตารางที่ 4.6 ลักษณะของเชื้อรา *A.niger* ที่เจริญบนเปลือกกล้วยในถังหมักแบบแพคเบด

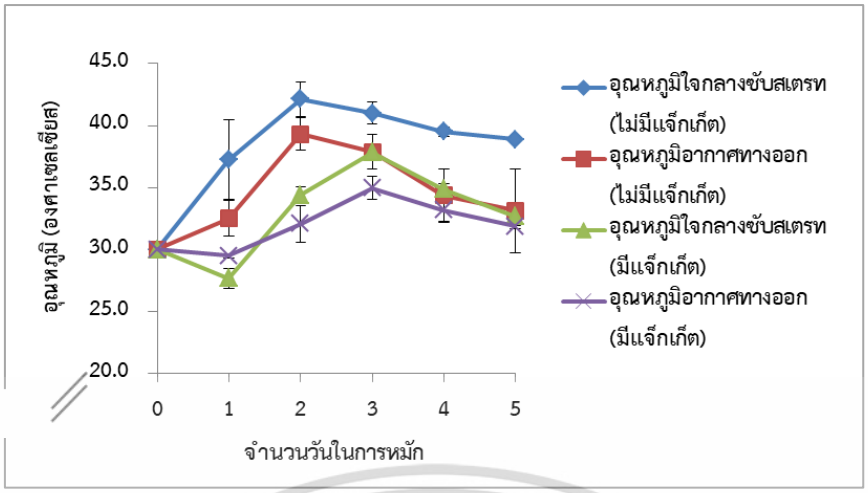
การควบคุมอุณหภูมิ	ลักษณะทางกายภาพของเชื้อรา *A.niger*
ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ	มีเส้นใยเป็นพุ่มเพียงเล็กน้อย แต่มีการเกิดสปอร์กระจายอยู่ทั่วทั้งซับสเตรท
มีการควบคุมอุณหภูมิ	มีเส้นใยเป็นพุ่มและมีการเกิดสปอร์กระจายอยู่ทั่วทั้งซับเสตรทจำนวนมาก

4.3.2 อุณหภูมิภายในถังหมัก

เมื่อมีกระบวนการหมักระยะเวลา 5 วัน อุณหภูมิภายในถังหมักจะเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจาก ความร้อนสะสมที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมภายในเซลล์ของเชื้อรา ส่งผลให้การควบคุมอุณหภูมิภายในถังหมักที่คงไว้ 30 องศาเซลเซียสนั้นเปลี่ยนไป จึงต้องมีการทำระบบหล่อเย็นด้วยการสร้างแจ็กเก็ตลมภายนอกของถังหมักเพื่อลดอุณหภูมิภายในถังหมัก

จากการวิเคราะห์ผลการเก็บอุณหภูมิ ณ ตำแหน่งใจกลางของซับสเตรท และอุณหภูมิ อากาศทางออกของถังหมัก พบว่าอุณหภูมิทั้งสองตำแหน่งของถังหมักแบบแพคเบดที่มีแจ็กเก็ตสามารถลดความร้อนสะสมภายในถังหมักได้ดีกว่าถังหมักแบบแพคเบดที่ไม่มีแจ็กเก็ตอย่างเห็นได้ชัด ดังรูปที่ 4.7 จึงสามารถกล่าวได้ว่าการติดตั้งแจ็กเก็ต สามารถลดความร้อนสะสมภายในถังหมักได้

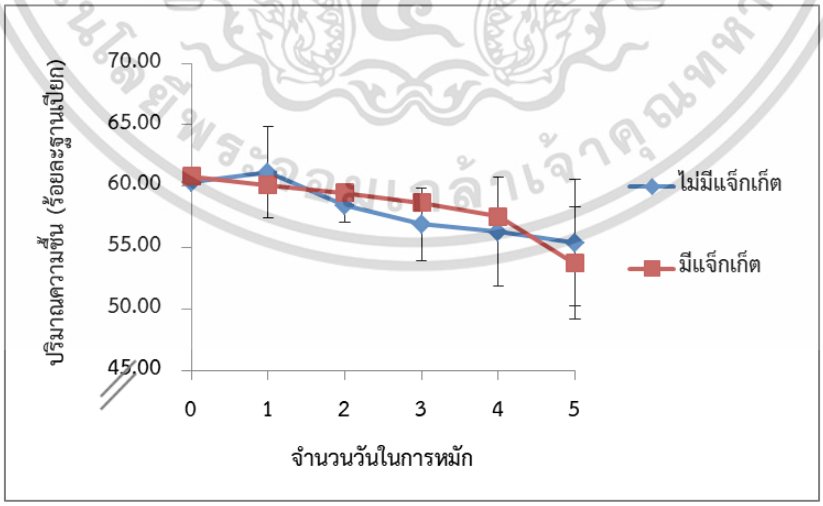
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 อุณหภูมิ ณ ตำแหน่งต่าง ๆ ภายในถังหมักแบบแพคเบดที่มีแจ็กเก็ตและไม่มีแจ็กเก็ต

4.3.3 ปริมาณความชื้น

จากรูปที่ 4.8 พบว่าปริมาณความชื้นฐานเปียกเฉลี่ยร้อยละของซับสเตรทภายในถังหมักที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและมีการควบคุมอุณหภูมิ เท่ากับ 58.09±2.29 และ 58.39±2.53 ตามลำดับ จากผลข้างต้นนี้ เป็นผลมาจากเมื่อถังหมักมีการติดตั้งแจ็กเก็ตลม ทำให้ถังหมักสามารถลดความร้อนสะสมภายในถัง ซึ่งส่งผลต่อการควบคุมความชื้นฐานเปียกของซับสเตรทภายในถังหมักได้ และสาเหตุที่ทำให้ความชื้นของซับสเตรทภายในถังหมักที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและมีการควบคุมอุณหภูมิแตกต่างกันเล็กน้อย อาจเป็นเพราะสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกของ *A.niger* (pH 5 และ 1.0 vvm) กล่าวคือ ทั้งถังหมักที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและมีการควบคุมอุณหภูมิมีอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสม จึงส่งผลให้ความชื้นภายในถังหมักไม่แตกต่างกัน

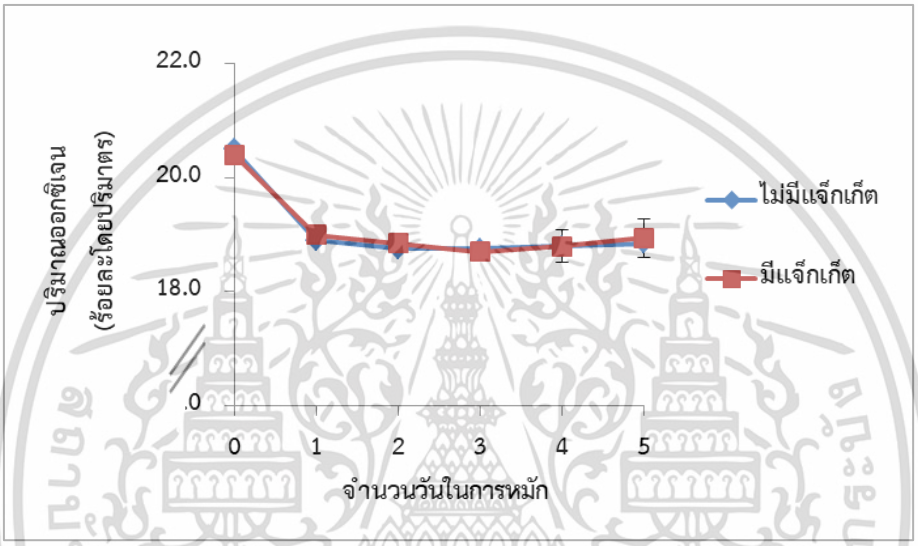


รูปที่ 4.8 ความชื้นเปลือกกล้วยระหว่างการหมักที่ pH 5 และ 1.0 vvm ในถังหมักแบบแพคเบดที่มีแจ็กเก็ตและไม่มีแจ็กเก็ต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 ปริมาณออกซิเจนในถังหมัก

จากรูปที่ 4.9 พบว่าเนื่องจากในถังหมักแบบแพคเบดมีอัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่เหลือภายในถังหมักตั้งแต่วันที่ 1 จนตลอดระยะเวลาการหมักมีปริมาณไม่ต่างกัน คือ ร้อยละ 18.83±0.09 เนื่องจากอัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เป็นอัตราการเติมอากาศที่มีปริมาณออกซิเจนมากเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อรา ซึ่งจะส่งผลต่อการผลิตกรดซิตริก หากปริมาณออกซิเจนลดลง จะบ่งบอกถึงเชื้อรามีการใช้ออกซิเจน จากผลข้างต้นนี้ สามารถสรุปได้ว่า อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm เพียงพอต่อกระบวนการเจริญของเชื้อรา *A.niger*



รูปที่ 4.9 ปริมาณออกซิเจนที่ภายในถังหมักระหว่างการหมักเปลือกกล้วยที่ pH 5 และ 1.0 vvm ในถังหมักแบบแพคเบดที่มีแจ็กเก็ตและไม่มีแจ็กเก็ต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง (Solid State Fermentation, SSF) ของเชื้อรา *A.niger* โดยใช้เปลือกกล้วยเหลือใช้จากอุตสาหกรรมอาหารเป็นซับสเตรท ในถังหมักแบบแพคเบดในงานวิจัยนี้ พบว่าค่า pH เริ่มต้น ของเปลือกกล้วยและอัตราการเติมอากาศ เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตกรดซิตริก และการเจริญของเชื้อรา ค่า pH เริ่มต้นของของซับสเตรท เท่ากับ 5 และอัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกของ *A.niger* นอกจากนี้ ถังหมักแบบแพคเบดที่มีการติดตั้งแจ็กเก็ตลม สามารถลดอุณหภูมิสะสมภายในถังหมักได้ ทำให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริก การใช้เปลือกกล้วยเป็นซับสเตรทในการหมักทางชีวภาพด้วยถังหมักแบบแพคเบดที่มีการควบคุมอุณหภูมิ จึงเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการผลิตกรดซิตริก

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากระหว่างกระบวนการหมักในถังหมักแบบแพคเบด พบว่าความชื้นของซับสเตรทลดลงจากความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา จึงควรแก้ปัญหาด้วยการติดตั้งเครื่องควบคุมความชื้น ชุดสเปรย์พ่นละอองน้ำ และติดเซนเซอร์วัดความชื้นของซับสเตรท เพื่อทำการเพิ่มความชื้นของซับสเตรท และอาจจะสามารถทำให้เชื้อราทำกิจกรรมเพื่อผลิตกรดซิตริกได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

2. ควรเพิ่มจำนวนครั้งในการตรวจวัดคุณภาพของเปลือกกล้วยที่นำมาเป็นซับสเตรท หลังมีการรับมาจากอุตสาหกรรม เพื่อควบคุมการผลิตกรดซิตริกในแต่ละครั้งให้มีมาตรฐาน ใกล้เคียงกันและมีความแม่นยำมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

6.1 วารสาร ระดับนานาชาติ

ชื่อวารสาร: Bioresource and bioprocessing

ชื่อเรื่อง: Using Banana Peel as a Substrate for Citric Acid Production by *Aspergillus niger* in an Air-jacketed Packed Bed Bioreactor

สถานะ: อยู่ระหว่างการพิจารณา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จุฑามาศ รถา. 2553. *การผลิตเอนโดกลูคาเนสโดยเชื้อราที่แยกจากดิน*. วิทยานิพนธ์สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

จุรีรัตน์ สุดชะเน, ชนานันท์ หุตางกูร, ปิ่นหทัย ขำคมเขต และพวงผกา คุ้มสีไว. 2555. *การคัดเลือกเชื้อราทนร้อนที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายชานอ้อยเพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอทานอลโดย saccharomyces cerevisiae*. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.

ชุติเดช เพิ่มศรีบรูสุข, ปริปก พศิสุวรรณ และกนก รัตนะกนกชัย. 2557. การศึกษาเชิงเปรียบเทียบการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสบริสุทธิ์ฟางข้าวที่ผ่านและไม่ผ่าน การกำจัดลิกนินด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma*. คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีบางขุนเทียนกรุงเทพ

ธัญรัตน สหายา, จรัญ ฉัตรมานพ และเพ็ญจิตร ศรีนพคุณ. 2551. *การพัฒนาถังหมักแพคเบดเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอมไซมโปรติเอสสำหรับการหมักแบบแห้ง*. ภาควิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร วิทยาเขตบางเขน.

เนริสา คุณประทุม. 2543. *การผลิตไซแลนเนสจาก Trichoderma reesei โดยวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร.* วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และ สิทธินันท์ ท่อแก้ว. 2551. *การผลิตเอนไซม์ไตรโคเดอร์มา รีสิอีสำหรับอุตสาหกรรมเอทานอล*. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2560. *Cellulose/ เซลลูโลส* [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0612/cellulose. สืบค้นวันที่ 27 พฤษภาคม 2560.

ภูษิต สายแวว, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และอนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา. *การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังในถัง ปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด*. สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน, ศูนย์ความเป็นเลิศด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมี และวัสดุขั้นสูง สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์.

มัณฑนา โคติบุญโล. 2545. การออกแบบระบบให้อากาศของถังหมักแบบหมุนสำหรับการหมักแบบแห้ง. ปริญญานิวศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มยุรา ศรีกัลยานุกูล, ฐปน ชื่นบาล, ศิราภรณ์ ชื่นบาล และไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน. *การผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อราจากน้ำทิ้งโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ.* มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

มูรนีย์ บริบูรณ์สุข. 2557. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน.

สัญทัศน์ สินจรูญศักดิ์. 2553. *การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสโดยเชื้อรา Bacillus subtilis และการใช้ประโยชน์ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม*. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมใจ ศิริโภค. 2537. *เทคโนโลยีการหมัก*. กรุงเทพมหานคร, ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุภัตรา โอกระโทก. 2556. *ผลของการใช้กากมันสำปะหลังหมักด้วยเชื้อรา Aspergillus oryzae เพื่อเป็นอาหารในไก่ไข่*. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

อภิวิชญ์ ทองแก้วยวน และธนัญชนก ไชยรินทร. 2559 . การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ในสภาพการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง. ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Ali, A., Kh, H.Q. and Zulkali, M.M.D. 2011. Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation: A Review. School of Bioprocess Engineering, University Malaysia Perlis, Malaysia.

Ben C.F. 2013. Modeling and optimization of cellulase production by *Trichoderma reesei* for lignocellulosic biorefineries. Direction Chemical and Physical chemical apply.

Bhat, M.K. 2000. *Cellulase and related enzymes in biotechnology*. Food Materials Science Division, Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich.

Chisti, Y. 1999. Fermentation (industrial). Department of Chemical Engineering, University of Almeria, Spain

Couto, R.S. and Sanroman, A.M. 2006. *Application of solid-state fermentation to food industry A review*. Journal of Food Engineering.

Klein, D.W., Lansing, M., Harlay, .J. 2004. *Microbiology* . New York: McGraw-Hill

Narumon, S. 2008. *Effects of dried coconut meal in the diet on growth performance of broilers*. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University.

Pandey, A. (2003). *Solid-state fermentation*. Journal of Biochemical Engineering.

Tokuoka, M., Sawamura, N., Kobayashi, K. andMizuno, A., J. 2010. *Simple metabolite extraction method for metabolic profiling of the solid-state fermentation of Aspergillus oryzae*. Journal of Bioscience and Bioengineering.

Yang, Z., Zhang, B., Chen, X., Bai, Z. and Zhang, H. 2008. *Studies on pyrolysis of wheat straw residues from ethanol production by solid-state fermentation.* Journal ofAnalytical and Applied Pyrolysis. Department of Chemical Engineering, university of Almeria, Spain.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต จากบทที่ 6

ภาคผนวก ข สรุปการใช้จ่ายเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต จากบทที่ 6

Bioresources and Bioprocessing

Using Banana Peel as a Substrate for Citric Acid Production by Aspergillus niger in an Air-jacketed Packed Bed Bioreactor

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Using Banana Peel as a Substrate for Citric Acid Production by Aspergillus niger in an Air-jacketed Packed Bed Bioreactor
Article Type:	Research
Funding Information:	National Research Council of Thailand (2560A11802042) Dr. Teerin Chysirichote
Abstract:	This research aimed to investigate the appropriate conditions of citric acid (CA) production by the solid-state fermentation (SSF) of Aspergillus niger (A. niger) on banana peel (BP) in a packed bed bioreactor (PBB). Firstly, the optimum initial pH of the BP and the aeration rate were studied by conducting SSF in a 250 mL flask and 2 L glass column, respectively. It was found that the initial pH of the BP and aeration rates affected the CA production. The results showed that the initial pH of 5.0 and 1.0 vvm aeration were appropriate for the CA production of A. niger using BP as a substrate. The problem of heat accumulation was found when applying the optimum condition to the SSF of the CA production in the 20 L PBB, which caused a decrease in the CA production compared to that of the glass column. The air jacket constructed to the PBB to remove the heat during the SSF helped increase the CA production from that in the PBB. The maximum CA production in the 20L air-jacketed PBB was 124.0±19.2 mg/g dry substrate .
Corresponding Author:	Teerin Chysirichote King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang THAILAND
Corresponding Author E-Mail:	teerin.ch@kmitl.ac.th
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Teerin Chysirichote
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Teerin Chysirichote Chanapong LEANGLOILERT Sudarat SUJARITPUKDEE Aniwat SUWANNARAT
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	
Suggested Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข สรุปการใช้จ่ายเงิน

สัญญาเลขที่ A118-0361-004 ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2560 ถึงวันที่ 31 กันยายน 2562

ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทเงินอุดหนุนทั่วไป (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

รายงานสรุปการเงิน

ชื่อโครงการ: กระบวนหมักเปลือกกล้วยซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการแปรรูปอาหารเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger*
(Fermentation of banana peel by-product from food processing for citric acid production by *Aspergillus niger*)

ชื่อหัวหน้าโครงการ: นางสาวธีรินทร์ ฉายศิริโชติ

สรุปรายจ่ายในโครงการ

รายการ	รายการรับ - จ่าย		
	รับ	จ่าย	คงเหลือ
งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติ (ตามแผน)	420,000.00		
จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 1 = 85%)	357,000.00		0.00
จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 2 = 15%)	63,000.00		0.00
หัก ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 1)		289,405.98	
ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 2)		45,088.44	
ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 3)		85,505.58	
งบประมาณคงเหลือ	420,000.00	420,000.00	**0.00**

จำนวนเงินที่ได้รับ รายจ่าย และจำนวนเงินคงเหลือแต่ละงวด และสะสม

หมวด (ตามสัญญา)	รายจ่าย งวดที่ 1 (1)	รายจ่าย งวดที่ 2 (2)	รายจ่าย งวดที่ 3 (3)	รายจ่าย สะสม (4)	งบประมาณ ที่ตั้งไว้ (5)	งบประมาณ คงเหลือ/ เกิน (6)=(5)-(4)
งบบุคลลากร	71,760.00	23,920.00	23,920.00	119,600.00	119,600.00	0.00
งบดำเนินการ	217,645.98	21,168.44	121,671.58	300,400.00	300,400.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ นางสาวธีรินทร์ ฉายศิริโชติ
Miss Teerin Chysirichote
2. เลขประจำตัวประชาชน 3 1018 01548 408
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
1 ถนนฉลองกรุง 1 แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กทม.10520
โทรศัพท์ที่ทำงาน: 02-329-8356 ต่อ
โทรสาร 02-329-8356 ต่อ 13
E-mail: kcteerin@kmitl.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา	คุณวุฒิ และสถาบัน
2556	ปริญญาเอก (Doctor of Engineering, Chemical Engineering) Tokyo Institute of Technology, Tokyo
2553	Research student (6 months) Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan
2549	ปริญญาโท (วศ.ม. วิศวกรรมอาหาร) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ
2546	ปริญญาตรี (วท.บ. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

6. ประสบการณ์การทำงานวิจัย
   6.1 ชื่อโครงการ: “การพัฒนาศักยภาพของผู้ประกอบการขนาดเล็กและขนาดกลางในกลุ่มอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอื่นที่เกี่ยวข้อง : ผู้ประกอบการน้ำพริกแกง แกงส้ม และแกงกะทิ (กลุ่มที่ 2), สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.), 2560.
   6.2 ชื่อโครงการ: “โครงการ “รูปแบบการเติมอากาศในถังหมักประเภท packed bed ในการผลิตสารสีของเชื้อรา Monascusด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง”, ทุนคณะวิศวกรรมศาสตร์ สจล. ประจำปี 2558
   6.3 ชื่อโครงการ: “การพัฒนากระบวนการผลิตข้าวพร้อมรับประทานในถุงรีทอร์ทเพาช์”, ทุนคณะวิศวกรรมศาสตร์ สจล. ประจำปี 2557
7. ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์
   7.1 ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่
   1) Chysirichote, T., Pakaweerachat, P. (2018). Ultrasonic-assisted extraction of gallic acid and isoquercetin from aspergillus Niger fermented tri-phala waste. MATEC Web of Conferences 192,03007.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) Chysirichote, T. (2018). Cellulase production by Aspergillus Niger ATCC 16888 on copra waste from coconut milk process in layered packed-bed bioreactor. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 32(2): 267-274.

3) Kittanan, T., Nareerat, L., Sawwanit, K., Teerin, C. (2018). Uses of copra waste and wheat bran for cellulase production by trichoderma reesei in solid state fermentation. ACM International Conference Proceeding Series pp. 56-59.

4) Wattanasiriwit, W. and Chysirichote, T. (2016). Effect of Curry Compositions on Process Time of Commercial Sterilization and Physical Properties of Curry in Retort Pouch. The 8th International Science, Social Science, Engineering and Energy Conference 15 - 17 March, 2017, The A-ONE Royal Cruise Hotel, Pattaya Beach, Thailand, 21-26.

5) Pattarabhorn, P. and Chysirichote, T. (2016). Preparation of Tri-phala waste for gallic acid production by solid state fermentation from Aspergillus niger ATCC 16888. The 9th TSAE International Conference, September 8-10, IMPACT Exhibition Center, Pak Kret, Thailand, 70-75.

6) Chysirichote, T. and Phongpipatpong, M. (2015). Effect of sterilizing temperature on physical properties of rice porridge mixed with legumes and job's tear in retortable pouch. Journal of Food Processing and Preservations, 39: 2356-2360.

7) Chysirichote, T. (2015). Effect of different amino acid for growth and pigmentation of Monascus on rice starch solid surface medium, Proceeding of the 4th International Conference on Life Science & Biological Engineering, 4 - 6 November, ANA Crowne Plaza hotel, Nagoya, Japan, 30-34.

8) Chysirichote, T. (2015). Effect of aeration mode on the red pigment production by Monascus ruber on rice during fermenting in the packed bed bioreactor, Proceeding of the 6th International on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, 29 – 31 July, Centara hotel & convention center, Khon Kaen, Thailand, 22-28.

9) Chysirichote, T., Reiji, T., Asami, K. and Ohtaguchi, K. (2013). Effects of starch and protein on glucosamine content in the biomass of Monascus ruber, Journal of Chemical Engineering of Japan, 46(10), 695–698.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Using Banana Peel as a Substrate for Citric Acid Production by *Aspergillus niger* in an Air-jacketed Packed Bed Bioreactor

Teerin CHYSIRICHOTE*, Chanapong LEANGLOILERT, Sudarat SUJARITPUKDEE, Aniwat SUWANNARAT

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, 1 Chalongkrung 1, Chalongkrung Rd., Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

* Corresponding author:
E-mail address: teerin.ch@kmitl.ac.th,
Tel: +66-2329-8356 Ext.12, Fax: +66-2329-8356 Ext.13

Abstract

This research aimed to investigate the appropriate conditions of citric acid (CA) production by the solid-state fermentation (SSF) of *Aspergillus niger* (*A. niger)* on banana peel (BP) in a packed bed bioreactor (PBB). Firstly, the optimum initial pH of the BP and the aeration rate were studied by conducting SSF in a 250 mL flask and 2 L glass column, respectively. It was found that the initial pH of the BP and aeration rates affected the CA production. The results showed that the initial pH of 5.0 and 1.0 vvm aeration were appropriate for the CA production of *A. niger* using BP as a substrate. The problem of heat accumulation was found when applying the optimum condition to the SSF of the CA production in the 20 L PBB, which caused a decrease in the CA production compared to that of the glass column. The air jacket constructed to the PBB to remove the heat during the SSF helped increase the CA production from that in the PBB. The maximum CA production in the 20L air-jacketed PBB was 124.0±19.2 mg/$g_{\text{dry substrate}}$.

Keywords: Citric acid, Solid-state fermentation, Packed bed bioreactor, *Aspergillus niger*, Banana peel

Introduction

Banana is an important economic crop of Thailand. Various forms of production of banana products have resulted in their residue. One of the residues is banana peel (BP), which is generally used as a raw material for compost (Elnour et al. 2015) and animal feed (Tchobanoglous et al. 1993); moreover, one banana contains around 40% of peel as a residue (Haryanto et al. 2016). In addition, many researchers have studied the uses of by-products or residue from agriculture and food processing for citric acid (CA) production; for instance, the solid-state fermentation (SSF) of peat moss (Barrington and Kim 2008) in an aerated glass column yielding CA of up to 12.4%. CA has been applied for various functions in many industries; such as, a flavor enhancer, blood preservative, and anti-form agent in the food, medical and chemical industries, respectively (Kuforiji 2010). Even if the fermentation of CA has been conducted by different methods; such as, a solid-state, submerged and surface (Show et al. 2015), most commercial CA production has been produced by a submerged fermentation of *Aspergillus niger* (*A. niger)* due to the easiness of the parameter controls in spite of the high costs of the construction equipment and support to continue the process (Mienda and Idi 2011; Pallares et al. 1996; Kumar et al.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2003). However, many research studies have evidently shown the suitability of SSF in CA production over submerged fermentation (Leangon et al. 2002) and suggested that SSF was useful for CA production from agricultural and food wastes. Karthikeyan and Sivakumar (Karthikeyan and Sivakumar 2010) produced up to 18% of CA by the SSF of *A. niger* in a tray fermenter with a 2 cm thickness bed of BP, which its optimum initial pH was 3.0. In contrast, Abdel-Rahim and Arbab (1985) reported that the fungal spore germination was suppressed at a pH lower than 3.5. Recently, Hou and Bao (2018) found that the requirement for oxygen in the SSF by *A. niger* proved to be satisfactory for the production of CA.

The purpose of this research was to study the appropriate conditions of CA production by the SSF of *A. niger* on BP using a packed bed bioreactor (PBB), which oxygen could be supplied by aeration. Even if a PBB was simple and cheap to operate, a method to remove the accumulated heat during the SSF, which was a main problem (Pandey et al. 2008), still required a scale-up. Many researchers have conducted studies to remove the heat and control the temperature during the SSF; such as, using an internal cooling plate (Mitchell et al. 2006), injecting cool dry air together with moisture (Gutiérrez-Rojas et al. 1996), covering the PBB with a water jacket (Shojaosadati et al. 2007) and dividing the bed into multilayers (Chysirichote 2018). This research also examined removing more heat in the general PBB by constructing an air jacket to the PBB to improve the CA production.

Materials and Methods

Preparation of the banana peel

Banana peel (green with a yellow trace) supplied from Lankathitong Company, a banana supplier for the food industry, was cut into 1x1 cm^2 and dried at 80°C for six hours. Then, its moisture content was adjusted to 60% w.b. by 0.1 and a 1.0 M H_2SO_4 solution at various pH values to achieve the desired pH of the substrate. The banana peel was sterilized by autoclaving at 121°C for 20 minutes before SSF. To study the optimum initial pH of the banana peel, the pH was adjusted to 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0, respectively. Then, the obtained optimum pH for the CA production was used to study the effect of the aeration rate on the CA production. Acid degradation during thermal sterilization causing an increasing initial pH of the BP (Babitha et al. 2007) was avoided by studying the relationship between the pH value of the H_2SO_4 solution obtained before and after the thermal sterilization at 121°C for 20 minutes. The pH value of the prepared acid solution was calculated using Equation 1 (refer below) to achieve the target initial pH of the BP for the SSF.

$$\text{pH value}_{\text{after thermal sterilization}} = (1.108 \times \text{pH value}_{\text{before thermal sterilization}}) \quad (1)$$

Preparation of the spores of *A. niger*

A. niger ATCC 16888 was cultured on a potato dextrose agar (PDA) medium and incubated at 30°C for three days then the spores were collected by sterilized water. The number of spores in the suspension was counted using a hemocytometer under a microscope (40X magnification). The concentration of the suspension was adjusted to 10^8 spores/mL.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SSF for the CA production

Prepared banana peel was mixed with the spore suspension of $1x10^5$ spores/g dry substrate. The mixture was then placed in three bioreactors (250 mL Erlenmeyer flask, 2 L glass column and 20 L packed bed bioreactor) and incubated at 30°C for five days. To conduct the SSF in the flask, a 25 g mixture was put into a 250 mL flask (five flasks for one test) and closed with cotton balls. During incubating, one flask was selected every day until the fifth day to analyze the CA production. Then, the optimum pH of BP obtained from the SSF in the flask (pH 5.0) was used to study the effect of aeration rate in the 2 L glass column by placing a 300 g mixture in the 10 cm diameter glass column (25 cm in height) and aerated with 30°C of sterilized air from the bottom at 0.1, 0.5, 1.0 and 1.5 vvm (refer to Figure 1). About 25 g of the fermented solution was collected every day until the fifth day to analyze the CA production. Furthermore, the oxygen concentration of air in the column was monitored during the SSF using the oxygen detector (Model SAO2-100, Bestone, China) set in the column to prevent any interruption during the sampling. Also, SSF was conducted in a 20 L packed bed bioreactor (PBB) to study a feasibility to apply the studied optimum initial pH of the BP and aeration rate in the larger bioreactor. A 3.5 kg mixture (pH 5.0) was placed in the bioreactor (refer to Figure 2) and 30°C of air was forced from the bottom at 1.0 vvm. Temperatures at the center of the bed and at the outlet of the air of both the PBP and jacketed PBP were monitored during the SSF using the thermocouples Type T (1.5 mm diameter) connected to the data logger (Model 34970A, Key-sight Technologies, USA). The oxygen detector (Model SAO2-100, Bestone, China) was used to measure the oxygen concentration in the bioreactors during the SSF.

Design and construction of an air-jacketed packed bed bioreactor

The air-jacketed PBB was made of aluminium (0.3 mm thickness) due to its strength and high heat transfer coefficient. The 20 L double-jacketed was designed to contain about 7-8 L of the substrate for the SSF (refer to Figure 2). The height and diameter of the external jacket were 50 and 45 cm, respectively whereas the internal ones were 30 and 30 cm, respectively. SSF was performed in the internal chamber. The temperature of the air forced for the SSF was controlled by passing the air through a 50 cm copper tube immersed in a 30°C water bath before passing an adjustable gas rotameter (Model K-1011, Nitto Denko Corporation, Japan) and a PTFE membrane (Millex®-FG, Millipore corporation, USA) for sterilization. Additionally, the air was forced to the substrate through the cone to achieve the uniformity of the air velocity through the substrate. A polystyrene insulator was installed at the internal surface of the external jacket to avoid the heat transfer between the surroundings and air in the jacket. Since the air in the jacket was used to absorb the heat generated during the SSF in the PBB, its temperature was adjustable depending on the temperature in the PBB. The temperature sensor measured the temperature of the outlet air of the PBB connected to a temperature controller (Model EW-988H, Ewelly, China), which set the point at 30°C and commanded a heater (200 watts, Sobo, China) to heat the air to a temperature of 25°C before forcing it into the jacket.

Analysis of the citric acid

Citric acid was extracted from the fermented BP, which was known for its moisture content by the modified method of Karthikeyan (11). A 5 g sample was soaked and stirred in 50 mL of deionized water at 150 rpm at 22°C for one hour and analyzed using a Megazyme citric acid kit (Megazyme International, Ireland) for the citric acid quantification. The consumption of the nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) was spectrophotometrically monitored by detecting the decrease in the absorbance at 340 nm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

by using the UV- visible spectrophotometer (Model Genesys 10S, Thermo Fisher Scientific, USA). The CA production was calculated and reported as milligrams in one gram of dry substrate (mg/g_{DS}).

Results and Discussion

Effect of the initial pH of the banana peel on the citric acid production

Figure 3 shows that the highest CA production was obtained in the SSF of the BP with the initial pH value of 5.0 at Day 3 as 34.6±2.9 mg/g_{DS}, which the highest rate was found between Day 2 to Day 3 as 24.1±2.1 mg/g_{DS} /d. The citric acid production was the lowest when the initial pH of the BP was lower in contrast to the results in the submerged fermentation (Lee et al. 2005) using sugar as a carbon source. However, Lingappa et al. (2007) suggested that the initial pH of the carob pod extract for the CA production in the submerged fermentation was 5.5, and the production decreased as the initial pH of the medium decreased. The types of the carbon sources were able to be more important than the initial pH since most carbon sources in the BP were polysaccharides consisting of cellulose, hemicellulose and starch (Emaga et al. 2011; Wachirasiri et al. 2009), which required specific hydrolytic enzymes. The CA production in this research was the highest at the initial pH of 5.0 since it was suitable for the activities of cellulase, xylanase and amylase/glucosidase (Naseeb et al. 2015; Ncube et al. 2012; Chimata et al. 2011; Gutiérrez-Rojas et al. 1996), which were essential to obtain monosaccharides from the BP for fungal metabolisms. Furthermore, the importance of the glucose supply rate was mentioned in the study of Wang et al. (2017). Moreover, Lopez-Malo et al. (1997) reported that the optimal pH values for the germination of *A. niger* were acidic in the range of 4.0 and 6.0. The optimum initial pH of BP (pH 5.0) obtained from this experiment was used to study the effect of aeration rate on the CA production in a packed-bed type of bioreactor.

Effect of the aeration rate on the citric acid production in the 2 L glass column

The CA production shown in Figure 4(A) indicated that the CA production in the SSF with 1.0 vvm was the highest at Day 3, as 133.1±11.8 mg/g_{DS} was slightly higher than that of 0.5 vvm (120.0±7.4 mg/g_{DS}). This greatly decreased when the aeration increased to 1.5 vvm as 53.2±6.0 mg/g_{DS} because the moisture content of the bed was reduced since Day 1 to around 55%, which was suitable for fungal growth but inappropriate for the CA production (Pallares et al. 1996) (refer to Figure 4(B)). The excessive aeration caused the insufficient CO_2 for pyruvate decarboxylase to have importance for citrate formation (Max et al. 2010). The lowest CA production found in the SSF with 0.1 vvm showed that this level of aeration could not supply enough oxygen for the tricarboxylic acid (TCA) cycle or CA production because the oxygen concentration was reduced below 15.0% (refer to Figure 4(C)) while the other aeration rates provided around 18.0% of oxygen in the bioreactor. In addition, this was not sufficient enough to remove the CO_2, which was detrimental for the citrate and biomass production (Mclntyre and Mcneil 1997).

Scaling-up of the CA production in a 20 L packed bed bioreactor

Both the obtained initial pH of 5.0 and aeration rate of 1.0 vvm were applied for the CA production of *A. niger* in the 20 L packed bed bioreactor (PBB). Figures 5(A) and (B) indicated that even if the oxygen supply and oxygen concentration in the PBB were the same, the CA production would be different. Furthermore, the decreasing CA production in the PBB was found compared to the result in the glass column (refer to Figure 4(A)).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This occurred due to the accumulated heat during the SSF leading to the increase of the bed temperature (refer to Figure 5(C)) presenting the temperature of the bed to be 42°C at Day 2 or an increase of 12°C from the optimum temperature of 30°C. Installing the air jacket around the exterior of the PBB (air-jacketed PBB) to solve the problem of heat accumulation decreased the rising temperature from 12°C to 7°C and slowed the temperature increase from Day 2 to Day 3. Consequently, the maximum CA production in the air-jacketed PBB (124.0±19.2 mg/g_{DS}) on Day 2 was much higher than that in the PBB (54.9±7.1 mg/g_{DS}) on Day 3. Moreover, Figures 5(A) and 4(A) showed similarities between the CA production in the air-jacketed PBB and in the glass column, respectively since the SSF was conducted with the same conditions (initial pH of 5.0; 1.0 vvm). This clearly indicated that the main factor of scaling-up was the temperature control. In case that the bed temperature could be controlled, the conditions of the initial pH of BP and aeration rate were suitable for the CA production of *A. niger* on the BP in larger scales. The air-jacket construction was an alternative way to increase a heat removal from the bed.

Conclusion

The optimum initial pH of substrate and aeration rate for citric acid (CA) production of *A. niger* by solid state fermentation (SSF) using banana peel as a substrate were pH 5.0 and 1.0 vvm aeration which were studied using the 250 flask and the 2 L glass column, respectively. The initial pH of banana peel and aeration rate which were obtained in this research were used for scaling up the CA production in the PBB in case that the temperature of bed was not over than 38°C.

List of abbreviations

CA	Citric acid
BP	Banana peel
SSF	Solid state fermentation
PBB	Packed bed bioreactor
DS	Dry substrate

Acknowledgement

The authors are grateful to King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for the financial support [2560A11802042]. Also, we would like to thank Plean banana group and Lankatitong shop for supporting banana peel for this research.

Authors' contributions

TC conducted the research as a main researcher and wrote the manuscript. CL, SS and AS were participated this research as the research assistants. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

This work was financially supported by the National Research Council of Thailand (NRCT) which contributed to King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang [2560A11802042].

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request. All the figures in the manuscript have been drawn by the authors themselves.

Ethics approval and consent to participate

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Consent for publication

All of the authors have read and approved to submit it to bioresources and bioprocessing.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

Abdel-Rahim AM, Arbab HA (1985) Factors affecting spore germination in *Aspergillus niger*. Mycopathologia 89(2): 75–79

Babitha S, Soccol CR, Pandey A (2007) Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. Bioresourc Technol 98: 1554-1560

Barrington S, Kim JW (2008) Response surface optimization of medium components for citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in peat moss. Bioresourc Technol 99(2): 368-377

Chimata MK, Chetty CS, Suresh C (2011) Fermentative production and thermostability characterization of α amylase from *Aspergillus* species and its application potential evaluation in desizing of cotton cloth. Biotechnol Res Int. Doi:10.4061/2011/323891

Chysirichote T (2018) Cellulase production by *Aspergillus niger* ATCC 16888 on copra waste from coconut milk process in layered packed-bed bioreactor. Chem Biochem Eng Q 32(2): 267-274

Elnour M, Abdelgadir AE, Saeed BEAE (2015) Effects of banana compost on growth, development and productivity of sorghum bicolor cultivar (Tabat) council for innovative research. J Adv Biol 8(2): 1554-1561

Emaga TH, Bindelle J, Agneesens R, Buldgen A, Wathelet B, Paquot M (2011) Ripening influences banana and plantain peels composition and energy content. Trop Anim Health Prod 43: 171–177

Gutiérrez-Rojas M, Amar Aboul Hosn S, Auria R, Revah S, Favela Torres, E (1996) Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. Process Biochem 31(4): 363-369

Haryanto A, Miharja K, Wijayanti N (2016) Effects of banana peel meal on the feed conversion ratio and blood lipid profile of broiler chickens. Int J Poult Sci 15(1): 27-34

Hou W, Bao J (2018) Simultaneous saccharification and aerobic fermentation of high titer cellulosic citric acid by filamentous fungus *Aspergillus niger.* Bioresourc Technol 253: 72-78

Karthikeyan A, Sivakumar N (2010) Citric acid production by Koji fermentation using banana peel as a novel substrate. Bioresourc Technol 101: 5552–5556

Kuforiji N (2010) Orange and pineapple wastes as potential substrates for citric acid production. Int J Plant Biol 1(1): 1-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kumar D, Jain VK, Shanker G, Srivastava A (2003) Utilization of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation. Proc Biochem 38: 1725-1729

Leangon S, Maddox I, Brooks J (2002) A proposed biochemical mechanism for citric acid accumulation by *Aspergillus niger* Yang No.2 growing in solid state fermentation. W J Microbiol Biotechnol 16: 271-275

Lee SY, Zakry FAA, Show PL (2015) Optimization of citric acid production from a novel strain of *Aspergillus niger* by submerged fermentation. Chem Eng Trans 45: 1501-1506

Lingappa KL, Pramod T, Ali SI (2007) Influence of pH on citric acid production by *Aspergillus niger* under submerged fermentation in carob pod extract. J Sci Ind Res India 66(8): 618-620

Lopez-Malo A, Alzamora SM, Argaiz A (1997) Effect of vanillin concentration, pH and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* growth. Food Microbiol 14(2): 117-124

Max B, Salgado JM, Rodríguez N, Cortés S, Converti A, Domínguez JM (2010) Biotechnological production of citric acid. Braz J Microbiol 41: 862-875

Mclntyre M, Mcneil B (1997) Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth, and citrate production in *Aspergillus niger* A60. Enzyme Microb Technol 20(2): 135-142

Mienda BS, Idi A (2011) Microbiological features of solid state fermentation and its applications. An overview. Res J Biotech 2(6): 21-26

Mitchell DA, Krieger N, Berovic M (2006) Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany

Naseeb S, Sohail M, Ahmad A, Khan SA (2015) Production of xylanases and cellulases by *Aspergillus fumigatus* MS16 using crude lignocellulosic substrates. Pak J Bot 47(2): 779-784

Ncube T, Howard RL, Abotsi EK, Jansen van Rensburg EL, Ncube I (2012) *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. Ind Crop Prod 37: 118–123

Pallares J, Rodriguez SS, Sanroman A (1996) Citric acid production in submerged and solid state culture of *Aspergillus niger.* Bioprocess Eng 15(1): 31-33

Pandey A, Soccol CR, Larroche C (2008) Current development in solid-state fermentation. Springer, New Deli

Shojaosadati SA, Hamidi-Esfahani Z, Hejazi P, Vasheghani-Farahani E, Rinzema A (2007) Evaluation of strategies for temperature and moisture control in solid state packed bed bioreactors. Iran J Biotechnol 5(4): 219-225

Show PL, Oladele KO, Siew QY, Zakry FAZ, Lan JC, Ling TC (2015) Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. Front Life Sci 8(3): 271–283

Tchobanoglous G, Theisen H, Vigil S (1993) Integrated solid waste management: engineering principles and management issues. McGraw-Hill, New York

Wachirasiri P, Julakarangka S, Wanlapa S (2009) The effects of banana peel preparations on the properties of banana peel dietary fiber concentrate. Songklanakarin J Sci Technol 31(6): 605-611

Wang B, Li H, Zhu L, Tan F, Li Y, Zhang L, Ding Z, Shi G (2017) High-efficient production of citric acid by *Aspergillus niger* from high concentration of substrate based on the staged-addition glucoamylase strategy. Bioprocess Biosyst Eng 40: 891–899

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Figures and Figure captions

Figure 1 SSF in the glass column.

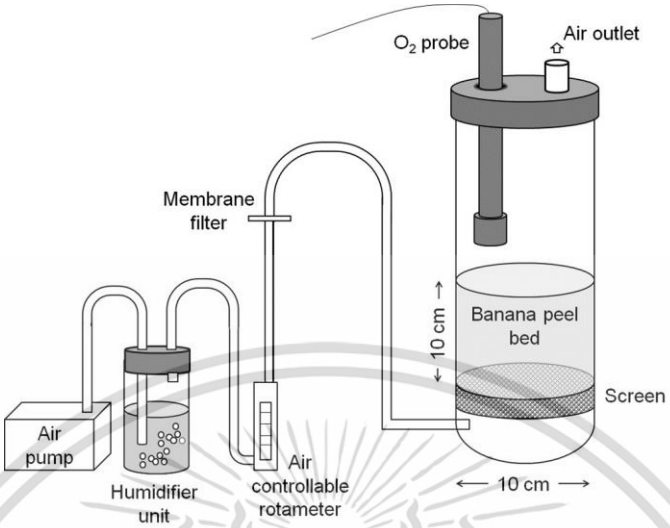


Figure 2 Design of the air-jacketed packed bed bioreactor.

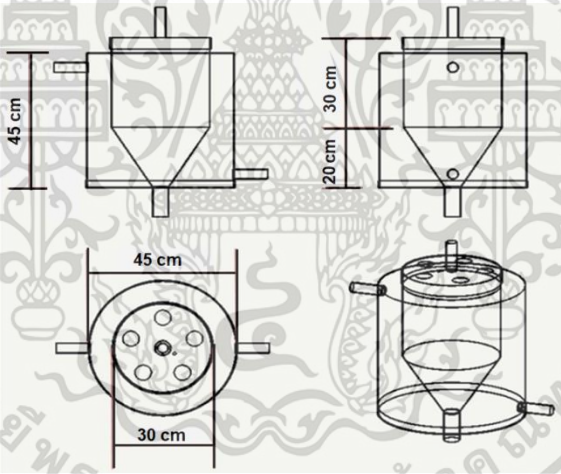
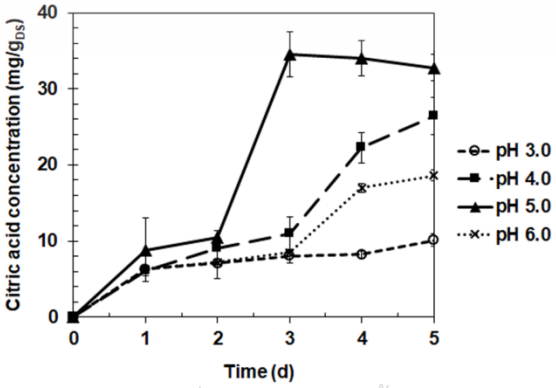
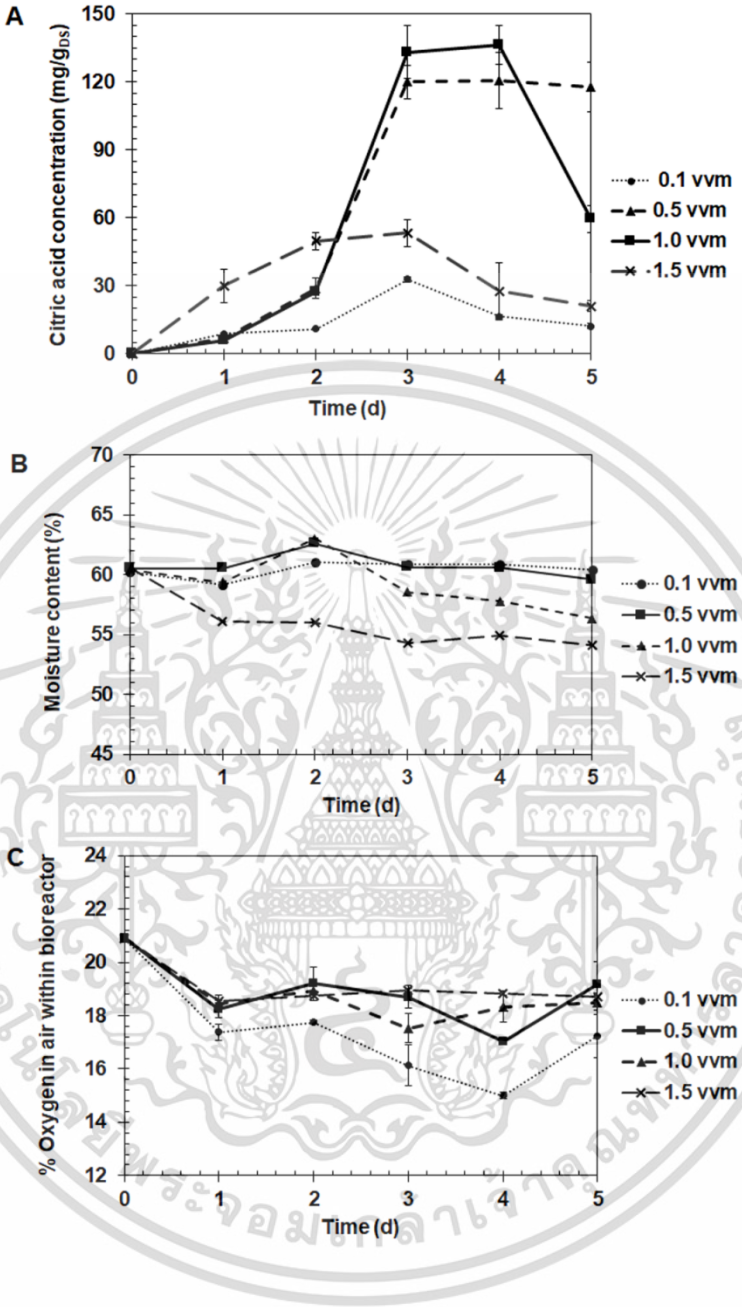


Figure 3 Citric acid production from the SSF of different initial pH of the banana peel.



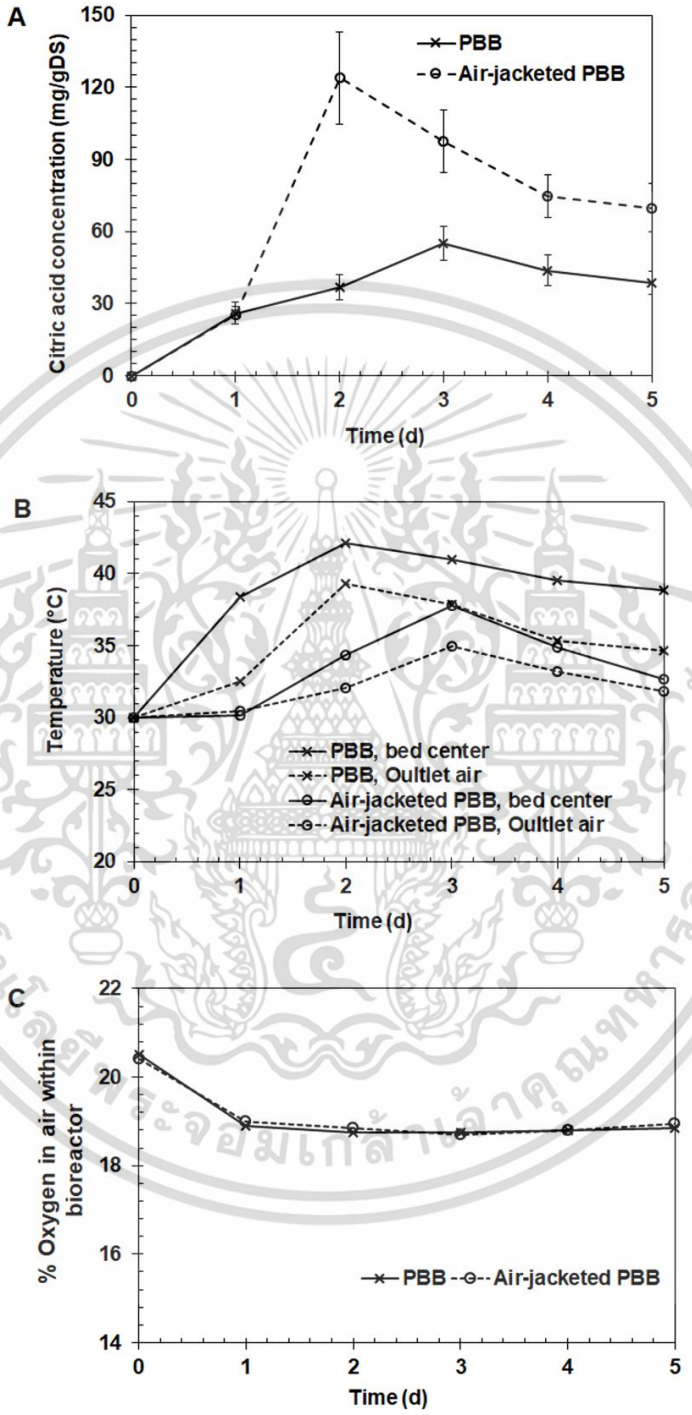
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Figure 4 SSF of the banana peel in the 1 L glass column at different aeration rates. (A) citric acid production. (B) moisture content of beds. (C) oxygen concentration.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Figure 5 SSF of the banana peel in the 20 L packed bed bioreactors at 1.0 vvm aeration. (A) citric acid production. (B) oxygen concentration in the air inside the bioreactor. (C) temperatures of the bed and outlet air in the bioreactors. PBB represents the packed bed bioreactor.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้