สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะของชนิดน้ำตาลและความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการผลิตกรดซิตริก โดย *Aspergillus niger*

นางสาวกรรณิการ์ วรพฤกษ์จารุ
นางสาวนันทนา ธีรวัฒน์เสถียร
นางสาวเสาวลักษณ์ วิริยะสมบัติสกุล

ว.พ.
ก ๒๖๓ ก
เลขหมู่ 2534
เลขทะเบียน 612525668
วัน,เดือน,ปี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2534

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A Study of Sugar Type and Suitable Sugar Concentration for Citric Acid Production by Aspugillus niger

Miss Kannika Woraprukjaru

Miss Nuntana Teerawatsathien

Miss Saowaluk Wiriyasumbatsakul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Reguirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ludkrabang

1991

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้าอนุมัติ

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาสภาวะของชนิดน้ำตาลและความเข้มข้นของน้ำตาล
ในการผลิตกรดซิตริก โดย *Aspergillus niger*

โดย นางสาวกรรณิการ์ วรพฤกษ์จารุ
นางสาวนันทนา ธีรวัฒน์เสถียร
นางสาวเสาวลักษณ์ วิริยะสมบัติสกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

(อาจารย์เนาวรัตน์ ปานแย้ม) หัวหน้าภาค
คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(อาจารย์เนาวรัตน์ ปานแย้ม) ประธานกรรมการ

(ผศ. สุขใจ ชูจันทร์) กรรมการ

(อาจารย์วรรณา พรเศรษฐคุณ) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาสภาวะชนิดของน้ำตาลและความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการผลิตกรดซิตริก โดยเชื้อ *Aspergillus niger*

นักศึกษา นางสาวกรรณิการ์ วรพฤกษ์จารุ

นางสาวนันทนา ธีรวัฒน์เสถียร

นางสาวเสาวลักษณ์ วิริยะสมบัติสกุล

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2534

บทคัดย่อ

กรดซิตริกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญมากในทางอุตสาหกรรมหลายชนิด จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกันมาก คือ *Aspergillus niger* จึงได้มีการศึกษาปรับปรุงสายพันธุ์ *A. niger* อยู่เสมอ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุด ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาสภาวะชนิดน้ำตาลและความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการผลิตกรดซิตริกของเชื้อ *A. niger* คือ *A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance เปรียบเทียบกับ *A. niger* wild type สายพันธุ์ ATCC 11414 โดยทำในระดับ shaker ที่ 250 rpm. ปริมาณอาหารที่ใช้ 50 ml. ควบคุม pH เริ่มต้นเป็น 3 ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิห้องน้ำตาลที่ใช้ได้แก่ ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส แลคโตส และ กลีเซอรอล โดยน้ำตาลแต่ละชนิดใช้ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% และ 2.5% น้ำตาลทุกชนิดทำการกำจัดอิออนต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ออกโดยวิธี Ion exchange resin ใช้ Dowex 50

จากการศึกษานี้พบว่า สภาวะและชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก คือ น้ำตาลซูโครส 14% ซึ่งเชื้อ *A. niger* wild type , *A. niger* PFK

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

transformance และ*A. niger* PKI transformance ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถผลิตได้ในปริมาณที่สูงสุดคือ 185.89% , 121.01% และ 76.51% ตามลำดับ โดยระยะเวลาที่เชื้อผลิตได้สูงสุดอยู่ในช่วง 10-14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title A Study of Type and Sugar Concentration For citric acid production by *Aspergillus niger* mutant

Name Miss Kannika Worapukjaru
Miss Nuntana Teerawatsathien
Miss Saowaluk Wiriyasumbutsakul

Special Project Advisor Asst. Prof. Sukjai Choojun

Department Applied Biology

Acadamic Year 1991

Abstract

Citric acid is organic acid which is important in many industrial process. The filamentous fungus *Aspergillus niger* is used today for the manufacture of citric acid. However,the methods by which strains are selected for constant or improved citric acid yield . For this study is a study condition of type and concentration of sugar for citric acid production by *Aspergillus niger* (*A. niger* PFK transformance and *A. niger* PKI transformance compared with *A. niger* wild type ATCC 11414). On a rotary shaker at 250 rpm , the medium was distensed in 50 ml. volume in 250 ml. wide-mouthed conical flasks , the pH was adjusted to 3.0 with H_2SO_4 and incubated at room temperature (25-29 C). By vary carbon sources :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sucrose glucose fructose lactose and glycerol, each of carbon sources must be varied by concentration : 14% , 10% , 7.5% , 5% and 2.5% . The solution of carbon source was passed through a cation exchange resin (Dowex 50)

The best condition of type and concentration of sugar for citric acid production by *A. niger* wild type , *A. niger* PFK transformance and *A . niger* PKI transformance is 14% sucrose. The highest yields are 185.89%, 121.01% and 76.51% respectively. The incubation period for highest yields are 10-14 days.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งได้เสียสละเวลาอันมีค่า ให้คำแนะนำตลอดจนดูแลเอาใจใส่ตลอดเวลาที่ทำโครงงานนี้ และได้รับความอนุเคราะห์เชื้อ *Aspergillus niger* wild type สายพันธุ์ ATCC 11414 และ *Aspergillus niger* mutant จาก M. Rohr และ C.P. Kubicek นอกจากนี้ยังมี อาจารย์เนาวรัตน์ ปานแย้ม ซึ่งได้ให้ความสะดวกในด้านสถานที่ที่ใช้ในการทดลอง ตลอดจนเจ้าหน้าที่ และนักศึกษาภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ซึ่งได้ให้ความช่วยเหลือและความสะดวกต่าง ๆ โครงงานนี้จะสำเร็จผลไปไม่ได้ถ้าขาดท่านเหล่านี้ ดังนั้น ทางคณะผู้จัดทำ ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

คณะผู้จัดทำ

3 มีนาคม 2535

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
2.1 ความเป็นมาของกรดซิตริก	4
2.2 คุณสมบัติของกรดซิตริก	5
2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดซิตริก	5
2.4 การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์	7
2.5 กระบวนการหมักกรดซิตริก	10
2.6 ขบวนการชีวเคมีของกรดซิตริก	13
2.7 เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสะสมกรดซิตริก	16
2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก	19
2.9 การผลิตกรดซิตริกเป็นการค้า	25
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	34
4.1 ความสามารถในการผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* wild type *A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance เปรียบเทียบในน้ำตาลระดับต่าง ๆ	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4.2 ความสามารถในการผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* wild type *A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance โดยพิจารณาในแง่ชนิดน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้น 14 %	55
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	62
เอกสารอ้างอิง	64
ภาคผนวก	91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	ความสามารถในการละลายของกรดซิตริกในน้ำ	6
2-2	วิธีการกำจัดเกลือแร่ในวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ	22
2-3	ผลของเหล็กในการผลิตกรดซิตริกจาก decationized sucrose ของเชื้อ *A. niger* เมื่อเลี้ยงแบบ submerged culture	28
2-4	ผลของอิออนทองแดง และเหล็ก ในการผลิตกรดซิตริกจากกลูโคสของเชื้อ *A. niger* ใน submerged culture	29
4-1	แสดงผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ที่ได้จากการใช้น้ำตาลซูโครส ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *A. niger* wild type , *A. niger* PFK transformance และ *A.niger* PKI transformance	35
4-2	แสดงผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคส ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *A. niger* wild type , *A. niger* PFK transformance และ *A.niger* PKI transformance	40
4-3	แสดงผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ที่ได้จากการใช้น้ำตาลฟรุกโตส ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *A. niger* wild type , *A. niger* PFK transformance และ *A.niger* PKI transformance	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4-4	แสดงผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ที่ได้จากการใช้น้ำตาลแลคโตส ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *A. niger* wild type , *A. niger* PFK transformance และ *A.niger* PKI transformance	50
4-5	แสดงผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลีเซอรอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ *A. niger* wild type , *A. niger* PFK transformance และ *A.niger* PKI transformance	54
4-6	แสดงผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ที่ได้จากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 14% โดยเชื้อ *A. niger* wild type , *A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2-1	โครงสร้างทางเคมีของ citric acid	5
2-2	แสดงปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสลายกรดซิตริก	14
4-1 ก	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* wild type ซึ่งใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14%, 10%, 7.5%, 5% และ 2.5%	36
4-1 ข	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PFK transformance ซึ่งใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14%, 10%, 7.5%, 5% และ 2.5%	37
4-1 ค	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PKI transformance ซึ่งใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14%, 10%, 7.5%, 5% และ 2.5%	38
4-2 ก	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* wild type ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14%, 10%, 7.5%, 5% และ 2.5%	41
4-2 ข	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PFK transformance ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14%, 10%, 7.5%, 5% และ 2.5%	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4-2 ค	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PKI transformance ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14%, 10%, 7.5%, 5% และ 2.5%	43
4-3 ก	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* wild type ซึ่งใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14%, 10%, 7.5%, 5% และ 2.5%	46
4-3 ข	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PFK transformance ซึ่งใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14%, 10%, 7.5%, 5% และ 2.5%	47
4-3 ค	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PKI transformance ซึ่งใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14%, 10%, 7.5%, 5% และ 2.5%	48
4-4 ก	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* wild type ซึ่งใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14%, 10%, 7.5%, 5% และ 2.5%	51
4-4 ข	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PFK transformance ซึ่งใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 14%, 10%, 7.5%, 5%, 2.5%	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4-4 ค	แสดงปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PKI transformance ซึ่งใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14%, 10%, 7.5%, 5% และ 2.5%	53
4-5	แสดงเชื้อ *A. niger* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ใน PDA slant	57
4-6	แสดงลักษณะ ion exchange resin (Dowex 50)	58
4-7	แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อ *A. niger* เมื่อเลี้ยงในน้ำตาล Fructrose ที่ปราศจากมังกานีส	59
4-8	แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อ *A. niger* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี มังกานีส	60
4-9	แสดงลักษณะการเลี้ยงเชื้อในระดับ shaker	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

กรดซิตริกเป็นกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้กันมาก จากสถิติในปี ค.ศ. ๑๙๘๒ พบว่าทั่วโลกมีความต้องการกรดซิตริก ประมาณปีละ ๒๔,๐๐๐ ตัน กรดซิตริกที่ใช้อยู่ในรูปของ citric acid monohydrate และ anhydrous ประมาณร้อยละ ๖๐-๓๔ ของกรดซิตริกที่ผลิตขึ้นใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่ม เนื่องจากกรดซิตริกมีรสดี ช่วยส่งเสริมกลิ่นรสของอาหารให้ดีขึ้น และยังช่วยในการรักษาคุณภาพของอาหารประมาณร้อยละ ๑๐ ของกรดซิตริกใช้ในอุตสาหกรรมยา โดยใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดความคงตัว (stabilizer) สารให้ความเปรี้ยว (acidulant) สารรักษาเลือดไม่ให้แข็งตัว (blood preservative) ซึ่งใช้ในรูปเกลือคือ sodium citrate ส่วนที่เหลืออีกประมาณร้อยละ 15-30ใช้เป็นสารกำจัดฟอง(antifoaming agent) และ softener ในอุตสาหกรรมเคมีและอุตสาหกรรมเส้นใย นอกจากนี้ยังใช้ sodium citrate ทดแทน polyphosphate ในการผลิตผงซักฟอก (Crueger และ Creuger , 1982)

ในประเทศไทยได้มีการใช้กรดซิตริกอย่างกว้างขวาง ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ และ อุตสาหกรรมยา ซึ่งส่วนใหญ่จะสั่งเข้ามาจากต่างประเทศ จนกระทั่งเริ่มมีการผลิตกรดซิตริกภายในประเทศ ในปี พ.ศ.2522 แต่ปริมาณการผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ ซึ่งมีประมาณปีละ 4000 ตัน (ฉัตรและวุฒิ ,2528)

การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมเป็นครั้งแรก ใช้กระบวนการสกัดจากน้ำมะนาว แต่หลังจาก Wehmer (1893) พบว่าเชื้อราบางชนิดสามารถผลิตกรดซิตริกได้ จึงได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตกรดซิตริกให้ก้าวหน้าขึ้นจนถึงปัจจุบัน วิธีการหลักที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริก คือ การหมักโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งมีการทำ mutant เพื่อให้มีความสามารถในการผลิตกรดได้ดีขึ้น โดยใช้แป้งหรือน้ำตาล เช่น กากมันสำปะหลัง กากน้ำตาล น้ำตาลทราย starch hydrolysate กลูโคสไซรัปที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการย่อยแป้งและผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบ

ในอนาคตแนวโน้มการใช้ประโยชน์จากกรดซิตริกจะเพิ่มมากขึ้น จึงได้มีการทำการศึกษาค้นคว้าปรับปรุงสายพันธ์ของ *Aspergillus niger* เพื่อให้ได้สายพันธ์ที่จะผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณที่มากพอ ที่จะใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

การศึกษานี้ได้เน้นการศึกษาสภาวะของน้ำตาลหรือแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อ *Aspergillus niger* ที่ได้จากการทำ Mutation โดยวิธี transformation โดยทำการศึกษาเชื้อ 2 ชนิด ที่มียีนสำหรับการผลิตเอนไซม์ phosphofructokinase (PFK) และ เอนไซม์ pyruvate kinase (PKI) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญใน glycolysis pathway เพื่อให้ได้สารตัวกลางที่จะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์มากขึ้นทำให้เกิดการสะสมกรดซิตริกในปริมาณสูง จากหลักการนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำเชื้อไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมที่สามารถใช้ผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณที่สูง โดยเปรียบเทียบการใช้ *Aspergillus niger* ทั้ง 3 ชนิด คือ *A. niger* PFK transformance , *A. niger* PKI transformance และ *A. niger* wild type
2. เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกให้ได้ในปริมาณที่สูงจากเชื้อ *A. niger* ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว

ขอบเขตการทดลอง

การศึกษาโครงงานพิเศษในหัวข้อนี้ เป็นการนำเชื้อ *Aspergillus niger* ที่ทำการ mutation มาทำการศึกษาหาสภาวะและชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก โดยทำการเปรียบเทียบกับ *A. niger* wild type โดยใช้น้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาลชนิดต่าง ๆ ดังนี้คือ glucose,fructose,lactose,sucrose และ glycerol ซึ่งใช้น้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ คือ น้ำตาล 14% , 10% , 7.5% , 5% และ 2.5% ในแต่ละระดับทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาว่าน้ำตาลชนิดใดที่ระดับความเข้มข้นใดจะให้ปริมาณกรดซิตริกมากที่สุด โดยทำการศึกษาในระดับ shake flaskสภาวะที่ใช้ในการหมักคือ ทำการหมักที่ อุณหภูมิห้อง pHเริ่มต้นเป็น 3 เป็นระยะเวลา 14 วัน ความเร็ว 250 rpm ในการตรวจผลจะทำการเก็บผลทุกวันในทุกตัวอย่าง เป็นเวลา 14 วัน โดยใช้วิธี titration กับ 0.1 N NAOH โดยใช้ฟีนอลฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ โดยจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู ซึ่งการใช้วิธีนี้เป็นการหา total acid แต่เนื่องจากเชื้อนี้สามารถผลิตกรดซิตริกได้เป็นส่วนมาก จึงสามารถใช้วิธีนี้ทดแทนได้ เนื่องจากสะดวกและเหมาะกับการใช้ในกรณีที่มีจำนวนตัวอย่างมาก

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึง ชนิดของน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา *Aspergilus niger* ทั้ง 3 ชนิด ที่สามารถให้ผลผลิตสูงสุด
2. ทำให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซิตริกของ *Aspergillus niger* ทั้ง 3 ชนิดที่สามารถให้ผลผลิตสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 ความเป็นมาของกรดซิตริก

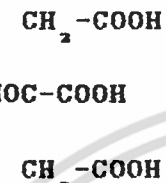
กรดซิตริกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งซึ่งพบในผลไม้ หรือเมล็ดของผักหลายชนิด โดยเฉพาะในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว กรดซิตริกที่ได้จากผลไม้เหล่านี้จึงเรียกว่า กรดซิตริกธรรมชาติ (natural citric acid) เช่น มะนาว และพืชตระกูลส้ม จะมีปริมาณกรดชนิดนี้สูง Scheele (1784) สามารถแยกกรดซิตริกออกจากน้ำมะนาวได้สำเร็จเป็นครั้งแรก โดยการผ่านน้ำมะนาวร้อน ๆ ไปบนแคลเซียมคาร์บอเนต เพื่อให้เกิดเป็นตะกอนของแคลเซียมซิเตรท จากนั้นจึงแยกกรดซิตริกออกมาโดยใช้กรดซัลฟูริกซึ่งวิธีการตกตะกอนแคลเซียมซิเตรท และแยกกรดซิตริกออกจากแคลเซียมซิเตรท ยังใช้ในการทำให้กรดซิตริกบริสุทธิ์จนถึงปัจจุบันนี้ อย่างไรก็ตาม วัตถุดิบซึ่งใช้ในการผลิตได้มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากวิธีการผลิตกรดซิตริก โดยการสกัดออกมาจากน้ำมะนาว ไม่เพียงพอต่อความต้องการในอุตสาหกรรมอาหาร

Wehmer(1893) ผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Mucor sp.* และ *Penicillium sp.* โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นวัตถุดิบ ต่อมา Currie (1917) ได้อธิบายวิธีการและสภาวะในการผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก Doelger และ Prescott (1934) พบว่าการเปลี่ยนน้ำตาลทรายเป็นกรดซิตริก โดยใช้เชื้อรา *A.niger* เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งการค้นพบเหล่านี้กระตุ้นให้เกิดความสนใจ ในการศึกษาถึงการผลิตกรดซิตริก โดยการหมักด้วยเชื้อรา *A. niger* ทำให้นักวิทยาศาสตร์ท่านอื่น ๆ หันมาสนใจในการพัฒนาการผลิตกรดซิตริกโดยใช้กระบวนการหมัก ถึงแม้ว่าวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อผลิตกรดซิตริก จะมีแนวโน้มที่เป็นไปได้ก็ตาม แต่ให้ผลที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจต่ำกว่าที่ได้รับจากการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 คุณสมบัติบางประการของกรดซิตริก (Citric acid)

citric acid มีชื่อทางเคมีว่า β-hydroxy tricarboxylic acid, 2 hydroxy-1,2,3-propene tricarboxylic acid เมื่ออยู่ในรูป anhydrous ($C_6H_8O_7$)



รูปที่ 2-1 โครงสร้างทางเคมีของ citric acid

จะมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 153 องศาเซลเซียส และในรูป monohydrate ($C_6H_8O_7.H_2O$) จุดหลอมเหลวคือ 100 องศาเซลเซียส ความสามารถในการละลายในน้ำของกรดนี้จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิดังแสดงในตารางที่ 2-1

2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถในการผลิตกรดซิตริก

จุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อราและยีสต์บางชนิด สามารถผลิตกรดซิตริก เช่น *A. niger A. wentii- A. clavatus Penicillium tuteum Penicillium citrinum Mucor periformis Paecilomyces divaricatum Citromyces pfefferianus Candida guilliermondii Trichoderma viride Saccharomycopsis lipolytica Arthrobacter paraffineus* และ *Corynebacterium sp.* อย่างไรก็ตามพบว่า เฉพาะจุลินทรีย์ผ่าเหล่าซึ่งได้จากเชื้อรา *A. niger* และ *A. wentii* สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณสูง เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Penniciillium sp.* จึงได้นำมาใช้ผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus sp.* มีความสามารถในการผลิตกรดซิตริกได้สูงกว่าหลายเท่า นอกจากกรดซิตริกแล้ว จุลินทรีย์เหล่านี้ยังผลิตผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อื่น ๆ เช่น กรดออกซาลิก (oxalic acid) กรดไอโซซิตริก (isocitric acid) และกรดกลูโคนิก (gluconic acid) ซึ่งเป็นสารที่ไม่ต้องการในการผลิตกรดซิตริกปะปนมาในปริมาณต่ำ (Creuger และ Creuger, 1982)

ตารางที่ 2-1 ความสามารถในการละลายของกรดซิตริกในน้ำ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์

1. การกลายพันธุ์ (Mutation)

การกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงอย่างกระทันหันของสารพันธุกรรม เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของหน่วยควบคุมลักษณะ (gene) หรือ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมทั้งเส้น เช่น การขาดหาย (deletion) หรือการเพิ่มขึ้นมา (duplication) ของส่วนใดส่วนหนึ่งของโครโมโซม และสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต ทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นมีการควบคุมลักษณะเปลี่ยนแปลงไป สามารถทดสอบได้ในระดับโมเลกุล (Pochlman ,1959) การกลายพันธุ์อาจเกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งมีอัตราการเกิดขึ้นต่ำมาก (10^{-7}-10^{-8}) หรือโดยการเหนี่ยวนำ (induced mutation) ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) เพื่อให้อัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้น (10^{-3}-10^{-4}) สารก่อกลายพันธุ์ที่ใช้แบ่งเป็น

ก. Chemical mutagen เป็นสารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ มีหลายชนิดได้แก่ mutard gas, ethylmethanesulfonate (EMS), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG), nitrous acid, hydroxylamine เป็นต้น สารเหล่านี้มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เบสในยีน (point mutation) ในอัตราที่สูง

ข. Physical mutation เป็นรังสีต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น แสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet light), รังสีเอกซ์ , รังสีแกมมา เป็นต้น โดยเฉพาะรังสีแกมมา เป็นรังสีที่มีอำนาจในการทะลุทะลวงสูง จัดเป็น ionizing radiations ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ยีน หรือโครโมโซมได้ (Fincham และคณะ, 1963 ;Burnett ,1975)

การกลายพันธุ์ หรือการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้น แบ่งเป็น

1. Genome mutation เป็นการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม เช่น การเพิ่มหรือขาดหายไปของแท่งหรือชุดโครโมโซม ซึ่งมีความสำคัญทางด้านปรับปรุงพันธุ์พืช

2. Chromosome mutation เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับของยีนบนโครโมโซม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Point mutation (gene mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับเบสในยีนอาจเกิดขึ้นหลายแบบ ได้แก่ Transition เป็นการแทนที่เบสพิวรีนด้วยเบสพิวรีนอื่น หรือเบสไพริมิดีนด้วยเบสไพริมิดีนอื่น , Transversion เป็นการแทนที่เบสพิวรีนด้วยเบสไพริมิดีน หรือเบสไพริมิดีนด้วยเบสพิวรีน และ frameshift mutation เกิดเนื่องจากนิวคลีโอไทด์ขาดหายไป หรือเพิ่มขึ้น ทำให้กระบวนการสร้าง RNA และสร้างโปรตีนเปลี่ยนแปลง

Chromosome mutation และ point mutation มีความสำคัญมากในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ ในทางอุตสาหกรรมจะไม่คำนึงถึงลักษณะเปลี่ยนแปลงใด ๆที่เกิดขึ้น เพียงแต่ให้เข้าใจถึงโครโมโซมหรือยีนอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ในหลาย ๆแบบ เนื่องจากสารก่อกลายพันธุ์ส่งเสริมให้เกิดความแตกต่างของเชื้อกลายพันธุ์ โดยสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะของยีนได้หลายลักษณะแตกต่างกันออกไป บางครั้งอาจเปลี่ยนแปลง ในทางที่เพิ่มขึ้นของผลผลิตมากกว่าเดิม หรือก่อให้เกิดผลผลิตที่มีโครงสร้างใหม่ ๆ เกิดขึ้น

transformation เป็นกระบวนการถ่ายยีนซึ่งต้องอาศัย Donor , DNA , recipient เป็น factor ซึ่งสามารถทำได้โดยอาศัย vector ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถจะถ่ายทอด genetic material ไปยัง host cell vector ที่ใช้อย่างง่ายจะใช้ในรูปของ plasmid โดยเมื่อสอดท่อนยีนเข้าในเซลแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียแบ่งตัวจะขยายพาหะที่มียีนดังกล่าวสอดอยู่ได้เป็นจำนวนมาก จากนั้นจึงถ่ายยีนที่ได้ให้กับเซล และบังคับให้ยีนทำหน้าที่ออกฤทธิ์

<u>การกลายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อให้ผลิตกรดซิตริกได้สูง</u>

Gardner และคณะ(1956)รายงานการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *A. niger* โดยทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการผ่านรังสีเอกซ์ และแสงอุลตราไวโอเลตพบว่าสามารถปรับปรุงคุณภาพของการผลิตกรดซิตริกได้สูงเป็น 80% ของน้ำตาล ในขณะที่เชื้อราสายพันธุ์เดิมผลิตกรดซิตริกเพียง 21% ของน้ำตาล

James และ คณะ (1956) เสนอวิธีการแยกเชื้อกลายพันธุ์ของเชื้อรา *A. niger* ที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูง โดยเลี้ยงเชื้อราที่เป็นเชื้อกลายพันธุ์บนกระดาษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล เกลือแร่ และ Bromocresol green พบว่าขนาดของบริเวณกรดที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับขนาดโคโลนี และผลที่ได้จากการหมักจะสอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธีนี้

Trumpy และ Mills (1963) คัดเลือกเชื้อรากลายพันธุ์ของ *A. niger* ที่ทนต่อ trace metal ได้มากกว่าเชื้อสายพันธุ์เดิม โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลต มีผลให้ผลิตกรดซิตริกได้ดี เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี trace metal เข้มข้นสูงกว่าปกติ

Das และ Nandi (1969) ทำการกลายพันธุ์เชื้อรา *A. niger* ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ 3 ชนิด คือ แสงอุลตราไวโอเลต รังสีแกมมา และ nitrogen mustard พบว่า รังสีแกมมาสามารถทำให้เกิดเชื้อกลายพันธุ์ผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด คือ 5.61% ขณะที่เชื้อเดิมผลิตได้เพียง 2.85% แล้วนำเชื้อกลายพันธุ์ดังกล่าวไปผ่านแสงอุลตราไวโอเลตอีกครั้ง พบว่าสามารถคัดเลือก เชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตกรดซิตริกได้สูงขึ้นเป็น 7.21%

Hanna และคณะ (1973) สามารถหมักกรดซิตริกได้ผลผลิตสูง 110-118% ของน้ำหนัก ด้วยการใช้น้ำตาลซูโครส 16% เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เชื้อรา *A. niger* ที่เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการผ่านรังสีแกมมา ในขณะที่เชื้อเดิมให้ผลผลิตสูงสุดเพียง 29% เท่านั้น

Akiyama และคณะ (1973) เหนี่ยวนำเชื้อยีสต์ *Candida lipolytica* ให้กลายพันธุ์โดยใช้สาร N-methyl-N'-nitrosoguanidine (NTG)แล้วคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ acetate agar , fluoroacetate agar และ citrate agar พบว่าเชื้อกลายพันธุ์สามารถผลิตกรดซิตริกจาก n-paraffins ได้สูงถึง 145% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยที่เชื้อนั้นสร้างกรดไอโซซิตริก(isocitric acid) ได้น้อยด้วย

Musilkova และคณะ(1978) ศึกษาเชื้อกลายพันธุ์ *A. niger* Mu90 ด้วย N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) พบว่า เมื่อใช้เวลาในการใช้ NTG นานขึ้น จำนวนสปอร์ที่รอดตายจะลดลง แต่จำนวน morphological และ biochemical mutant สูงขึ้น และจะได้เชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตกรดอินทรีย์สูงขึ้น เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนสปอร์รอดตายน้อยกว่า 1%

2. *การรวมโปรโตพลาส* (Protoplast fusion)

การรวมโปรโตพลาส คือ การนำเซลที่แยกหรือละลายผนังเซลออก ที่เรียกว่า โปรโตพลาส (protroplast) หรือ สเฟียโรพลาส (spheroplast) มาผสมกันและบังคับให้โปรโตพลาสเกิดรวมตัวกัน โดยมีการรวมตัวกันขององค์ประกอบภายใน เช่น ไมโตคอนเดรีย ไซโตรพลาสซึม ตลอดจนนิวเคลียสได้ลูกผสมที่อาจเป็น synkaryon, heterokaryon

2.5 กระบวนการหมักกรดซิตริก

กรดซิตริกสามารถผลิตได้ทั้งวิธีการ submerged และ surface process ซึ่ง surface process สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดตามลักษณะแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือของแข็งและของเหลว การหมักแบบ surface process โดยใช้อาหารแข็ง มักกระทำกันในอุตสาหกรรมขนาดเล็ก ซึ่งมีกำลังการผลิตต่ำกว่า 5,000 ตัน/ปี เนื่องจากใช้ต้นทุนการผลิตต่ำ ปัจจัยซึ่งควรคำนึงถึงในการเลือกวิธีการที่ใช้ในการผลิต คือ ต้นทุนในการผลิต แหล่งพลังงานที่ใช้ ค่าแรงงาน และเทคนิคสำหรับการวัดและควบคุมการผลิต

2.5.1 Surface process (Sodech และ Modl,1981)

ก. <u>กระบวนการหมักในอาหารแข็ง</u>

Surface process ที่ใช้อาหารแข็งเป็นวัตถุดิบ อาจใช้ในรูปของรำข้าวสาลี หรือเยื่อจากการผลิตแป้งมันเทศเป็นแหล่งอาหาร ในกระบวนการหมักแบบนี้จะใช้สายพันธุ์ *A. niger* ที่ไม่ sensitive ต่อ trace element เหมือนกับในขบวนการอื่น ๆ โดยปรับ pH ของรำข้าวสาลีลดลงเหลือ 4-5 ก่อนการฆ่าเชื้อ ภายหลังการฆ่าเชื้อจึงใส่สปอร์เชื้อราลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำมาแผ่ลงบนถาดให้มีความหนา 3-5 เซนติเมตร บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แม้ว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ α-amylase ลงไปจะช่วยเร่งการเจริญให้ดีขึ้น (Kubicek และ Rohr,1986) ตามปกติหลังจากบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อ 5-8 วัน จะทำการสกัดกรดซิตริกออกมา โดยใช้น้ำร้อน

ข. <u>กระบวนการหมักบนอาหารเหลว</u>

surface process ที่ใช้อาหารเหลวเป็นวิธีการเก่าแก่ที่สุด และยังนิยมใช้ในการผลิตกรดซิตริกจนกระทั่งปัจจุบันนี้ เนื่องจากมีข้อดี คือ ต้นทุนการผลิตต่ำ เนื่องจากสามารถลดต้นทุน ซึ่งเกิดจากการใช้พลังงานในระบบทำความเย็น และใช้เทคโนโลยีแบบง่าย ๆ แต่ค่าแรงงานสูงกว่าการหมักในถังลึก เนื่องจากต้องใช้แรงงานคนในการทำความสะอาดท่อ และถาด

วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักกรดซิตริก มักเป็นกากน้ำตาล โดยปกติมักใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม เช่น 150 kg/ตัน และทำการปรับ pH เริ่มต้นก่อน ทำการหมักให้อยู่ในช่วง pH 5-7 เนื่องจากสปอร์ของ *A. niger* จะไม่งอกถ้ามี pH ต่ำ (ความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออนสูง) และ เนื่องจากกรดน้ำส้มสายชูไม่แตกตัวที่มักจะพบในกากน้ำตาลทรายจะยับยั้งการงอกของสปอร์ (Sodech และ Modl ,1981) จากนั้นจึงเติมแหล่งอาหารอื่น ๆ และ alkaline ferrocyanide ลงไปทำการฆ่าเชื้อ เมื่ออาหารเย็น จะทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในถาดอลูมิเนียม ที่เรียงเป็นชั้น ๆ ภายใน chamber ที่มีการระบายอากาศโดยให้มีความหนาของกากน้ำตาล ระหว่าง 50-200 ซม.

หลังจากใส่สปอร์ของ *A. niger* บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังจากมีการผ่านอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อเข้าไปใน chamber แล้ว เชื้อราจะเจริญบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ อากาศจะช่วยเพิ่มออกซิเจน และนำความร้อนที่เกิดจากการหมักออกไป โดยต้องทำการควบคุมอัตราเร็วของอากาศให้เหมาะสมเพื่อให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 30 องศาเซลเซียส เส้นใยที่เจริญจะรวมตัวกันเป็นกลุ่ม และถูกแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการบ่มเลี้ยง 7-15 วัน

2.5.2 กระบวนการหมักในอาหารเหลว (Submerged fermentation process) (Sodech และ Modl ,1981)

แม้ว่าวิธีการหมักในอาหารเหลวจะพัฒนาขึ้นมาในเวลาเดียวกับ surface process แต่ยังไม่นำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม จนกระทั่งปี ค.ศ. 1950 หลักสำคัญของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักในอาหารเหลว คือ จุลินทรีย์จะเจริญและผลิตกรดซิตริกในอาหารเหลว โดยในกรณีของการผลิตกรดซิตริก มีการให้อากาศซึ่งจะช่วยทำให้อาหารเหลว ผสมเข้ากันได้ดี

ถ้าเลี้ยง *A.niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเส้นใยที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะยาว และบาง กระจายในอาหารเหลวซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริก ลักษณะที่ดีคือ เชื้อราจะต้องเจริญเป็นเส้นใยขนาดสั้นแตกแขนงแยกออกมาจากส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกในอาหารที่มีน้ำตาลทราย เช่น กากน้ำตาล เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เชื้อรา *A. niger* มีดังนี้คือ

- ควบคุม pH ระหว่างการหมักให้คงที่ ในช่วง 1.5-2.8
- อุณหภูมิของการหมักอยู่ในช่วง 28-32 องศาเซลเซียส
- มี trace element ที่จำเป็นสำหรับการเจริญ เช่น เหล็ก แมงกานีส แมกนีเซียม ทองแดง
- มีการปรับอัตราส่วนระหว่างตัวยับยั้ง (Inhibitor) และ trace element

ระยะเวลาการหมักกรดซิตริก ประมาณ 6-15 วัน ซึ่งขึ้นกับชนิดวัตถุดิบ และความเข้มข้นของน้ำตาล แต่ระยะเวลาจะลดลง ถ้าใช้สปอร์ที่งอกแล้วเป็นกล้าเชื้อ เนื่องจากจะลด unproductive pre-phase ของการเจริญของเส้นใย

ข้อดีของการหมักในอาหารเหลวคือ

1. สามารถใช้วัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบได้ทุกชนิด
2. ให้ผลได้ (yield) ของกรดซิตริกสูง เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้
3. สามารถปรับปรุงการควบคุมกระบวนการได้ง่าย
4. ลดพื้นที่ที่ใช้เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบ surface culture
5. ลดการควบคุมที่กระทำด้วยการใช้มือ
6. ลดต้นทุนการผลิต
7. ควบคุมสภาพปลอดเชื้อได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ขบวนการชีวเคมีของกรดซิตริก

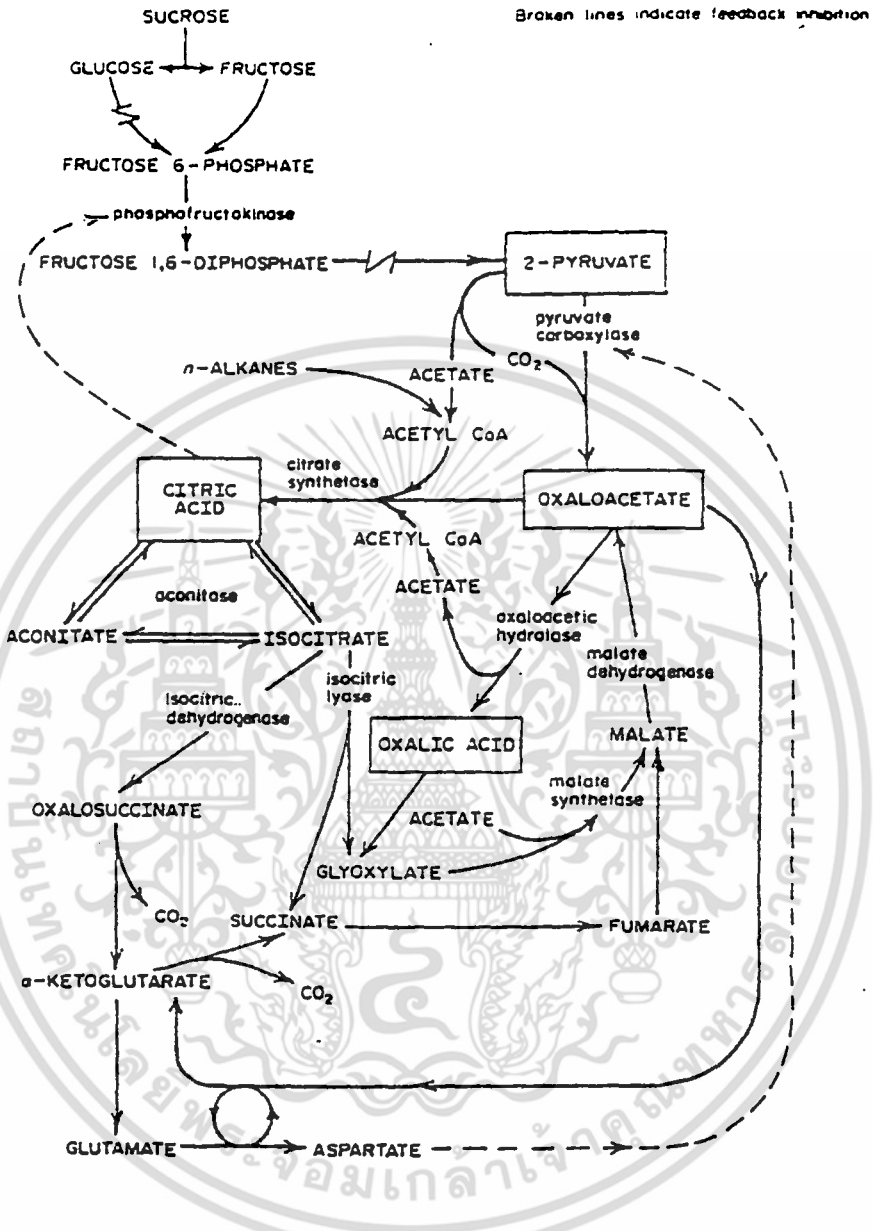
ได้มีผู้ที่พยายามอธิบายถึงขบวนการทางชีวเคมีของการผลิต และสะสมกรดซิตริกโดยใช้เชื้อ *A. niger* แต่ก็ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนลงไปว่า ทฤษฎีใดถูก ทฤษฎีเหล่านี้ ได้แก่

1. เกิดการผิดปกติใน Tricarboxylic acid (TCA) cycle ซึ่งอาจเกิดจากคุณสมบัติของเชื้อชนิดนั้นเอง ที่สามารถสร้างและสะสมกรดซิตริก ซึ่งได้จากการรวม Acetyl CoA กับ Oxaloacetic acid บางสภาวะจะเกิดการยับยั้งของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการเปลี่ยนกรดซิตริกไปเป็นกรด Isocitric (รูปที่ 2-2)Ramakrishnan et al. (1955) ได้รายงานการสะสมกรดซิตริกของเชื้อ *A. niger* ว่าเกิดขึ้นจากการหายไปของเอนไซม์ aconitase และ isocitric dehydrogenase แต่ต่อมา La Nauze (1966) สามารถจะสกัดเอนไซม์ aconitase และ NAD , NADH-Isocitric dehydrogenase ในระหว่างการหมักได้ และไม่พบการขาดตอนของเอนไซม์ใน TCA cycle

Kirk (1964) ได้รายงานว่า เมื่อมีการลดความเข้มข้นของอนุมูลโลหะหนักบางชนิดที่เป็น co-factor ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกริยาการหายใจ จะเป็นผลให้เพิ่มผลผลิตของกรดซิตริก แต่สำหรับทองแดงนั้น จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการสร้างกรดเพิ่มขึ้น เมื่อเติมในปริมาณที่พอเหมาะ ทั้งนี้เพราะทองแดงเป็น specific inhibitor ของเอนไซม์ aconitase (U.S. Patent 2,970,084)

2. การเกิดกรดออกซาลิกมีผลยับยั้งต่อ TCA cycle ซึ่งกรดออกซาลิกจะเกิดได้จาก oxaloacetate และ glyoxylate ใน glyoxylate pathway แต่ในสภาวะที่มี NADH สูง กรดออกซาลิกที่เกิดจาก glyoxylate จะลดลง เป็นผลทำให้เกิดกรดซิตริกจาก oxaloacetate และ acetate ได้ (Wiley,1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2-2 แสดงปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสลายกรดซิตริก

ที่มา : Milsom และ Meers (1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลไกที่ทำให้เกิดการสะสมกรดซิตริกโดย *A. niger*

ปฏิกริยาที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสลายกรดซิตริก แสดงดังรูปที่ 2-2 โดยพบว่า Acetyl CoA เกิดจาก

1. การเกิด Oxidative decarboxylation โดย pyruvate ซึ่งเกิดจาก dehydration ของน้ำตาลกลูโคสผ่าน glycolytic pathway

2. การเกิด β-oxidation ของ thioester

จากการศึกษาในครั้งแรก ๆ โดยใช้ C^{14} เป็น tracer ภายใต้สภาวะที่ทำให้เกิดการสะสมกรดซิตริก ในปริมาณปานกลางพบว่า 40% ของกรดซิตริกผลิตโดยกระบวนการ c_2,c_2-condensation และ 60% ผลิตจาก c_1,c_3-condensation (Shu และคณะ, 1954)

Verhoff และ Spradlin (1976) ศึกษา mass balance ในระบบที่มีไพรูเวท เป็นสารตั้งต้น พบว่ามีปริมาณกรดซิตริก กรดออกซาลิค และคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากการวิเคราะห์ทำให้ทราบว่ามีกลไกของเมตาโบลิซึม 2 แบบ โดยแบบแรกเหมือนกับที่ศึกษาโดย Cleland และ Johnson (1954) แบบที่ 2 เกี่ยวข้องกับการเกิด carboxylation ของไพรูเวท 2 โมเลกุล เกิดเป็นออกซาโรอาซิเตท (oxaloacetate) 2 โมเลกุล หลังจากนั้นออกซาโลอาซิเตทโมเลกุลหนึ่งจะถูกย่อยสลายเป็นกรดออกซาลิคและอะซิเตท โดยการทำงานของเอนไซม์ oxaloacetic hydrolase ซึ่งอะซิเตทที่ได้จะรวมตัวกับออกซาโลอะซิเตทที่เหลืออีกโมเลกุลหนึ่ง เกิดเป็นกรดซิตริกขึ้น จากข้อเสนอนี้พบว่า ออกซาเลทที่ได้จะถูกรีดิวซ์เป็น glyoxalateซึ่งจะรวมตัวกับ succinate โดยการทำงานของเอนไซม์ isocitrate lyase เกิดเป็น isocitrate ซึ่งจะถูกเมตาโบไลซ์โดยเอนไซม์ในระบบ tricarboxylic acid เกิดเป็นsuccinate พร้อมทั้งปล่อยคาร์บอนไดออกไซม์ออกมา 2 โมเลกุล ซึ่งคาร์บอนไดออกไซม์ที่ถูกปล่อยออกมานี้ซึ่งจะใช้ในการเกิด carboxylation ของไพรูเวท 2 โมเลกุลต่อไป

Verhoff และ Spradlin (1976) วัดกิจกรรมเอนไซม์ต่าง ๆ ระหว่างการหมักกรดซิตริก พบว่ามีกิจกรรมของ pyruvate carboxylase และ oxaloacetic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

hydrolase สูงมากระหว่างเกิดการผลิตกรดซิตริกและออกซาเลท

Joshi และ Ranakrishnan (1959) ไม่พบกิจกรรมของ oxaloacetic hydrolase เมื่อเริ่มมีการสะสมกรดซิตริกขึ้น

Muller (1967) ไม่พบกิจกรรมของ oxaloacetic hydrolase ในระหว่างการหมักกรดซิตริกเลย

Kubicek และ Rohr(1977) ไม่พบกิจกรรมของ citrate lyase และ α-ketoglutarate dehydrogenase ระหว่างเกิดการสะสมกรดซิตริก

2.7 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสะสมกรดซิตริก

1. เอนไซม์ที่ควบคุมกลไก ไกลโคไลซิส

ในเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และยีสต์ พบว่าเอนไซม์ phosphofructokinase (E.C.2.7.1.11) เป็นเอนไซม์สำคัญที่ควบคุมกลไก ไกลโคไลซิส โดยเอนไซม์ phosphofructokinase เป็น regulatory enzyme ในการผลิตกรดซิตริก โดย *A.niger* เอนไซม์เหล่านี้ถูกยับยั้งโดยซิเตรทและ ATP ที่ physicological concentration แต่ถูกกระตุ้นโดย AMP ฟอสเฟต และ อิออนของแอมโมเนียม โดยอิออนของแอมโมเนียมมีประสิทธิภาพในการปลดปล่อย phosphofructokinase จากการยับยั้งโดยซิเตรท และ ATP

ในกรณีของ *A.niger* ปริมาณ NH_4^+ ที่สูงผิดปกติ (ประมาณ 25 mM ใน cytosol) จะเกิดขึ้นเมื่อบ่มเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีน้ำตาลสูง และมีแมงกานีสปะปนมาเล็กน้อย ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากกรดอะมิโนในกลุ่มของ α-ketoglutarateหลายชนิด เช่น กลูตาเมท กลูตามีน อาร์จินีน และ -aminobutyrate ถูกสะสมและขับออกมา ซึ่งช่วยลดความเป็นพิษของ NH_4^+ ที่มีต่อเซล การสะสมกรดอะมิโนเหล่านี้ จะลดปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซล และกรดนิวคลีอิก เมื่อเติมcyclohexamide ลงไป จะกระตุ้นให้เกิดการสะสมแอมโมเนียมอิออน และกรดอมิโนในสภาพที่มีอิออนของแมงกานีส เนื่องจากทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบกับเซลขึ้นมาทด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

แทนโปรตีน และ กรดไรโบนิวคลีอิก ที่หมดสภาพไป จากการทดลองนี้ ทำให้ทราบว่า การเติมอิออนของแมงกานีสมีผลทางลบต่อการหมักกรดซิตริก โดยจะเพิ่ม lag time และต้องการการสังเคราะห์ cytoplasmic protein แทนที่จะเป็น mitrochondrial protein (Rohr และ Kubicek,1981)

Regulatory enzyme ที่พบในกลไกไกลโคไลซีส อีกแห่งหนึ่ง คือ เอนไซม์ pyruvate kinase (E.C. 2.7.1.40) ซึ่งพบในเชื้อราหลายชนิด แต่ยังไม่พบใน *A. niger*

2. เมตาบอลิซึมของไพรูเวท (pyruvate Metabolism)

ไพรูเวท เป็น branch point ที่สำคัญในขบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อรา เนื่องจากสามารถ decarboxylate เป็น acetyl coenzyme A โดยการทำงานของ pyruvate dehydrogenase (E.C. 1.2.4.1) และเกิดเป็นกรดออกซาโลอะซิติก เมื่อมีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์โดยการทำงานของเอนไซม์ pyruvate carboxylase (E.C. 6.4.1.1) และจากการศึกษาพบว่า การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลต่อการสะสมกรดซิตริก โดยเมื่อวัดปริมาณกาซที่เกิดจากขบวนการเมตาโบลิซึม พบว่า ในช่วงที่มีการสะสมกรดซิตริก อัตราเร็วในการผลิตกรดซิตริก จะเป็นอัตราส่วนโดยตรงกับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกตรึง

A. niger มีระบบการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ที่เกิดจากการทำงานของ malic enzyme (E.C. 1.1.1.40) และ pyruvate carboxylase Rohr และ Kubicek (1981) พบว่าการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ในระหว่างที่มีการผลิตกรดซิตริกเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ pyruvate carboxylase โดยเอนไซม์นี้ไม่ถูกยับยั้งโดย acetyl coenzyme A แต่ถูกยับยั้งเล็กน้อยโดย α-ketoglutarate จึงอาจกล่าวได้ว่า การเพิ่มปริมาณไพรูเวทจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ออกซาโรอะซิเตทมากขึ้น

3. เอนไซม์ใน tricarboxylic acid cycle

เอนไซม์ตัวแรกในระบบนี้ คือ citrate synthase (E.C. 4.1.3.7) เป็น regulatory enzyme ซึ่งถูกควบคุมการทำงานโดย coenzyme A และ ATP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมี ATP-Mg Chelate เป็นตัวยับยั้งอ่อน ๆ สัมพรรคภาพ (affinity)ของเอนไซม์นี้ที่มีต่อ acetyl coenzyme A ขึ้นกับความเข้มข้นของออกซาโรอะซิเตท โดยจะมีสัมพรรคภาพสูงมาก เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการสะสมกรดซิตริก

เอนไซม์ aconitase (E.C.4.2.1.3) NADP-specific isocitrate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.4.2) มีกิจกรรมเพียงเล็กน้อย เมื่อเริ่มต้นทำการหมักกรดซิตริก แต่หลังจากนั้นประมาณ 150-200 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสอง จะลดลงมาอยู่ในระดับต่ำมาก (Rohr Kubicek,1981) โดย *A. niger* มี NADP - specific enzyme 2 ชนิดชนิดแรกอยู่ใน mitochondria ชนิดที่สองอยู่ที่ cytoplasm เอนไซม์ที่พบใน mitochondria ถูกยับยั้งการทำงานโดย physicological concentration ของซิเตรท ในขณะที่ซิเตรทไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ใน cytoplasm ซึ่งการยับยั้งการทำงานจะมีมากขึ้นในช่วง pH ที่เป็นด่าง และ มีความเข้มข้นของแมงกานีส 30 mM (Rohr และ Kubicek,1981)

กิจกรรมของ α-ketoglutarate dehydrogenase มีต่ำมากหรือไม่พบเลยในเชื้อราภายใต้สภาวะที่มีการสะสมกรดซิตริก โดยการสังเคราะห์เอนไซม์ α-ketoglutarate dehydrogenase เป็นขั้นตอนที่ผันกลับไม่ได้ เพียงขั้นตอนเดียวที่พบในระบบ tricarboxylic acid ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า malate fumalate และ succinate (Rohr และ Kubicek,1977)

ระบบ tricarboxylic acid ที่ไม่สมบูรณ์สามารถนำมาใช้ในการอธิบายถึง การที่พบเมตาบอไลท์ ในความเข้มข้นที่สูงผิดปกติ ซึ่งเป็นเพราะเกิดการสะสมของ fumalate และ malate ขึ้นมาก่อนซิเตรท หลังจากนั้น จึงเกิดการสะสม α-ketoglutarate ภายใต้สภาวะที่ขาดแคลน แอมโมเนียมอิออน และมีอิออนของแมงกานีสเพียงพอ (Rohr และ kubicek,1981)

เมื่อพิจารณาถึงระบบ tricarboxylic acid อาจสรุปได้ว่า ขั้นตอนสำคัญในการผลิตกรดซิตริก คือ การเกิดการผลิตออกซาโรอะซิเตรท ออกมามากผิดปกติ เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ pyruvate carboxylase และ citrate synthase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ ขั้นตอนสำคัญ ที่ทำให้กรดซิตริกที่ผลิตขึ้นไม่ถูกใช้ไป คือ การขาดแคลนเอนไซม์ aconitase isocitrate lyase และ isocitrate dehydrogenase

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก

ในการผลิตกรดซิตริกจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิต เพื่อให้มีประสิทธิภาพและสามารถควบคุมได้คือ

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ควรมีลักษณะดังนี้

1.1 จะต้องให้ผลผลิตกรดซิตริกสูง

1.2 ผลผลิตกรดมีความสม่ำเสมอ

1.3 แยกกรดจากวัสดุหมักได้ง่าย

1.4 ให้กรดอนินทรีย์ที่ไม่ต้องการน้อย

2. ชนิดและความเข้มข้นของวัตถุดิบ

อาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดซิตริกต้องประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญดังนี้คือ

2.1 คาร์บอน

จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่พบว่าสร้างกรดซิตริก สามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2-12 อะตอม เป็นวัตถุดิบได้โดยขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และพบว่าน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลฟรุคโตสจะให้ผลผลิตสูงกว่ากลูโคส และมีรายงานว่า ความเข้มข้นที่พอเหมาะของน้ำตาลโดยทั่ว ๆ ไป อยู่ระหว่าง 14-20 เปอร์เซนต์ ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงจะทำให้น้ำตาลที่เหลือจากการหมักสูง เป็นการสิ้นเปลือง แต่ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่ำเกินไปจะทำให้ผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้ลดลง และ จะเกิดสะสมของกรดออกซาลิก

ตามปกติแล้วการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรามักต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อองค์ประกอบง่ายไม่ซับซ้อน แหล่งคาร์บอนที่ใช้กันมากได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำอ้อย แป้งจากแหล่งต่าง ๆ กากน้ำตาลจากอ้อย เป็นต้น ทั้งนี้น้ำตาลซูโครสหรือกากน้ำตาลเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุดิบที่นิยมใช้กันมากที่สุด (Perlman และ Sit,1960 Kovats,1960)

2.2 ไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่จำเป็นต่อการผลิตกรดซิตริกอยู่ในรูปเกลืออนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท และยูเรีย ซึ่งชนิดของแหล่งไนโตรเจนจะมีผลต่อเชื้อรา กล่าวคือถ้าใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อกินเวลานาน ในขณะที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรทจะทำให้ระยะเวลาดังกล่าวกินเวลาน้อย แต่ถ้าใช้แอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้นสูงกว่า 0.25% จะก่อให้เกิดการสะสมของกรดออกซาลิคขึ้นอีก และในกลุ่มของเกลือไนเตรท พบว่าเมื่อใช้ โซเดียมไนเตรทและโพแตสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้ผลในการผลิตกรดซิตริคจากเชื้อ *A. niger* ได้สูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรท และต่อมาได้มีการศึกษาพบว่าโซเดียมไนเตรทในระดับความเข้มข้นเพียง 0.4% ก็ให้ผลผลิตของกรดซิตริกสูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรท ดังนั้นในการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนเพื่อให้ผลผลิตของกรดซิตริคสูงสุดต้องคำนึงถึงความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และคำนึงถึงสายพันธุ์ของเชื้อรา และกระบวนการหมักที่ใช้เป็นสำคัญ

2.3 ฟอสเฟต

เป็นธาตุหลักที่มีความจำเป็นต่อเชื้อรา ปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารที่ใช้หมักจะส่งผลต่อปริมาณของกรดซิตริกที่ถูกสร้างขึ้น กล่าวคือ ถ้าฟอสเฟตมีความเข้มข้นสูงจะทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อราเกิดขึ้นได้ดี ปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.1-0.2%

3. ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

การควบคุม pH ของวัตถุดิบอย่างพอเหมาะจะทำให้เชื้อสามารถผลิตกรดซิตริกได้ดีแล้ว ยังสามารถลดการเกิดกรดอ๊อกซาลิกได้ด้วยจากการทดลองพบว่าที่ pH ต่ำจะเป็นผลดีต่อการหมักโดยจะได้กรดซิตริกสูง ส่วนการเกิดกรดอ๊อกซาลิคจะถูกยับยั้งลงและยังลดปัญหาการปนเปื้อนด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เกลืออินทรีย์

เกลืออินทรีย์ที่มีความสำคัญในการผลิตกรดซิตริก ได้แก่ เกลืออินทรีย์ของธาตุโปตัสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แมงกานีส เหล็ก และ สังกะสี เป็นต้น ซึ่งเกลือของธาตุเหล่านี้ มีขอบเขตของความเข้มข้นที่ใช้ในการหมักด้วยเชื้อแตกต่างกันตามสายพันธุ์ที่ใช้

การปรับระดับเกลือแร่ในวัตถุดิบ เพื่อให้มีปริมาณที่พอเหมาะแก่การผลิตกรดซิตริกทำได้ 3 วิธีคือ โดยการใช้ aluminium hydroxide co-precipitation (Shu และ Johnson,1984) ion exchange และ bone char (Andrew,1952 ; et al., 1946) หรือใช้ potassium ferrocyanide ตกตะกอนเกลือแร่ต่าง ๆ (Gerhardt et al., 1966) ดังรายละเอียดตัวอย่างการกำจัดเกลือแร่ด้วยวิธีดังแสดงไว้ในตารางที่ 2-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เกลืออนินทรีย์

เกลืออนินทรีย์ที่มีความสำคัญในการผลิตกรดซิตริก ได้แก่ เกลืออนินทรีย์ของธาตุโปตัสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แมงกานีส เหล็ก และ สังกะสี เป็นต้น ซึ่งเกลือของธาตุเหล่านี้ มีขอบเขตของความเข้มข้นที่ใช้ในการหมักด้วยเชื้อแตกต่างกันตามสายพันธุ์ที่ใช้

การปรับระดับเกลือแร่ในวัตถุดิบ เพื่อให้มีปริมาณที่พอเหมาะแก่การผลิตกรดซิตริกทำได้ 3 วิธีคือ โดยการใช้ aluminium hydroxide co-precipitation (Shu และ Johnson,1984) ion exchange และ bone char (Andrew,1952 ; et al., 1946) หรือใช้ potassium ferrocyanide ตกตะกอนเกลือแร่ต่าง ๆ (Gerhardt et al., 1966) ดังรายละเอียดตัวอย่างการกำจัดเกลือแร่ด้วยวิธีดังแสดงไว้ในตารางที่ 2-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-2 วิธีการกำจัดเกลือแร่ในวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ

ชนิดของวัตถุดิบ	วิธีกำจัด	เอกสารอ้างอิง
กากน้ำตาลจากหัวบีท	Ferrocyanide precipitation	Andrew,1952; Clark et al.,1966; Gerhardt et al.,1946
กากน้ำตาลจากอ้อย	Ion exchange resin	Perlman et al .,1946
กลูโคส ซูโครส	Ion exchange,Aluminum hydroxide coprecipitation	Noguchi และ Johnson, 1961;Shu และJohnson, 1984

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. มังกานีส

ปริมาณมังกานีสมีความสำคัญมากต่อการผลิตกรดซิตริกคือ ถ้ามีปริมาณมังกานีสปะปนมาในอาหารเลี้ยงเชื้อแม้ในปริมาณที่เล็กน้อยคือ มากกว่า 0.02 mM มังกานีสจะมีผลต่อเมตาบอลิซึมในระยะ idiophase และมีผลต่อลักษณะของเซลที่เกิดขึ้น เซลจะมีการใช้นำได้น้อยลง ทำให้ปริมาณกรดที่ได้น้อยลงอย่างมาก จะมีค่าเป็น 50% ของภาวะที่ไม่มีมังกานีส เนื่องจาก KeyEnzyme ของขบวนการ glycolysis, Pentose phosphate pathway , tricarboxylic acid cycle , N - metabolism และ Gluco neogenesis ในสภาวะที่ไม่มีมังกานีส จะมีผลในการยับยั้งขบวนการ anabolic และ TCA-cycle enzyme(ยกเว้น citrate synthase และ enzyme ใน glycolysis) ทำให้เกิดอัตราการใช้น้ำตาลซึ่งในสภาวะที่ไม่มีมังกานีส จะไม่มีตัวยับยั้ง enzyme ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ การทำงานของ 2-oxoglutarate dehydrogenase และ iso citrate lyase จะไม่พบทั้งในสภาวะที่มี และไม่มีมังกานีส ดังนั้นสภาวะที่ไม่มีมังกานีสจึงเป็นปัจจัยหลักในการเกิดการสังเคราะห์กรดซิตริกในปริมาณที่สูง

6. ความสำคัญของพื้นที่ผิวต่อปริมาณอ๊อกซิเจนและอุณหภูมิ

ขบวนการหมักกรดซิตริกนั้น เกิดจากเชื้อราใช้น้ำตาลไปในการเจริญส่วนหนึ่งและอีกส่วนหนึ่งถูกใช้เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดซิตริก การหมักในภาชนะปากกว้าง และตื้นจะช่วยให้มีการถ่ายเทอากาศและอ๊อกซิเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อรา เพื่อใช้ไปในการเผาผลาญพลังงาน และภาชนะที่ตื้นจะทำให้เชื้อราสัมผัสกับอาหารได้มากกว่า

อุณหภูมิที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ และ สภาวะอื่นของขบวนการหมักโดยทั่วไปมักจะใช้ประมาณ 25-35 องศาเซลเซียส (Perlman และ Sit,1960)

7. ปัจจัยอื่น ๆ

การปนเปื้อนของโลหะหนักที่มาจากแหล่งคาร์บอน มีความสำคัญต่อการหมักกรดซิตริก จึงมีการพยายามเพิ่มผลผลิตของการหมักโดยการเติมสารต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.1 Hexacyanoferrate

ใช้ในการกำจัดการปนเปื้อนของโลหะที่มีในแหล่งคาร์บอนโดยอาศัยคุณสมบัติการเป็น chelate พบว่าผลของการผลิตกรดซิตริกจะสูงขึ้น ถ้ามี hexacyanoferrate ในสารละลายสูงกว่าปกติเล็กน้อยเนื่องจากจะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 10-200 มิลลิกรัมต่อลิตร (Rohr และ Kubicek, 1986)

7.2 Lower alcohols

แอลกอฮอล์ที่ใช้คือ methanol,ethanol,n-propanol,isopropanol หรือ methylacetate ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซนต์ ผลกระทบของแอลกอฮอล์ที่มีต่อการผลิตกรดซิตริกคือมีผลต่อ membrane fluidity ของเชื้อราโดยมีผลต่อองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดของ cytoplasmic membrane ทำให้ผลที่ได้ของกรดซิตริกเพิ่มสูงขึ้น

7.3 Fatty material

Fatty material ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักมักเป็นสารกำจัดฟอง พบว่าน้ำมันธรรมชาติที่มีสัดส่วนของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงจะเพิ่มผลผลิตสุดท้ายของการผลิตกรดซิตริกโดยไม่มีผลต่อผลของน้ำหนักแห้ง ปริมาณกรดไขมันที่เหมาะสมคือ 0.05 - 0.3 เปอร์เซนต์

7.4 สารประกอบอื่น ๆ

สารประกอบอื่น ๆ ที่มีผลเช่น H_2O_2 ซึ่งจะมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ aconitase และเพิ่ม oxygen tension ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังมี 4-methyl-umbelliferone , Benzoic acid , 3-hydroxi-2-naphtoic acid , Iron cyaniide , Amine oximes , Starch , EDTA , 1,2-diaminocyclohexane N , N'tetraacetate , surface active agent , Dimethylentriaminepentaacetate , Verniculate เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 การผลิตกรดซิตริกเป็นการค้า

จากที่ทราบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดซิตริกได้มีการศึกษาเชื้อรา และพบว่าเชื้อ *A. niger* สามารถเหนี่ยวนำให้สร้างกรดซิตริกได้ในปริมาณที่สูง ในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต และต่อมาได้ใช้เชื้อชนิดนี้ในการผลิตกรดซีตริกเป็นการค้า

การผลิตกรดซีตริกเป็นการค้าจะมีทั้งหมด 3 วิธีคือ

1. การหมักในสภาพ solid state (Japanese Koji process)
2. liquid surface culture (ใช้ภาชนะก้นตื้นในการหมัก)
3. submerged fermentation

1. การหมักในสภาพ solid state

การหมักในสภาพที่เป็นของแข็งหรือโคจิ เป็นวิธีดั้งเดิมที่นิยมทำกันในญี่ปุ่น เริ่มแรกทีเดียวได้มีการใช้ วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นวัตถุดิบ เช่น กากมันฝรั่งชนิดหวาน ซังข้าวโพด ทำการปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 1.8-2 หมักด้วย *A. niger* สายพันธุ์เฉพาะบนพื้นหรือถาด อุณหภูมิที่ใช้บ่มไม่เกิน 28 องศาเซลเซียส หมักนาน 5-8 วัน ต่อมาได้มีการหมักโดยปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 4-5 แล้วฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ จะได้วัตถุดิบที่มีลักษณะเรียกว่า mash มีความชื้น 70-80 เปอร์เซนต์ แล้วทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ใส่โคจิที่ทำจากสายพันธุ์เฉพาะของ *A. niger* อุณหภูมิระหว่างการหมักไม่ควรเกิน 28 องศาเซลเซียส และมีการเติม 3-7 เปอร์เซนต์ ของ filter cake ได้จากการหมักรดกลูตามิค จะทำให้ผลผลิตสูงขึ้น การเปลี่ยนแปลงในการหมักเริ่มต้นแป้งจะถูกย่อยด้วยอะไมเลส และถ้ามีการเติมอะไมเลสลงไปด้วยจะทำให้ได้การหมักมีประสิทธิภาพดีขึ้น จะนำอาหารหมักมาเกลี่ยในถาดที่มีความลึก 3-5 ซม. นาน 5-8 วัน จะได้โคจิซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวได้โดยนำมาใส่ใน perculatator และสกัดกรดซิตริกด้วยน้ำวิธีนี้จะได้ผลผลิต 60-80 กรัมของกรดซิตริกอันไฮดรัสต่อ 100 กรัมน้ำตาลที่เติม ส่วนการทำให้บริสุทธิ์และ recover จะเหมือนกันไม่ว่าหมักแบบไหน

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Liquid surface culture process

เป็นการหมักในภาชนะตื้น (shallow pan culture process) จากการหมักวิธีนี้ทำให้ราคาของกรดซิตริกถูกลงเพราะได้ผลดี ซึ่งมีหลายแห่งที่ผลิตโดยวิธีนี้ แต่เทคนิคในการทำก็ยังปกปิดเป็นความลับอยู่ ทราบแต่เพียงหลักการที่ว่า ในการหมักอาหารและเชื้อจะถูกทำให้กระจายในภาชนะก้นแบน ทำด้วยอลูมิเนียมที่มีความบริสุทธิ์สูง หรือทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม เพื่อลดปัญหาการกัดกร่อนจากกรดและการปะปนของแร่ธาตุโลหะที่มีผลต่อการหมัก มีการเป่าอากาศที่ชื้นลงไปบนผิวของน้ำหมัก เป็นเวลา 5 หรือ 6 วัน จะต้องระวังไม่ให้มีการสะสม CO_2 ในอากาศซึ่งลดปริมาณการผลิตได้

วิธีนี้สามารถใช้โมลาสในการหมักได้โดยในโมลาสจะมีซูโครสเป็นอาหารหลักและกลูโคสบ้าง นอกจากนี้ยังมี โปรตีน เปปไทด์ กรดอะมิโน และอิออน อนินทรีย์ ซึ่งในการใช้โมลาสจะต้องกำจัดโลหะที่ไม่ต้องการออกก่อน หรือลดปริมาณลงอาจใช้การดูดซับด้วย $CaCO_3$ หรือ cooloidal silica tricalcium phosphate และแป้ง หรือจะใช้วิธีการเติม $Ca(OH)_2$ แล้วทำให้ร้อน หรือจะใช้ activated carbon ก็ได้ บางแหล่งที่ผลิตจะตกตะกอนเหล็กโดยเติม calcium ferrocyanide เพราะเหล็กมีบทบาทต่อการสร้างกรดอ๊อกซาลิก สร้างสปอร์ และรงควัตถุสีเขียวปนเหลืองสำหรับเชื้อ *A. niger* ในขณะที่สร้างสปอร์ ซึ่ง รงควัตถุนี้จะปะปนในน้ำหมักทำให้การแยกกรดออกมาลำบากมากขึ้น การหมักแบบนี้ได้ผลผลิต 80-85 เปอร์เซนต์ ของน้ำหนักคาร์โบไฮเดรตเริ่มต้นที่ให้ และสามารถแยกกรดซิตริกออกได้สูงถึง 90 เปอร์เซนต์

3. submerged culture process

เป็นการหมักโดยเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาดใหญ่ วิธีนี้จะใช้เชื้อ *A. niger japonicum* บางทีอาจจะเรียกว่า *A. japonicum* Saito วิธีนี้จะให้ฟองอากาศผ่านน้ำหมักอย่างช้า ๆ น้ำหมักจะมีระดับความลึก 15 ซม. อาหารที่ใช้จะมีซูโครส 100 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 5.0 กรัม KH_2PO_4 2.5 กรัม และ $MgSO_4$ 1.2 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ในการหมักวิธีนี้จะเติมเมทานอลลงไปช่วยเพิ่มผลผลิต และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มักจะเป็นอาหารที่มีปริมาณของแร่ธาตุต่าง ๆ ต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเลี้ยงแบบ submerged culture จะมีการปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างกรดซิตริกของเชื้อโดย เติมทองแดง ให้อยู่ระหว่าง 0.1 - 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะขึ้นกับปริมาณเหล็ก ดังตารางที่ 2.5 เติม KH_2PO_4 0.01-0.3% อาจมากถึง 2% ได้ $MgSO_4.7H_2O$ ให้ได้สูงถึง 0.25% แต่ในกรณีที่มีเหล็กน้อยมากต้องเติมให้มี 0.1-0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นประมาณ 4 การเลี้ยงแบบ submerg culture จะต้องให้อากาศอย่างต่อเนื่องโดยอากาศจะถูกเป่าผ่านน้ำหมักด้วยอัตรา 0.5-1.5 V/Vsolution/min

ในการผลิตเป็นการค้าแบบ submerged fermentation นิยมใช้โมลาสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงและวัสดุที่ผ่านการย่อยสลายโดย เอนไซม์อะไมเลส เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวฟ่าง แป้งมันฝรั่ง ซึ่งปรับให้มีน้ำตาลระหว่าง 15-20 เปอร์เซนต์ pH ของอาหารอยู่ระหว่าง 2-3 โดยในอาหารจะต้องมีเหล็ก แมงกานีส โคบอลท์ และนิเกิล ในปริมาณต่ำ วิธีนี้จะใช้เวลาประมาณ 5-14 วัน ให้ผลผลิตสูงถึง 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-3 ผลของเหล็กในการผลิตกรดซิตริกจาก decationized sucrose ของเชื้อ *A. niger* เมื่อเลี้ยงแบบ submerged culture

Iron (mg/liter)	weight yield citric acid (%)
0.0	67.0
0.05	71.0
0.5	88.0
0.75	79.0
1.00	76.0
2.00	71.0
5.00	57.0
10.0	39.0

a. From Schweiger(1957) Medium composition Sucrosepurifide by mixed resin bed ion exchange from 3,600,000 ohms resistance at 40% concentration ,diluted with deionized water at 18,000,000 ohms resistance to 14.2% sugar content and recrystallized nutrient salts added KH_2PO_4 0.014% $MgSO_4.H_2O$ 0.1% $(NH_4)_2CO_3$ 0.2% HCl to pH 2.5

b.Supplied as $FeCl_3$

c.(Grams citric acid produced / Equivalent grams hexose moietly supplied) * 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 ผลของอิออน ทองแดงและเหล็กในการผลิตกรดซิตริกจากกลูโคสของเชื้อ *A. niger* ใน submerged culture

Fe^{3+} (mg/liter)	Cu^{2+} (mg/liter)	Citric acid yield (%)
10	50	77.8
50	50	69.1
100	50	50.7
150	50	14.2
10	100	77.2
50	100	65.4
100	100	53.9
150	100	29.8
10	500	74.0
50	500	65.4
100	500	60.6
150	500	27.6

a.From Schweiger(1957) Medium composition : glucose (commercial grade). approx 14 % $(NH_4)_2CO_3$ 0.2% KH_2PO_4 0.014% $MgSO_4.7H_2O$ 0.1% Fe and Cu supplied as sulfates

b. (Grams citric acid produced/grams glucose supplied) * 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์

1. Wild type *Aspergillus niger* ATCC11414
2. Mutant *Aspergillus niger* PFK transformance

   Mutant *Aspergillus niger* PKI transformance

   ได้รับความอนุเคราะห์จาก C.P.Kubicek and M. Rohr Institute of Biochemical,University of Technology,A-1060 Vienna, Getreidemarkt 9, Austria

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. Stirrer
2. Suction pump
3. Shaker
4. Autoburet
5. Vortex
6. เครื่องแก้วต่าง ๆ

สารเคมี

1. Dowex 50
2. Sucrose
3. Glucose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Fructose

5. Lactose

6. Glycerol

7. $(NH_4)_2SO_4$

8. KH_2PO_4

9. NaCl

10. $MgSO_4$

11. Zn^{2+}

12. Fe^{2+}

13. HCl

14. NaOH

15. H_2SO_4

16. ฟีนอลฟทาลีน

การทดลอง

1. <u>การเตรียม inoculum</u>

เลี้ยง *Aspergillus niger* ใน potato dextrose agar slant เป็นเวลา 7 วัน ทำเป็น spore suspension โดยใช้น้ำเกลือ 0.85% และเขย่าให้เข้ากัน โดยใช้ vortex

2. <u>การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

2.1 เตรียม cation exchange

ชั่ง 100 กรัม Dowex 50 เติม 1 N HCl 500 มิลลิลิตร นำไปกวนเบา ๆ ด้วยเครื่อง magnetic stirrer นาน 10 นาที นำมากรองโดยใช้ suction pump จะได้ส่วนของเหลว และ เม็ดเรซิน นำส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปกวนเบานาน 10 นาที แล้วกรองอีกวัดค่า pH ให้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4-6 ถ้าไม่ได้ให้ล้างซ้ำด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรทำเช่นครั้งแรก จนได้ pH ตามต้องการ cation exchange ที่ได้จากขบวนการนี้จะนำมาใช้ในการเตรียม Sugar solution ต่อไป

2.2 เตรียม sugar solution

เตรียม sugar solution 14% โดยชั่งน้ำตาล sucrose 140 กรัม เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำ sugar solution 1 ลิตร เติม 100 กรัม cation exchange ที่ได้จากข้อ 2.1 นำไปกวนเบา ๆ ด้วยเครื่อง magnetic stirrer นาน 10 นาที กรองโดยใช้ suction pump จะได้น้ำตาลและส่วนของ cation exchange (resin) ส่วนของ resin นำไปแช่กรด 1 N HCl ให้อิ่มตัวแล้วนำกลับไปใช้ได้อีก ส่วนน้ำตาลที่ผ่านขบวนการ pretreatment แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ซึ่งจะได้ sugar solution ที่ปราศจากอิออนใด ๆ

2.3 ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2.2 แต่เปลี่ยนชนิดของน้ำตาล จาก sucrose เป็น glucose,fructose,lactose และ glycerol ตามลำดับ

3. นำน้ำตาลที่ผ่าน cation exchange ที่มีความเข้มข้น 14% มาทำการเจือจางให้เป็น

3.1 น้ำตาลที่มีความเข้มข้น 10% โดยนำน้ำตาล 14% มา 714.3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

3.2 น้ำตาลที่มีความเข้มข้น 7.5 % โดยนำน้ำตาล 14% มา 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

3.3 น้ำตาลที่มีความเข้มข้น 5% โดยนำน้ำตาล 14% มา 357.15 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

3.4 น้ำตาลที่มีความเข้มข้น 2.5% โดยนำน้ำตาล 14% มา178.6 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

จากนั้นนำน้ำตาลที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหาร (ภาคผนวก) ปรับ pH เป็น 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การถ่ายเชื้อ *Aspergillus niger*

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3 มา 50 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการ sterilized โดยใช้ความดัน 15 lb /ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงทำการถ่ายเชื้อ (จากข้อ 1) 1 มิลลิลิตร โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

ทำการตรวจหาปริมาณกรดเริ่มต้น โดยปิเปตอาหารมา 1 มิลลิลิตร ทำการไทเทรตกับ 0.01 N NaOH

นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เครื่อง shaker ที่ความเร็วรอบ 250 rpm ทำการตรวจหาปริมาณกรดซิตริก ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน

5. ตรวจหาปริมาณกรดซิตริก

ปิเปตสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 มิลลิลิตรเติมอินดิเคเตอร์ ฟีนอลฟทาลีน 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับ 0.01 N NaOH บันทึกผล คำนวณหาปริมาณกรดซิตริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ความสามารถในการผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* wild type, *A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance เปรียบเทียบในน้ำตาลระดับต่าง ๆ

4.1.1 น้ำตาลซูโครส

เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้ง 5 ระดับ คือ 14%, 10%, 7.5%, 5.0% และ 2.5% พบว่าเชื้อ *A. niger* wild type,*A. niger* PFK transformance, *A. niger* PKI transformance ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถใช้ซูโครส 14% ให้ผลผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครสในระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ให้ผลผลิตกรดซิตริกลดลงมา คือ 10%, 7.5%, 5.0% และ 2.5% ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลตามตาราง 4-1 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากว่า น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 14% เป็นระดับน้ำตาลที่พอเหมาะสำหรับการเจริญของเชื้อ *A. niger* เพื่อผลิตกรดซิตริกซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ M. Rohr และ C.P. Kubicek (1989) ได้ใช้น้ำตาลซูโครส 14% เพื่อเลี้ยง *A. niger* ในการผลิตกรดซิตริกและได้ผลผลิตสูงสุด

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตสูงสุดของกรดซิตริก ระหว่าง *A. niger* wild type และ *A. niger* mutant(PFK transformance และ PFK transformance) พบว่า *A. niger* wild type จะให้ผลผลิตสูงกว่าเชื้อ *A. niger* mutant ทั้ง 2 ชนิด เมื่อใช้น้ำตาลซูโครส ทั้ง 5 ระดับ

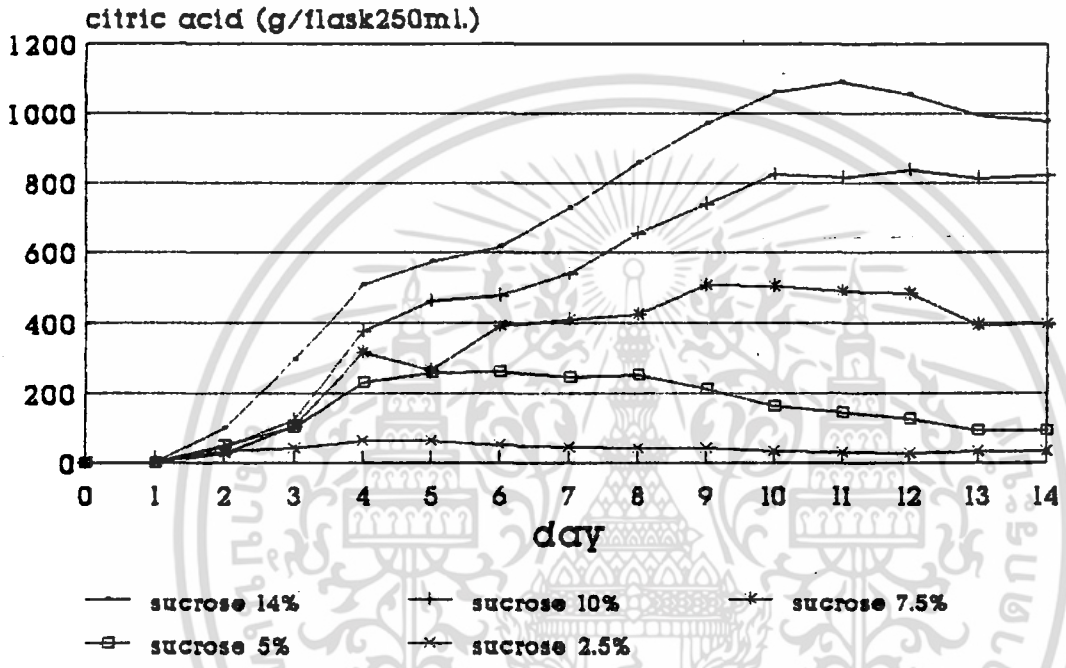
A. niger ทั้ง 3 ชนิด สามารถใช้น้ำตาลซูโครส 14% และ10% ให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดในช่วง 11-14 วัน , น้ำตาลซูโครส 7.5% ให้ผลผลิตสูงสุดในช่วง 8-11 วัน , น้ำตาลซูโครส 5% ให้ผลผลิตสูงสุดในช่วง 6-8 วัน และน้ำตาลซูโครส 2.5% ให้ผลผลิตสูงสุดในช่วง 4-6 วันโดยจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุด ตามรูปที่ 4-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-1 แสดงผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ที่ได้จากการใช้น้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *A. niger* wild type , *A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance

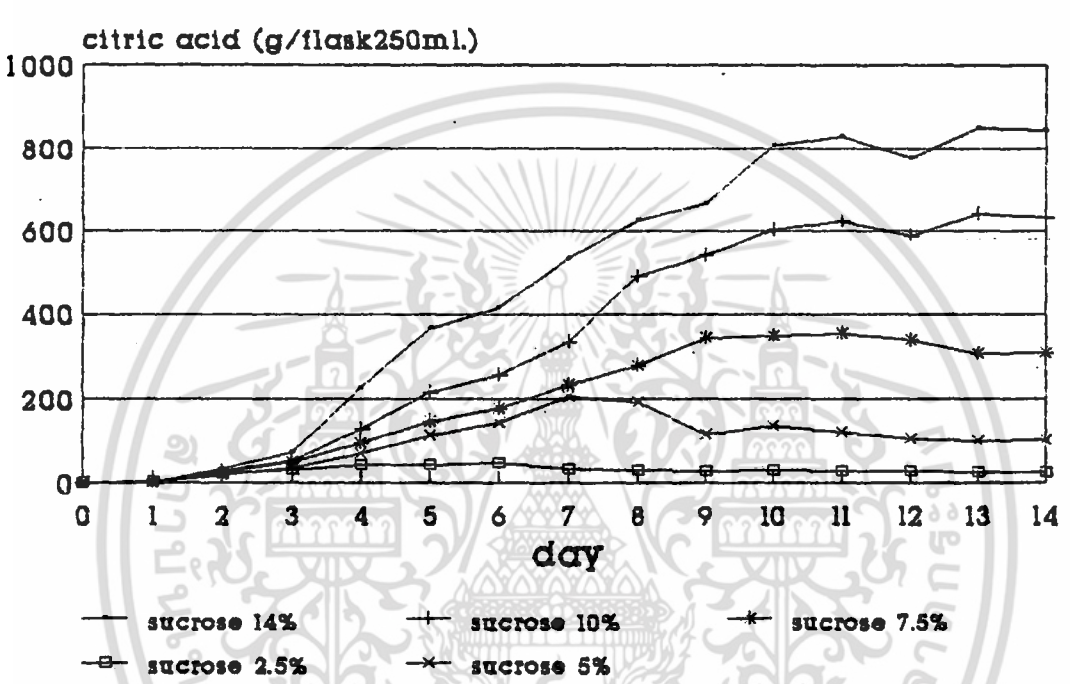
ชนิดของเชื้อ *A. niger*	ผลผลิตกรดซิตริก (%)				
	ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (%)				
	14%	10%	7.5%	5.0%	2.5%
wild type	155.89	119.42	72.26	37.36	9.11
PFK transformance	121.01	91.71	50.40	29.27	6.92
PKI transformance	76.51	43.78	12.89	7.82	5.03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



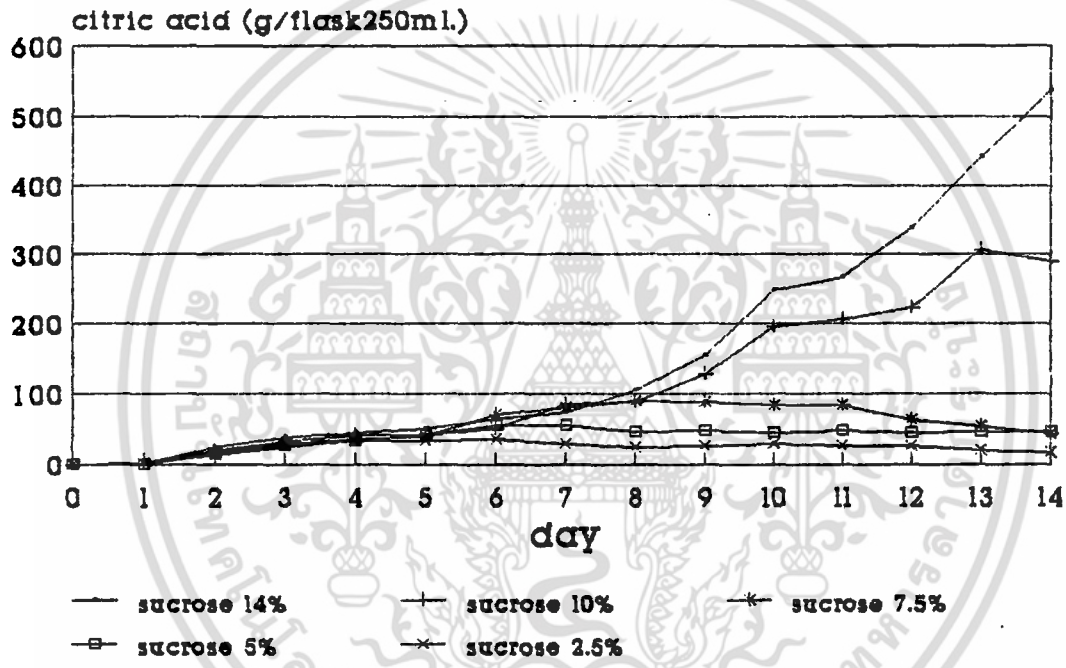
รูปที่ 4-1 ก แสดงปริมาณกรดซิตริก ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* wild type ซึ่งใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 14% ,10% ,7.5% ,5% และ 2.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-1 ข แสดงปริมาณกรดซิตริก ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PFK transformance ซึ่งใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 14% ,10% , 7.5% ,5% และ 2.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-1 ค แสดงปริมาณกรดซิตริก ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PKI transformance ซึ่งใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% ,5% และ 2.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 น้ำตาลกลูโคส

เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้ง 5 ระดับ คือ 14%, 10%, 7.5%, 5.0% และ 2.5% พบว่าเชื้อ *A. niger* wild type, *A. niger* PFK transformance, *A. niger* PKI transformance ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส 14% ให้ผลผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสในระดับความเข้มข้นอื่นๆ ให้ผลผลิตกรดซิตริกลดลงมา คือ 10%, 7.5%, 5.0% และ 2.5% ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลตามตาราง 4-2

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตสูงสุดของกรดซิตริก ระหว่าง *A. niger* wild type และ *A. niger* mutant(PFK transformance และ PFK transformance) พบว่า *A. niger* wild type จะให้ผลผลิตสูงกว่าเชื้อ *A. niger* mutant ทั้ง 2 ชนิด เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส ทั้ง 5 ระดับ

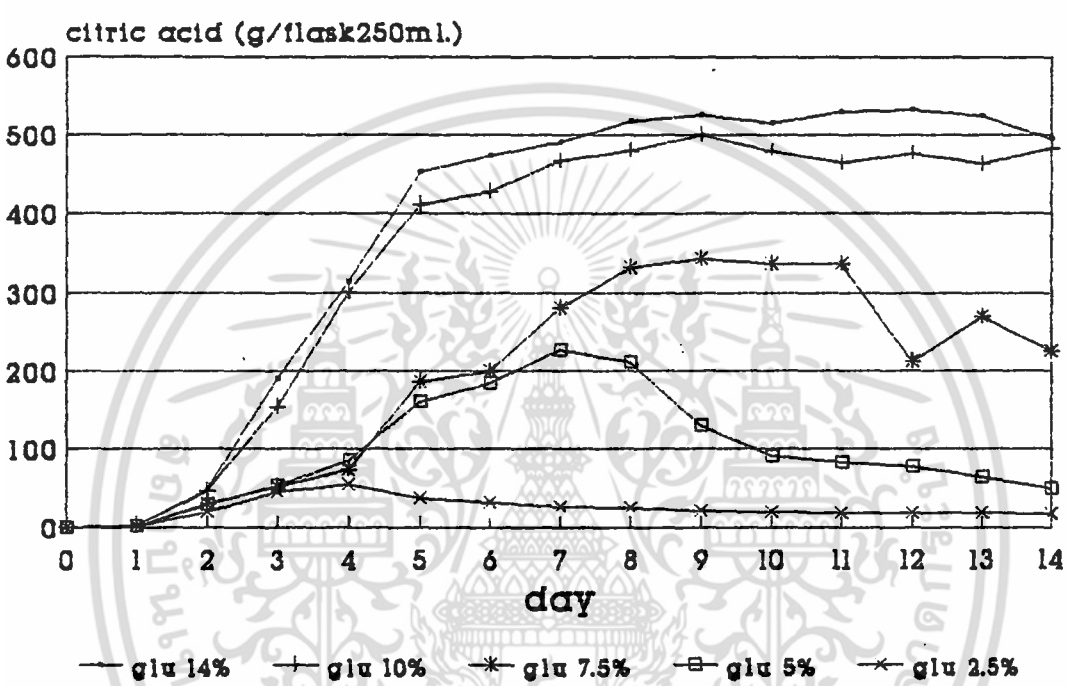
A. niger ทั้ง 3 ชนิด สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส 14% ให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดในช่วง 11-13 วัน ,น้ำตาลกลูโคส 10% และ 7.5% ให้ผลผลิตสูงสุดในช่วง 9-12 วัน , น้ำตาลกลูโคส 5% ให้ผลผลิตสูงสุดในช่วง 7-8 วัน และน้ำตาลกลูโคส 2.5% ให้ผลผลิตสูงสุดช่วงวันที่ 4-5 โดยจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุด ตามรูปที่ 4-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-2 แสดงผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *A. niger* wild type , *A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance

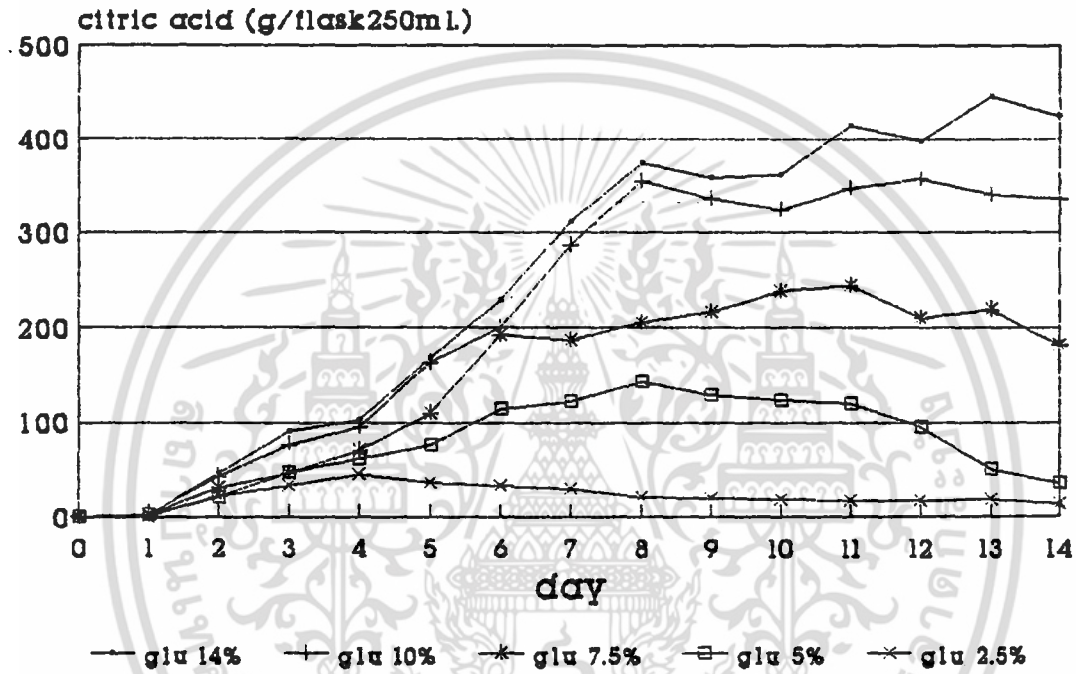
ชนิดของเชื้อ *A. niger*	ผลผลิตกรดซิตริก (%)				
	ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (%)				
	14%	10%	7.5%	5.0%	2.5%
wild type	76.11	71.47	48.89	32.43	7.93
PFK transformance	63.22	53.12	36.07	23.66	5.44
PKI transformance	63.62	50.98	34.82	20.39	6.31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



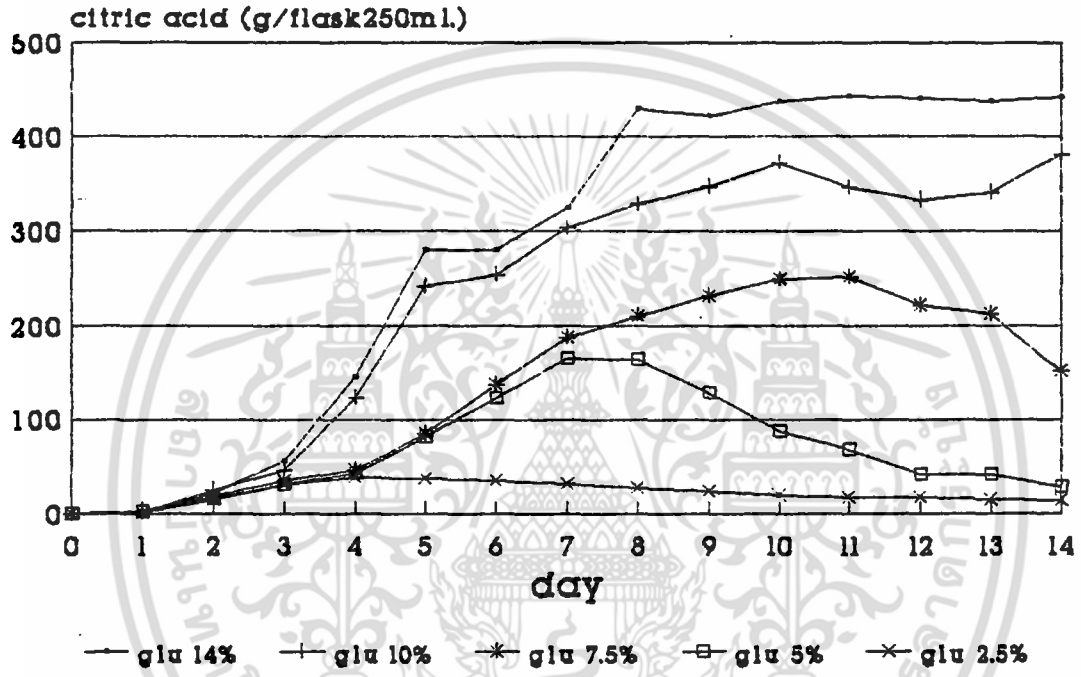
รูปที่ 4-2 ก แสดงปริมาณกรดซิตริก ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* wild type ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% ,5% และ 2.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-2 ข แสดงปริมาณกรดซิตริก ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PFK transformance ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14% ,10% ,7.5% ,5% และ 2.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-2 ค แสดงปริมาณกรดซิตริก ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PKI transformance ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% ,5% และ 2.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 น้ำตาลฟรุกโตส

เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้ง 5 ระดับ คือ 14%, 10%, 7.5%, 5.0% และ 2.5% พบว่าเชื้อ *A. niger* wild type, *A. niger* PFK transformance, *A. niger* PKI transformance ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถใช้น้ำตาลฟรุกโตส 14%ให้ผลผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบในระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ให้ผลผลิตกรดซิตริกลดลงมา คือ 10%, 7.5%, 5.0% และ 2.5% ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลตามตาราง 4-3

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตสูงสุดของกรดซิตริก ระหว่าง *A. niger* wild type และ *A. niger* mutant(PFK transformance และ PFK transformance) พบว่า *A. niger* wild type จะให้ผลผลิตสูงกว่าเชื้อ *A. niger* mutant ทั้ง 2 ชนิด เมื่อใช้น้ำตาลฟรุกโตส ทั้ง 5 ระดับ

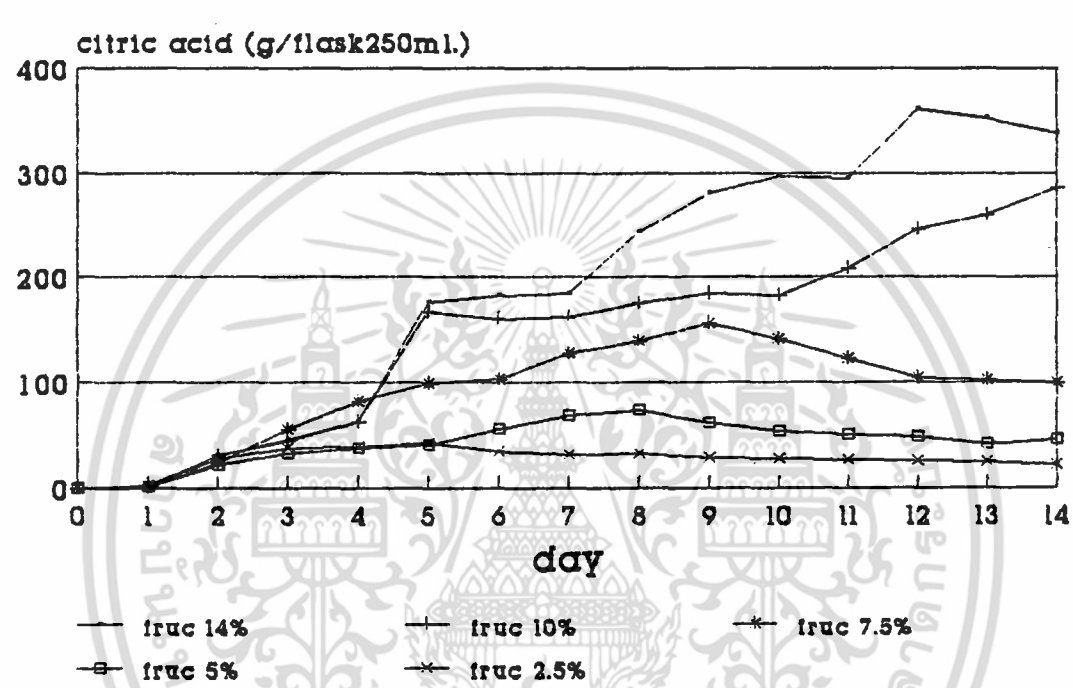
A. niger ทั้ง 3 ชนิด สามารถใช้น้ำตาลฟรุกโตส 14% และ 10% ให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดในช่วง 12-14 วัน ,น้ำตาลฟรุกโตส 7.5% และ 5.0% ให้ผลผลิตสูงสุดในช่วง 7-9 วัน และน้ำตาลฟรุกโตส 2.5% ให้ผลผลิตสูงสุดในช่วง 4-5 โดยจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุด ตามรูปที่ 4-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-3 แสดงผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ที่ได้จากการใช้น้ำตาลฟรุกโตสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *A. niger* wild type , *A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance

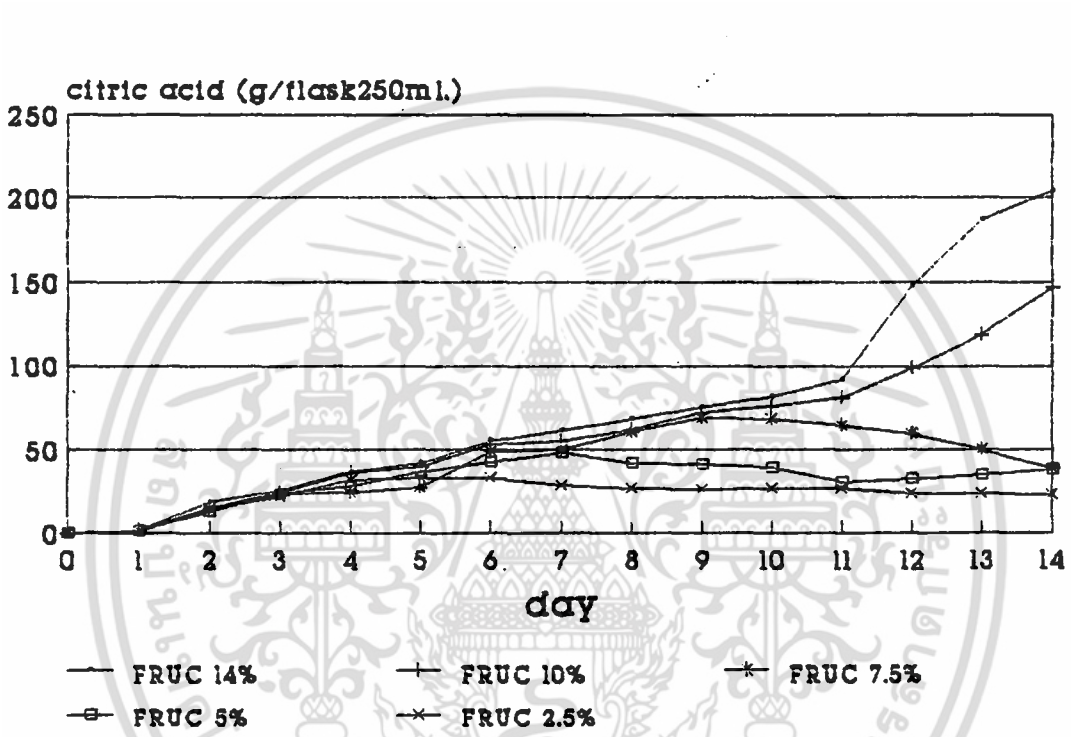
ชนิดของเชื้อ *A. niger*	ผลผลิตกรดซิตริก (%)				
	ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตส (%)				
	14%	10%	7.5%	5.0%	2.5%
wild type	51.69	40.78	22.17	10.54	6.13
PFK transformance	29.11	21.03	12.69	6.89	4.73
PKI transformance	45.45	23.71	15.58	5.77	5.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



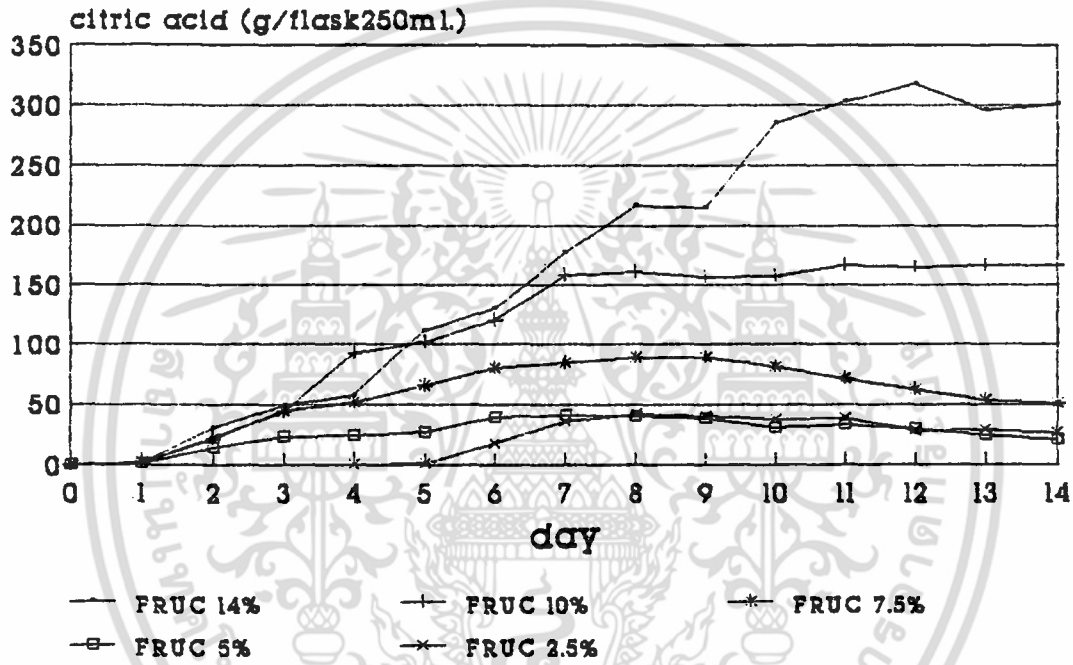
รูปที่ 4-3 ก แสดงปริมาณกรดซิตริก ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger wild type* ซึ่งใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14%, 10% , 7.5% ,5% และ 2.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-3 ข แสดงปริมาณกรดซิตริก ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PFK transformance ซึ่งใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% ,5% และ 2.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-3 ค แสดงปริมาณกรดซิตริก ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PKI transformance ซึ่งใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14% , 10% ,7.5% ,5% และ 2.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 น้ำตาลแลคโตส

เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้ง 5 ระดับ คือ 14%, 10%, 7.5%, 5.0% และ 2.5% พบว่าเชื้อ *A. niger* wild type, *A. niger* PFK transformance, *A. niger* PKI transformance ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 4-4 และเมื่อดูแนวโน้มการผลิตกรดซิตริกในแต่ละวันโดยเฉลี่ยแล้ว พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลแลคโตส 14% ให้ผลผลิตสูงกว่า 10%, 7.5%, 5.0% และ 2.5% ตามลำดับ

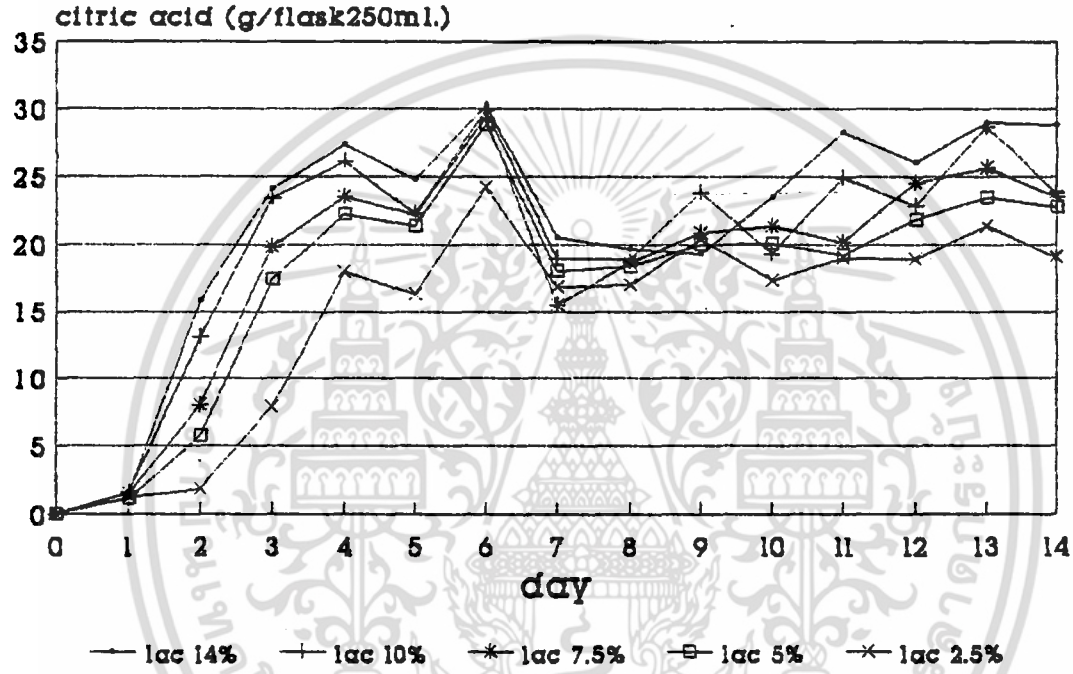
จากรูป 4-4 การผลิตกรดซิตริกโดยใช้น้ำตาลแลคโตสในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จะให้ผลผลิตขึ้นลงตลอดการทดลอง และ % ผลผลิตที่ได้จะใกล้เคียงกันเมื่อใช้เชื้อ *A. niger* ทั้ง 3 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-4 แสดงผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ที่ได้จากการใช้น้ำตาลแลคโตสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *A. niger* wild type , *A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance

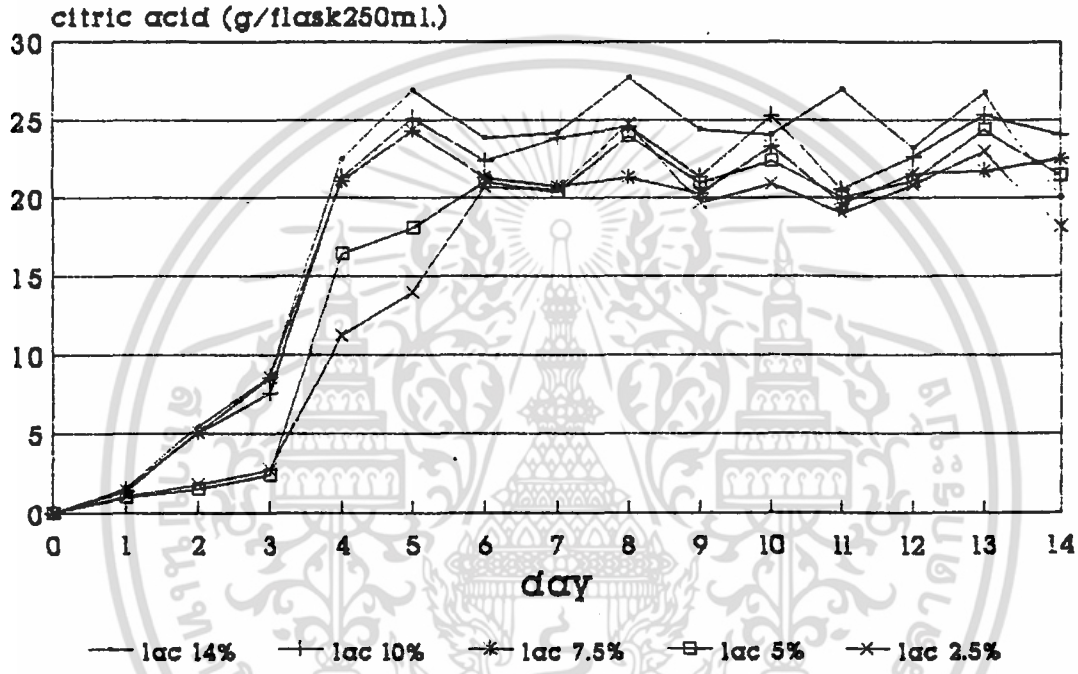
ชนิดของเชื้อ *A. niger*	ผลผลิตกรดซิตริก (%)				
	ความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตส (%)				
	14%	10%	7.5%	5.0%	2.5%
wild type	4.33	4.10	4.20	4.12	3.46
PFK transformance	3.96	3.62	3.48	3.49	3.54
PKI transformance	4.34	4.20	4.16	4.19	3.84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



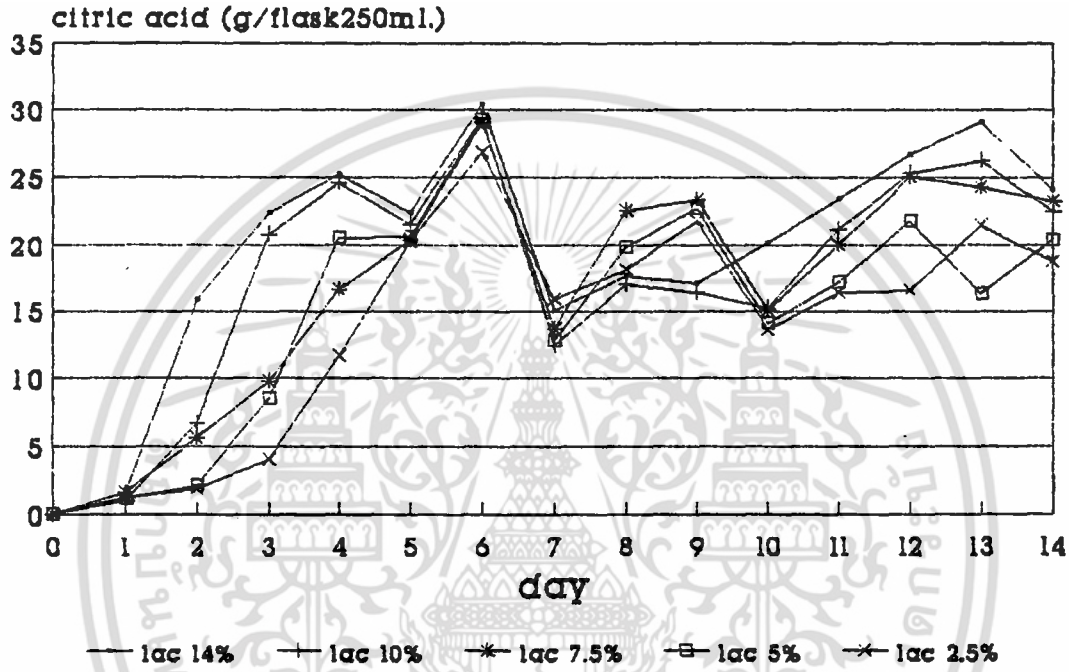
รูปที่ 4-4 ก แสดงปริมาณกรดซิตริก ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* wild type ซึ่งใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14% , 10%, 7.5% ,5% และ 2.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-4 ข แสดงปริมาณกรดซิตริก ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PFK transformance ซึ่งใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% ,5% และ 2.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-4 ค แสดงปริมาณกรดซิตริก ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger* PKI transformance ซึ่งใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% ,5% และ 2.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 น้ำตาลกลีเซอรอล

จากการทดลองพบว่า เชื้อ *A. niger* wild type ,*A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance ไม่สามารถเจริญในน้ำตาลชนิดนี้ โดยจะไม่มีการ form ตัวเป็นเมล็ดกลม และเมื่อศึกษาปริมาณกรดซิตริก ซึ่งพบว่าไม่เพิ่มขึ้นตลอดระยะการทดลอง

ตารางที่ 4-5 แสดงผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *A. niger* wild type ,*A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance

ชนิดของเชื้อ *A. niger*	ผลผลิตกรดซิตริก (%)				
	ความเข้มข้นของน้ำตาลกลีเซอรอล (%)				
	14%	10%	7.5%	5.0%	2.5%
wild type	-	-	-	-	-
PFK transformance	-	-	-	-	-
PKI transformance	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ความสามารถในการผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* wild type *A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance โดยพิจารณาในแง่ชนิดน้ำตาล ที่ระดับความเข้มข้น 14%

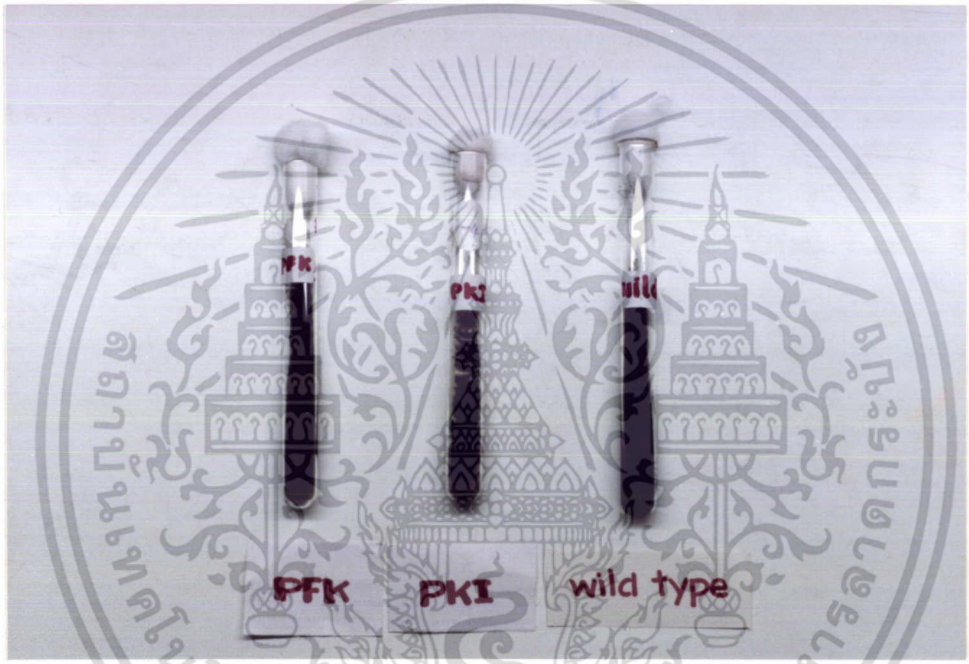
A. niger wild type, *A. niger* PFK transformance และ PKI transformance สามารถใช้น้ำตาลซูโครส 14% ในการผลิตกรดซิตริกได้ดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลแลคโตสนั้นเชื้อทั้ง 3ชนิด สามารถใช้ในการผลิตได้น้อย เมื่อเทียบกับน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดข้างต้นและน้ำตาลกลีเซอรอลนั้นไ ม่สามารถใช้ได้ ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 4-6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-6 แสดงผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ที่ได้จากน้ำตาลชนิดต่างทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 14% โดยเชื้อ *A. niger* wild type , *A. niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformance

ชนิดของเชื้อ *A. niger*	ผลผลิตกรดซิตริก (%)				
	ชนิดน้ำตาลที่ความเข้มข้น 14%				
	ซูโครส	กลูโคส	ฟรุกโตส	แลคโตส	กลีเซอรอล
wild type	155.89	76.11	51.69	4.33	-
PFK transformance	121.01	63.22	29.11	3.96	-
PKI transformance	76.51	63.62	45.45	4.34	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-5 แสดงเชื้อ *Aspergillus niger* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ใน PDA slant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4-6 แสดงลักษณะ Ion exchange resin (Dowex 50)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4-7 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อ *A. niger* เมื่อเลี้ยงในน้ำตาล Fructrose ที่ปราศจากมังกานีส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4-8 แสดงลักษณะการเจริญของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีมังกานีส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4-9 แสดงลักษณะการเลี้ยงเชื้อในระดับ shaker

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดซิตริก ในน้ำตาลแต่ละชนิด ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลแลคโตส และน้ำตาลกลีเซอรอล พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *A. niger* wild type สามารถใช้น้ำตาลเหล่านี้ ในการผลิตกรดซิตริกได้มากกว่า เชื้อ *A.niger* PFK transformance และ *A. niger* PKI transformanc

ส่วนการใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เชื้อทั้ง 3 ชนิด สามารถใช้ในการผลิตกรดซิตริกได้พอ ๆกัน

2. จากการศึกษาการเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลทั้ง 5 ชนิด พบว่า เชื้อ *A. niger* PFK transformance และ เชื้อ *A. niger* PKI transformance สามารถใช้น้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซิตริกได้ดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลแลคโตส สามารถใช้ได้บ้าง และน้ำตาลกลีเซอรอล พบว่าไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้

3. จากการศึกษาเปรียบเทียบการใช้น้ำตาล ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส และแลคโตส พบว่าเชื้อ *A. niger* ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถใช้น้ำตาลในการผลิตกรดซิตริกได้ดีที่สุด คือที่ระดับความเข้มข้น 14 % รองลงมาที่ระดับความเข้มข้น 10 % , 7.5 % , 5.0 % และ 2.5 % ตามลำดับ

4. จากการศึกษาเปรียบเทียบการใช้น้ำตาล ในระดับความเข้มข้น 14 % และ 10 % พบว่าเชื้อ *A. niger* ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีแนวโน้มว่า การผลิตกรดซิตริกจะได้ปริมาณสูงในช่วง 10 - 14 วัน ส่วนน้ำตาลในระดับความเข้มข้นรองลงมาคือ ที่ความเข้มข้น 7.5 % , 5.0 % , และ 2.5 % จะได้ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดในช่วงวันที่เร็วขึ้น

5. จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกนั้น คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้น้ำตาลซูโครส ที่ระดับความเข้มข้น 14 % ดังนั้นในการทดลองซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตกรดซีตริก หรือการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม ควรจะเลือกใช้สภาวะดังกล่าวเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

1. สูตรอาหาร

1.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

สารละลายน้ำตาลที่ผ่าน cation exchange 1 ลิตร เติม

$(NH_4)_2SO_4$	2.50	กรัม
KH_2PO_4	0.15	กรัม
NaCl	0.15	กรัม
$MgSO_4$	1.10	กรัม
Zn^{2+}	1.50	มิลลิกรัม
Fe^{2+}	0.10	มิลลิกรัม

ปรับ pH ให้ได้ 3 โดยใช้ H_2SO_4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 สารละลายฟีนอลฟทาลีน (phenolphthalein)

ชั่งฟีนอลฟทาลีน 2.5 กรัม ละลายใน เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้นร้อยละ 75 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2.2 สารละลายมาตรฐานของโซเดียมไฮดรอกไซด์

การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์หาได้โดยการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ซึ่งเป็นสารมาตรฐานปฐมภูมิ

ก. สารละลายมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต(potassium hydrogen phthalate, $HKC_8H_4O_4$) เตรียมได้โดยนำโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตชนิดรีเอเจนต์เกรด นำไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ นำมาชั่งให้ได้น้ำหนักของสารที่แน่นอน และมีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 2.0 - 2.4 กรัม นำมาละลายในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายนี้

ข. สารละลายสต๊อกโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 50 ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เป็นของแข็ง หนัก 250 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือด และตั้งทิ้งไว้จนเย็น ถึงอุณหภูมิห้อง จำนวน 500 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ควรแช่บีกเกอร์ในน้ำเพื่อถ่ายเทความร้อน บรรจุสารละลายที่ได้ลงในขวดโพลีเอทิลลีน

ค. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ปราศจากคาร์บอเนตเข้มข้นประมาณ 0.10 F เตรียมได้โดยต้มน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ให้เดือนประมาณ 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น จนถึงอุณหภูมิห้อง ใช้กระจกนาฬิกาปิดปากบีกเกอร์ไว้ นำสารละลายสต๊อกโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากข้อ ข. มา 4 มิลลิลิตร เติมลงไป แล้วใช้แท่งแก้วค่อย ๆ คน พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศขณะที่คน ถ่ายสารละลายที่ได้ทั้งหมดลงในขวดที่มีจุกปิดให้แน่น ถ้าเป็นขวดพอลีเอทิลลีน ที่มีจุกเกลียวปิดจะดีมาก เก็บสารละลายนี้ไว้ใช้ตลอดการทดลอง

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การไตเตรทหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

- นำสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมได้ ในข้อ ค. จะต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิในข้อ ก. โดยดำเนินการดังนี้

1. บรรจุสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ลงในออโตบิวเรต

2. ใช้บิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจน-พทาเลตใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 150-250 มิลลิลิตร แล้วเติม 2-3 หยดสารละลายฟีนอลฟทาลินลงไป เขย่าสารละลายที่ได้ แล้วนำไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จากออโตบิวเรต จนได้สีชมพูอ่อนเกิดขึ้น บันทึกระดับของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้

3. ทำการไตเตรทซ้ำอีกครั้ง หาปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้จะต้องไม่แตกต่างกันเกินกว่า 0.1 มิลลิลิตร ถ้าเกินต้องทำการไตเตรทซ้ำอีก แล้วนำปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใกล้กัน 2 ค่ามาหาค่าเฉลี่ย นำไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฯ

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Sucrose โดยเชื้อ *A.niger* wildtype ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล sucrose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
1	1.98	1.98	1.9	1.75	1.29
2	100.53	44.75	28.93	51.91	34.45
3	292.89	123.6	105.80	102.58	43.78
4	505.6	375.25	316.06	230.55	63.78
5	572.32	459.30	262.95	256.98	63.78
6	615.94	474.86	391.08	261.49	50.7
7	726.63	537.83	409.56	247.22	46.57
8	856.76	655.09	425.36	252.37	43.40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Sucrose โดยเชื้อ *A.niger* wildtype ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล sucrose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
9	967.86	737.62	805.81	212.93	42.04
10	1060.1	823.11	504.18	163.48	35.25
11	1091.23	814.84	488.92	145.60	32.25
12	1052.57	835.96	480.96	128.82	28.36
13	993.14	812.21	394.56	95.38	33.56
14	974.78	820.89	397.69	93.24	34.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Sucrose โดยเชื้อ *A.niger* PFK transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล sucrose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
1	1.49	1.29	1.98	1.03	1.69
2	32.63	27.02	22.97	18.54	22.58
3	73.17	52.89	51.81	36.34	29.91
4	224.71	128.54	96.24	70.45	42.27
5	364.94	215.53	146.51	112.73	44.13
6	414.39	255.89	177.98	145.10	48.85
7	534.73	334.58	233.05	204.89	33.93
8	626.88	492.09	277.01	193.39	30.92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Sucrose โดยเชื้อ *A.niger* PFK transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล sucrose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
9	665.52	542.57	342.21	116.21	29.37
10	807.27	602.14	348.16	135.45	31.03
11	827.83	623.03	352.80	122.35	29.31
12	776.57	587.16	337.29	105.79	27.32
13	847.09	641.97	306.32	100.43	26.92
14	842.8	632.3	307.50	104.17	26.91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Sucrose โดยเชื้อ *A.niger* PKI transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล sucrose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
1	1.66	1.48	1.84	0.96	1.96
2	24.37	20.4	17.28	15.84	13.96
3	38.77	32.64	28.92	27.36	23.82
4	44.77	41.28	35.04	33.12	33.04
5	49.81	41.76	39.60	40.8	34.24
6	64.21	50.40	69.17	54.72	35.2
7	73.33	85.2	80.64	54.24	28.32
8	105.24	88.8	90.24	45.6	25.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Sucrose โดยเชื้อ *A.niger* PKI transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล sucrose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
9	153.01	127.2	87.84	46.56	26.40
10	247.87	194.88	84.00	44.64	28.32
11	267.25	206.40	84.00	46.56	25.92
12	338.29	223.20	62.88	44.68	25.92
13	441.01	306.48	53.08	45.61	19.44
14	535.57	289.44	43.20	46.08	17.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Glucose โดยเชื้อ *A.niger* wildtype ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล glucose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
1	1.96	1.8	1.36	1.36	1.28
2	47.58	46.56	30.72	28.92	19.97
3	191.28	154.8	51.72	53.04	45.49
4	314.81	300.64	73.92	85.92	55.49
5	451.20	410.96	186.82	161.96	36.77
6	473.76	427.68	200.64	185.28	32.16
7	490.56	466.72	280.48	227.04	26.93
8	516.96	479.52	331.68	211.2	24.77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Glucose โดยเชื้อ *A.niger* wildtype ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล glucose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
9	525.6	500.32	342.24	130.28	20.69
10	514.40	478.08	335.52	91.20	19.49
11	529.68	463.68	336.0	82.4	19.01
12	532.80	475.20	212.16	77.28	18.53
13	523.68	461.76	270.24	64.80	18.14
14	494.40	482.88	226.08	49.52	17.57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Glucose โดยเชื้อ *A.niger* PKI transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล glucose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
1	1.44	1.16	1.32	1.64	1.00
2	20.88	24.48	17.76	15.84	14.21
3	55.20	45.84	34.08	30.48	29.81
4	145.44	123.36	45.60	42.72	38.09
5	280.08	241.92	85.44	81.12	36.53
6	279.84	253.92	137.28	122.88	34.85
7	324.24	303.60	188.60	165.60	31.01
8	428.64	329.28	210.29	164.16	27.09

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Glucose โดยเชื้อ *A.niger* PKI transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล glucose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
9	357.91	336.17	217.16	128.49	18.91
10	362.00	324.16	237.96	122.99	17.36
11	414.03	347.30	243.72	119.95	16.56
12	397.95	356.83	209.92	95.31	16.08
13	445.31	346.12	219.01	50.59	17.20
14	424.38	336.51	180.92	35.87	13.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Glucose โดยเชื้อ *A.niger* PKI transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล glucose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
1	1.33	1.80	1.99	1.68	1.33
2	45.47	42.67	29.48	20.13	21.30
3	91.04	75.46	45.38	46.45	32.07
4	102.79	95.04	70.82	60.82	44.15
5	167.74	163.91	109.24	75.99	35.99
6	229.38	200.83	19 2.63	113.69	32.73
7	311.28	256.33	186.62	122.2	28.77
8	373.66	355.33	206.17	142.72	19.88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Glucose โดยเชื้อ *A.niger* PKI transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล glucose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
9	421.20	347.52	231.84	128.40	22.89
10	436.80	371.82	249.36	86.72	18.61
11	442.56	345.60	252.48	68.32	16.53
12	440.64	332.40	221.76	41.68	16.69
13	437.28	340.80	212.64	40.80	14.48
14	441.60	380.40	152.64	27.44	13.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Fructose โดยเชื้อ *A.niger* wild type ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล fructose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
1	1.2	1.92	1.29	1.36	1.73
2	30.48	30.08	23.36	21.57	27.82
3	45.84	44.48	56.16	32.76	37.82
4	62.97	62.24	82.00	37.56	38.33
5	176.08	166.22	98.56	40.69	42.88
6	181.60	159.20	102.72	55.24	34.73
7	184.24	162.08	127.36	68.77	31.14
8	243.48	175.04	138.75	73.80	32.61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Fructose โดยเชื้อ *A.niger* wild type ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล fructose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
9	251.04	183.68	155.21	61.40	27.96
10	297.04	181.95	140.48	53.40	27.39
11	294.64	207.84	122.08	51.00	26.54
12	361.84	246.40	104.32	48.29	25.25
13	352.72	260.04	102.24	41.88	24.83
14	358.48	285.44	99.04	45.09	21.87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาลFructoseโดยเชื้อ *A.niger* PFK transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล fructose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
1	1.19	1.11	1.80	1.60	1.38
2	18.14	14.67	21.44	12.68	13.96
3	25.27	24.33	44.18	23.14	21.56
4	36.61	35.95	51.20	27.64	31.82
5	41.97	40.10	65.44	36.45	33.10
6	54.70	52.83	79.68	42.37	32.90
7	61.39	55.07	84.32	48.20	28.37
8	67.92	61.76	88.80	41.48	26.80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาลFructoseโดยเชื้อ *A.niger* PFK transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล Fructose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
9	75.21	71.88	88.16	40.55	26.05
10	81.22	75.47	80.32	39.41	26.57
11	91.68	80.72.	70.40	30.21	26.62
12	147.44	98.76	61.76	32.53	23.47
13	186.65	118.65	53.28	34.76	23.31
14	203.77	147.24	50.72	37.97	23.07

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Fructose โดยเชื้อ *A.niger* PKI transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล fructose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
1	1.97	1.77	1.30	1.34	1.00
2	30.44	22.24	14.80	14.67	18.12
3	48.48	43.26	23.18	22.79	35.55
4	57.92	92.00	24.16	23.96	41.63
5	111.12	101.44	27.24	27.01	39.87
6	130.01	120.34	48.36	38.75	36.94
7	176.40	158.11	56.64	40.36	37.95
8	216.22	160.48	102.87	39.66	27.23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Fructose โดยเชื้อ *A.niger* PKI transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล fructose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
9	214.24	156.64	109.09	38.36	28.80
10	285.52	157.69	68.02	29.82	25.47
11	302.80	166.16	64.27	32.64	22.75
12	318.16	164.48	59.42	29.42	22.03
13	296.08	165.92	49.82	24.27	22.75
14	301.32	166.00	38.75	20.02	22.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Lactose โดยเชื้อ *A.niger* wildtype ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล lactose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
1	1.6	1.64	1.58	1.15	1.2
2	15.84	13.05	7.95	5.7	1.87
3	24.12	23.47	19.52	17.37	7.79
4	27.35	26.13	23.52	22.2	17.95
5	24.74	22.30	22.17	21.55	16.27
6	30.30	29.97	29.37	28.87	24.21
7	20.57	18.97	15.50	18.03	16.83
8	19.65	18.91	18.67	18.37	16.99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Lactose โดยเชื้อ *A.niger* wildtype ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล lactose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
9	19.30	23.80	20.87	20.00	20.35
10	23.50	19.30	21.35	20.07	17.31
11	28.30	24.97	20.13	19.23	19.00
12	26.07	22.85	24.50	21.8	18.91
13	29.00	28.67	25.67	23.47	21.31
14	28.84	23.83	23.50	22.75	19.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Lactose โดยเชื้อ *A.niger* PFK transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล lactose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
1	1.57	1.40	1.48	1.00	1.09
2	5.49	5.09	5.04	1.53	1.79
3	8.66	7.58	5.60	2.37	2.74
4	22.51	21.29	21.11	16.39	11.19
5	26.89	25.14	24.35	18.08	13.96
6	23.87	22.36	21.28	21.03	20.68
7	24.18	23.86	20.79	20.34	20.58
8	27.72	24.61	21.33	24.02	24.76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Lactose โดยเชื้อ *A.niger* PFK transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล lactose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
9	24.40	21.35	20.31	20.96	19.72
10	24.06	25.26	23.34	22.39	20.91
11	26.95	20.54	19.63	20.02	19.04
12	23.27	22.62	21.57	21.13	20.85
13	26.72	25.36	21.74	24.42	22.95
14	20.01	23.83	22.51	21.41	18.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Lactose โดยเชื้อ *A.niger* PKI transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล lactose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
1	1.57	1.40	1.48	1.00	1.09
2	5.49	5.09	5.04	1.53	1.79
3	8.66	7.58	5.60	2.37	2.74
4	22.51	21.29	21.11	16.39	11.19
5	26.89	25.14	24.35	18.08	13.96
6	23.87	22.36	21.28	21.03	20.68
7	24.18	23.86	20.79	20.34	20.58
8	27.72	24.61	21.33	24.02	24.76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลการใช้น้ำตาล Lactose โดยเชื้อ *A.niger* PKI transformance ที่ระดับความเข้มข้น 14% , 10% , 7.5% , 5% , 2.5%

วันที่	ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล lactose (%)				
	14%	10%	7.5%	5%	2.5%
9	17.12	16.37	23.36	22.75	21.79
10	20.16	15.17	15.04	14.11	13.63
11	23.44	21.17	20.00	17.17	16.35
12	26.76	25.30	25.12	21.79	16.50
13	29.20	26.30	24.32	16.27	21.48
14	24.12	22.53	23.28	20.39	18.75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

การคำนวณหาปริมาณกรดซิตริก

1. การหาความเข้มข้นของกรดซิตริก (N)

จากสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$

ความเข้มข้น x ปริมาณตัวอย่าง = ปริมาณ NaOH x ความเข้มข้น

กรดซิตริก ที่ใช้ NaOH

ปริมาณตัวอย่าง = 1 ml.

ความเข้มข้นกรดซิตริก = ปริมาณ NaOH x ความเข้มข้น

ที่ใช้ NaOH

2. การหาปริมาณกรดซิตริก/flask 250 ml.

flask 250 ml. บรรจุอาหาร 50 ml.

ปริมาณกรดซิตริก/litr = ความเข้มข้น x มวลโมเลกุล

กรดซิตริก

มวลโมเลกุลกรดซิตริก = 192

ปริมาณกรดซิตริก/flask = ความเข้มข้น x 192 x 50 ml.

(g) กรดซิตริก

1000

3. การหา % ผลผลิตที่ได้

ความเข้มข้นน้ำตาลเป็น X

ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 ml. จะมีปริมาณน้ำตาล 2X กรัม

% ผลผลิตที่ได้ = ปริมาณกรดซิตริก/flask x 100

2X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิราภรณ์ โลห์วงศ์วัฒน "การผลิตกรดซิตริกจากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger*" วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2525

นิมล กิจขันธ์ "ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลวโดย *Aspergillus niger*" วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2532

ลูกจันทร์ กุลรัศมีจันทร์ และ ทะนง ภัครัชพันธุ์ "การคัดเลือกเชื้อราเพื่อใช้ในการผลิตกรดซิตริก" วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2519

วรพจน์ สุนทรสุข "การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อผลิตกรดมะนาวและเอ็นไซม์กลูโคอะไมเลส" วิทยาพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2533

วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต <u>เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม</u> หน้า 84-108, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ ,2532

Akiyana, S., Suzuki, T. , Sumino, Y. , Nakoo, Y. and Fukuda, H, "Induction and citric acid productivity of fluoroacetate - sensitive mutant strains of *Candida lipolytica*" <u>Agr. Biol. Chem.</u> 37(4).(1973): 879-884.

Andrew, J.M. "Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture" <u>Appl. microbiol.</u> 1(1952): 7-13.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anfinsen, C.B. Method in Enzymology, (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. eds.) Vol.1,pp.695-699, Academic Press, New York, 1955.

Banno, I., Hasegawa, T. and Iizuka, H. "A taxonomic investigation of acid producing yeasts" J. Ferment. Technol. 49(3), (1971): 165-179.

Bucher, T. and Pfleiderer, G. Method in Enzymology (Colowick,S.P. and Kaplan, N.O. eds.) Vol.1,pp 435, Academic Press, New York, 1955.

Clark, D.S., Ito, K. and Horitsu, H. "Effect of manganese and other heavy metals and submerged citric acid fermemtation of molasses" Biotechnol. Bioeng. 8(1966): 465-471.

Furukawa, T., Matsuyoshi, T., Minoda, Y. and Yamada, K. "Fermentative production of citric acid from m-paraffin dy yeasts" J. Ferment. Technol. 55(4).(1977): 356-363.

Gardner, J.F., James, L.V. and Rubbo, S.D. "Production of citric acid by mutants of *A. niger*" J. Gen. Microbiol. 14(1956): 228-237.

Gerhardt, P., Dorrell, W.W. and Baldwin, T.L. "Citric acid fermentation of beet molasses" J. Bact. 52(5).(1946): 555 -564.

Hannan, M.A., Rabbi, F., Faizur Rahman, A.T.M. and Choudhury, N. "Analysis of some mutants of *A. niger* for citric acid Production" J. Ferment. Technol. 51(1973): 606-608.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hattori, K., Yokoo, S. and Inada, O. "Effect of ammonium ion on the ratio of citric acid to d-isocitric acid from n-paraffin" J. Ferment> Technol. 53(10).(1974): 752-756.

Hawley, G.G. The condensed chemical dictionary, 9th ed.,pp 52-58, Nostrand Reinhold Company, New York, 1977.

Heding, L.G. and Gupta, J.K. "Improvement of condition for precipitation of citric aid from fermentatin mash" Biotechnol.Bioeng.17(1975):1363-1364.

Hisanaga, W. and Nakamura, S. "Organic acid production"Japan Pat. 16555/66 Apr.14,1976.

Ikeno, Y., Masuda, M., Tanno, K., Oomori, I. and Takahashi, N. "Citric acid production from various raw materials by yeasts" J. Ferment. Technol. 53(10).(1975): 752-756.

James, L.V., Rubbo, S.D. and Gardener, J.F. "Isolation of high acid-yielding mutant of *A. niger* by a paper culture selection technique" J. Gen. Microbiol. 14(1956): 223-228.

Kapoor, K.K., Chaudhary, K., and Tauro, P. Citric acid in Prescott and Dunn' Industial Microbiology, (Reed, G. ed.) 4th ed., pp. 80-105, AVI Publishing Com.,Inc. Westport, Connecticut ,1982

Kirk, O. Encyclopidia of chemical, citric acid. 2nd ed., pp. 524-541, John Wiley and Sons, New York, 1964.

Kovats, J. "studies on submerged citric acid fermentation" Acta. Microbiol. Pol. 9(1960): 275-287.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kristainsen, B. and Sinclair, C.G. "Production of citric acid in batch culture" Biotechnol. Bioeng. 100(1978): 1711-1722.

Kubicek. ,C.P. and Rohr ,M. "Influence of Manganese on Enzyme Synthesis and Citric acid Accumulation in *Aspergillus niger*" Europeon J.Appl. Microbiol 4(1977): 167-175.

Kubicek. ,C.P. and Rohr ,M. "Novel trends in physiological and technology of citric and production pp. 263-269 , Acadamic Press , New York , 1982.

Kubicek. ,C.P. and Rohr ,M. "Citric acid Fermentation" Reviews in Biotechnol. 3(1986): 331-373.

Kubicek. ,C.P. , Zehentgruber , O. and Rohr , M. "An indirect method of studying the fine control of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*" Biotechnol Lett. 1(1979): 47-55.

Kundu, A.K. and Das, S. "Production of amylase in liquid culture by a strain of *Aspergillus oryzae*" Appl. Microbiol. 19(4) (1970): 598-603.

La Nauze, I.M. "Aconitase and isocitric dehydrogenase of *A. niger* in selection to citric acid product" J. Gen. Microbiol. 44(1966): 73-81.

Lakshminarayana, K., Chaudhary, K., Ethiraj, S. and Tauro, P. "A solid state fermentation method for citric acid production using sugarcane bagasse" Biotechnol. Bioleng. 17(1975): 291-293

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lockwood, L.B. and Schweiger, L.B. Citric and itaconic acid fermentations. in Microbial Technology ,pp.140-157. Reinhold Publishing Company, New York, 1967.

Mueller, H.M. "Oxalate accumulation from citrate by *Aspergillus niger*" Arch. Microbiol. 103(1975): 185-189.

Nara, H. "Seperation of citric acid and isocitric acid" Ger. Pat. 2,046,576 Apr.1, 1971.

Nelson, M. "A photometric adaptation of the samogyi method for determination of glucose" J. Biol. Chem. 153(1944): 375-380.

Perlman, D., Kita, D.A. and Peterson, W.H. "production of citric acid from cane molasses" Arch. Biochem. 10(1). (1946): 123-129.

Ranakrishnan, C.U., Stell, R. and Lent, C.P. "Machanism of citric acid fermentation and accumulation in *A. niger*" Arch. Biochem. Biophys. 55(1955): 270-273.

Schweiger, L.B. "Production of citric acid by fermentation" U.S. Pat 2,970,084 Jan. 31,1961

Tabuchi, T., Serizawa, N. and Uchiyana, H. "A novel pathway for the partial oxidation of propionyl-CoA to pyruvate via seven-carbon tricarboxylic acids in yeast" Agric. Biol. Chem. 38(1974): 2571-2572.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้