สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดซิตริกจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำผลไม้โดยการหมักของจุลินทรีย์

นายคมน์ สุภาพเพชร
นายเทียรชัย ชาญสง่าเวช
นางสาวเสาวลักษณ์ อรัญชราธร

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2538

ปพ.
ต 1488
2538
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 25408
วัน, เดือน, ปี 9 ก.ค. 2539

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Citric Acid Production From Fruit Processing Waste By Microorganisms

Mr. Khom Suparppech

Mr. Thianchai Charnsangavech

Miss Saowaluk Aruncharathorn

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1995

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้าอนุมัติ

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตกรดซิตริกจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำผลไม้โดยการหมักของจุลินทรีย์

โดย นายคมน์ สุภาพเพชร
นายเทียรชัย ชาญสง่าเวช
นางสาวเสาวลักษณ์ อรัญชราธร

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อ.อรไท สุขเจริญ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(ดร.อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(รศ.ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์) ประธานกรรมการ

(ดร.อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล) กรรมการ

(อาจารย์อรไท สุขเจริญ) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตกรดซิตริกจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำผลไม้โดยการหมักของเชื้อจุลินทรีย์

นักศึกษา นายคมน์ สุภาพเพชร
นายเทียรชัย ชาญสง่าเวช
นางสาวเสาวลักษณ์ อรัญชราชร

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ อรไท สุขเจริญ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2538

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการผลิตกรดซิตริก โดยการนำน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และสารอินทรีย์เหลืออยู่สูง มาปรับสภาพให้มีค่าความเป็นกรดเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และเติมเมทานอลร้อยละ 4.0 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Aspergillus ficuum* (Reichart) Hennings ATCC 12845 สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด 24.2 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการหมักที่อุณหภูมิห้องและความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณกรดซิตริกที่วัดได้ในการหมักในวัตถุดิบที่ไม่ได้ปรับสภาพถึงร้อยละ 60.33 จากผลดังกล่าวพบว่าน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้เมื่อนำมาปรับสภาพให้มีความเหมาะสม จะสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณสูง ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมและยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเหลือทิ้งอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	**Citric Acid Production from Fruit Processing Waste by Microorganisms**	
Name	**Mr. Khom**	**Suparppech**
	Mr. Thianchai	**Charnsangawet**
	Miss Saowaluk	**Aruncharatorn**
Special Project Advisor	**Miss Orathai**	**Sukchareon**
Department	**Applied Biology**	
Acadamic Year	**1995**	

Abstract

Fruit processing waste from fruit-juice plants was used as a substrate for citric acid production. Five strains of mold and one strain of yeast were examined. *Aspergillus ficuum* (Reichart) Hennings ATCC 12845 produced the great amount of citric acid with the yield of 9.6 g/l.The yield was further increased to 24.2 g/l when the pH of substrate was adjusted to 6.0 in the presence of 40 ml kg^{-1} methanol and incubated at room temperature on an rotary shaker at 200 rpm. Under these conditions the yield of citric acid was increased by 60.33% comparing to unpretreatment - substrate.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะผู้จัดทำขอขอบคุณ อาจารย์อรไท สุขเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้คำแนะนำรวมทั้งให้ความรู้ในด้านต่างๆ อีกทั้ง รศ.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษที่ได้กรุณาตรวจแก้ทางด้านภาษาและให้คำแนะนำต่างๆ ดร.อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ และกรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษซึ่งอำนวยความสะดวกเรื่องสถานที่และเครื่องมือการทดลอง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ บริษัท สยามอุตสาหกรรมเกษตร(สับปะรด) จำกัด มหาชน โรงงานมาลีสามพราน จำกัด มหาชน โรงงานส้มสด จังหวัดนนทบุรี ที่เอื้อเฟื้อวัตถุดิบ และสุดท้ายคือเพื่อนๆที่ให้ความช่วยเหลือในระหว่างการจัดทำโครงงานพิเศษนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

15 มีนาคม 2539

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และขั้นตอนการดำเนินงาน	18
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	22
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	42
ภาคผนวก ก.	43
ภาคผนวก ข.	45
ภาคผนวก ค.	48
เอกสารอ้างอิง	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	อุตสาหกรรมที่นำกรดซิตริกไปใช้และหน้าที่ของกรดซิตริกในอุตสาหกรรมนั้น	4
2-2	ผลของไอออนทองแดงและเหล็กในการผลิตกรดซิตริกของเชื้อ *A.niger*	14
4-1	แสดงคุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ 3 แหล่ง	23
4-2	แสดงปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่เชื้อจุลินทรีย์ 6 สายพันธุ์ผลิตขึ้นโดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ 3 แหล่งเป็นวัตถุดิบ	25
4-3	แสดงปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่เชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ผลิตได้ในอาหารเหลวที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างกัน	27
4-4	แสดงผลของเมทานอลต่อการผลิตกรดซิตริก	30
4-5	แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างพีเอชกับปริมาณเมทานอลต่อการผลิตกรดซิตริก	32
4-6	ปริมาณกรดสูงสุดที่ผลิตได้เมื่อมีการปรับปรุงอุณหภูมิและความเร็วรอบในการหมัก	37
4-7	แสดงการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2-1	สูตรโครงสร้างของกรดซิตริก	3
2-2	การผลิตกรดซิตริกโดยกรรมวิธีทางเคมี	5
2-3	ช่วงเวลาการหมักกรดซิตริก	7
2-4	แสดงปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการสลายกรดซิตริก	9
4-1	ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่ผลิตได้ในอาหารเหลวที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างกัน	28
4-2.1	อิทธิพลร่วมระหว่างพีเอชกับปริมาณเมทานอลต่อการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ C	33
4-2.2	อิทธิพลร่วมระหว่างพีเอชกับปริมาณเมทานอลต่อการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ E	34
4-2.3	อิทธิพลร่วมระหว่างพีเอชกับปริมาณเมทานอลต่อการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ F	35
4-3	ผลกระทบของอุณหภูมิ,เวลา และความเร็วรอบที่มีต่อการผลิตกรดซิตริก	38
4-4	แสดงการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก	41
5-1	รูปเชื้อต่างๆที่ใช้ในการวิจัย	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

กรดซิตริกเป็นกรดที่มีความสำคัญและใช้กันมากในอุตสาหกรรม ทั้งอุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง แม้กระทั่งเป็นส่วนผสมในน้ำยาล้าง ขัดโลหะ และหมึกพิมพ์ เป็นต้น การใช้กรดซิตริกอย่างกว้างขวางเช่นนี้ จึงทำให้ความต้องการด้านการตลาดของกรดซิตริกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น สำหรับประเทศไทยแม้จะมีโรงงานผลิตกรดซิตริกอยู่แล้วก็ตาม แต่ก็ยังไม่เพียงพอกับความต้องการยังต้องมีการนำเข้ากรดซิตริกในปริมาณมากในแต่ละปี จะเห็นได้ถึงความเป็นไปได้ของการส่งเสริมให้มีการผลิตกรดซิตริกขึ้นในประเทศไทย เนื่องจากความได้เปรียบทั้งในด้านวัตถุดิบและแรงงานที่มีในประเทศไทย

กรดซิตริกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ และเป็นส่วนประกอบของผลไม้ประเภทส้ม สับปะรด ลูกพีช และ ผลไม้อื่นๆ ในระยะแรกกรดซิตริกที่ผลิตใช้กันนั้นได้มาจากการสกัดจากผลไม้ แต่ปัจจุบันการผลิตโดยวิธีนี้เริ่มลดลง เนื่องจากมีการใช้ผลไม้ไปผลิตเป็นเครื่องดื่มมากขึ้น จึงได้มีการผลิตกรดซิตริกโดยการสังเคราะห์ทางเคมี แต่วิธีการดังกล่าวมีต้นทุนสูงมาก ปัจจุบันจึงนิยมผลิตกรดซิตริกโดยการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถผลิตได้ปริมาณมากในแต่ละครั้ง ใช้เนื้อที่ในการผลิตน้อยและสามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกได้หลายชนิด ทั้ง cane molasses,beet molasses,starch หรือ orange press liquor จากประเด็นดังกล่าว โครงงานพิเศษนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริก เนื่องจากประเทศไทยมีอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้กระป๋องเป็นจำนวนมาก อีกทั้งน้ำทิ้งที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตนี้ก็มีปริมาณมากขึ้นตามไปด้วย จากการที่น้ำทิ้งดังกล่าวมีปริมาณกรดอินทรีย์และมีปริมาณสารที่ไม่ละลายอยู่สูง น้ำทิ้งที่มีคุณสมบัตินี้ ถ้าทิ้งลงในแหล่งน้ำโดยตรงแล้วจะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้ หรือถ้าต้องการทำการกำจัดก็จะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ดังนั้นการนำน้ำทิ้งดังกล่าวนี้มาเป็นวัตถุดิบในการหมักกรดซิตริกจากเชื้อจุลินทรีย์ จึงเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ จากการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำผลไม้ ตลอดจนหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ที่ใช้ประโยชน์ไม่ได้มาผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อจุลินทรีย์
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้จุลินทรีย์เพื่อหมักน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้เพื่อให้ได้กรดซิตริก
3. เพื่อลดปริมาณน้ำเสียที่จะออกมาทำลายสภาพแวดล้อม

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถหมักน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้เพื่อให้ได้กรดซิตริก
2. หาสภาวะที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักกรดซิตริก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. คัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกได้
2. ทราบว่าน้ำเสียชนิดใดสามารถผลิตกรดซิตริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ
3. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกรดซิตริกจากเชื้อที่คัดเลือกไว้
4. ได้นำสิ่งที่ไม่ใช้ประโยชน์มาทำให้เกิดประโยชน์
5. สามารถช่วยลดปริมาณของเสียที่จะปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม

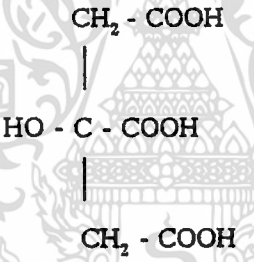
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. คุณสมบัติของกรดซิตริก

กรดซิตริกหรือกรดมะนาวเป็นกรดอินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เป็นส่วนประกอบในเนื้อเยื่อของผลไม้ที่มีอยู่ในพืชตระกูลพวกส้ม สับปะรด แพร์ พีช เป็นต้น กรดซิตริกมีชื่อทางเคมีว่า β-hydroxy tricarboxylic acid (2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid) มีสูตรทางเคมีเป็น $C_6H_8O_7$ ดังแสดงในรูปที่ 2-1 มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 153 องศาเซลเซียส และเมื่ออยู่ในรูป monohydrate ($C_6H_8O_7 . H_2O$) จะมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (O.Kirk,1964.)



รูปที่ 2-1 สูตรโครงสร้างของกรดซิตริก

เนื่องจากกรดซิตริกเป็นสารที่มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม มีความเป็นพิษต่ำ และสามารถกำจัดได้ง่าย จึงมีการใช้กรดซิตริก เกลือและเอสเทอร์ของกรดนี้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย ดังตารางที่ 2-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

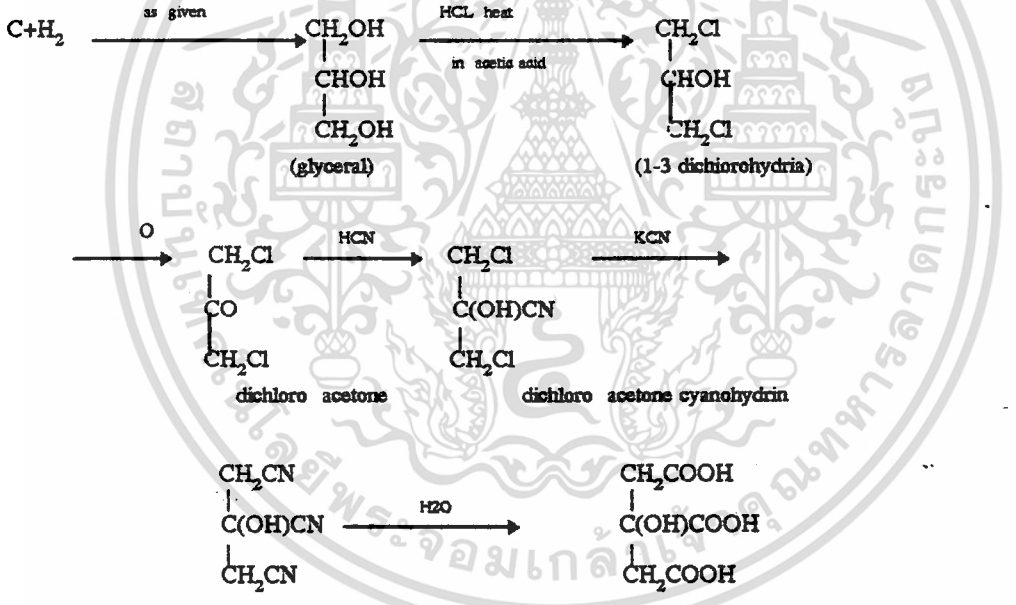
ตารางที่ 2-1 อุตสาหกรรมที่นำกรดซิตริกไปใช้และหน้าที่ของกรดซิตริกในอุตสาหกรรมนั้น

อุตสาหกรรม	หน้าที่ของกรดซิตริกในอุตสาหกรรม
อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม	-ช่วยเพิ่มกลิ่นรส, ช่วยยืดอายุการเก็บ, กำจัดโลหะหนัก, ป้องกันการสูญเสียรสชาติ และสีของผลิตภัณฑ์ ในผลิตภัณฑ์ไวน์ - ป้องกันไม่ให้ไวน์ขุ่น - ยับยั้งการเหม็นหืน - ใช้ปรับพีเอช ในเครื่องดื่มทั่วไป - ทำให้มีรสสัมผัสดี
อุตสาหกรรมอาหาร และลูกกวาด	-ช่วยเพิ่มกลิ่นรส, ป้องกันการเกิด oxidation, สร้างสีเข้ม ในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ลูกกวาด, แยม, เยลลี่ ช่วยปรับพีเอช -ในอาหารแช่แข็งช่วยลดผลของโลหะหนัก, ทำให้มีพีเอชต่ำจึงช่วยชลอการทำงานของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ทำให้สีและรสชาติไม่เปลี่ยนแปลง - ในผลิตภัณฑ์นมช่วยทำหน้าที่เป็นสารป้องกันการเกิดปฏิกิริยา oxidation และเป็น emulsifier ในชีส, ไอศครีม
เภสัชกรรม	-เป็นตัวทำละลาย และทำให้เกิดฟองฟู่ในยาเมื่อทำปฏิกิริยากับ bicarbonate
เครื่องสำอางค์	-เป็น antioxidant ,ควบคุมพีเอช ,เพิ่มความแวววาวและความอ่อนนุ่มของผลิตภัณฑ์
อื่นๆ	-ใช้ทำความสะอาดหม้อต้มในอุตสาหกรรม, ล้างสนิม -เป็น blood anticoagulant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การผลิตกรดซิตริก

การผลิตกรดซิตริกในระยะแรกได้จากการสกัดจากผลไม้ประเภทส้มและมะนาว แต่ต่อมาการผลิตโดยวิธีนี้เริ่มลดลงเนื่องจากได้มีการใช้ผลไม้เหล่านี้มาผลิตเป็นเครื่องดื่มมากขึ้น ภายหลังมีการนำกระบวนการทางเคมีมาผลิตกรดซิตริกบ้าง แต่วิธีการนี้ค่อนข้างยุ่งยากและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ดังแสดงในภาพที่ 2-2 ดังนั้นวิธีการผลิตกรดซิตริกที่เหมาะสมที่สุด คือ วิธีการผลิตโดยการใช้จุลินทรีย์ในการหมัก เพราะสามารถหมักโดยใช้วัตถุดิบได้หลายประเภท เช่น glucose, sucrose, cane molasses, beet molasses และ orange press liquor (Clark and Lentz, 1963; Hossian et al, 1984; Kunda et al, 1984 ; Aravantinos-Zafiris et al, 1994.)



รูปที่ 2-2 การผลิตกรดซิตริกด้วยกรรมวิธีทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักกรดซิตริก

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมกรดซิตริกได้มีทั้งรา, ยีสต์ และแบคทีเรีย ดังนี้คือ

3.1 เชื้อราที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้ เช่น *A.clavatus*, *A.awamori*, *A.wentii*, *Penicillium citrinum*, *P. luteum*, *Mucor* sp. เป็นต้น(ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์,1991) โดยการใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการ Embden-Meyerhof Parnas (EMP) pathway ได้เป็น acetyl CoA จากนั้น acetyl CoA จะรวมกับ oxaloacetate ได้กรดซิตริก โดยผ่านวัฏจักร TCA cycle

3.2 แบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตกรดซิตริกได้เช่นกัน โดยแบคทีเรียสามารถสร้างกรดซิตริกจาก n-paraffin และสารอื่นๆที่คล้ายคลึงกันได้ จุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ *Corynebacterium* sp., *Arthrobacter paraffinens* และ *Brevibacterium flavum* เป็นต้น (ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์,1991)

3.3 ยีสต์สามารถผลิตกรดซิตริกได้โดยใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด เช่น เมทานอล, บิวทานอล, เอทานอล, กรดไขมัน, ไฮโดรคาร์บอนต่างๆ เช่น n-paraffin, n-alkane อีกทั้งยังสามารถใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงๆได้ จุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ *Candida lipolytica*, *C. tropicalis* , *C.guilliermondii* เป็นต้น (ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์,1991)

พบว่าการผลิตกรดซิตริกโดยยีสต์นั้นจะให้ผลผลิตเร็วกว่าเชื้อราแต่ไม่นิยมใช้เนื่องจากว่าจะมีการสะสมสารที่ไม่ต้องการสูง เช่น กรดไอโซซิตริก เป็นต้น ดังนั้นในการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมนั้นนิยมใช้ *A.niger* เนื่องจากเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตได้สูง

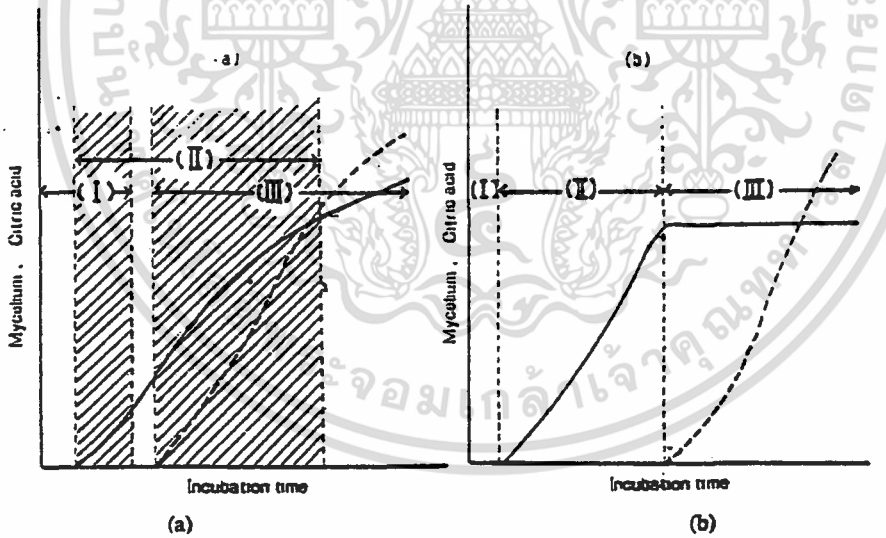
4. กระบวนการทางชีวเคมีของการผลิตและการสะสมกรดซิตริก

กระบวนการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา *A.niger* แบ่งออกเป็น 2 ช่วง ช่วงแรกเป็นการเจริญ (Growth phase) ซึ่งจะยังไม่มีการสะสมกรด ช่วงที่2 เป็นช่วงของการผลิตกรด (Acidogenic stationary phase) ช่วงนี้มีอัตราการเจริญของเชื้อราที่ค่อนข้างต่ำ หรืออาจจะเกือบหยุดการเจริญ (L.B.Lockwood, 1975 ; S.C.Presscott et al..,1949.)โดยลักษณะการผลิตกรดดังกล่าวนี้เรียกว่า "Type II Fermentation"

S.usami (1987) แบ่งช่วงการหมักกรดซิตริกโดยวิธี submerged culture ออกเป็น 3 ช่วง แสดงดังรูปที่ 2-3a ช่วงที่ 1(I) เรียกว่า Germination phase ใช้เวลาประมาณ 10-12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วงที่ 2 (II) เรียกว่า Growth phase ซึ่งอยู่ในช่วง 20-160 ชั่วโมงหลังจากการหมัก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะต่างๆของการเลี้ยงเชื้อ ช่วงที่ 3 (III) เรียกว่า Acid accumulation phase เป็นช่วงที่มีการสะสมกรดซิตริก ซึ่งเป็นผลมาจากการสะสมพลังงานในช่วงที่2 ในกรณีที่ต้องการให้การหมักมีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยปรับไม่ให้มีการซ้อนกันของช่วงที่ 1 กับช่วงที่ 2 ก็สามารถจะกระทำได้โดยการเลี้ยง spore inoculum ให้งอกเป็นเส้นใยเสียก่อน และการที่มีช่วงที่ 2 และ 3 ซ้อนกันจะไม่เป็นผลดีต่อการผลิตกรดซิตริก ทั้งนี้เมื่อมีการผลิตและการสะสมกรด จะมีผลทำให้เกิดการหยุดชะงักหรือชะลอการหมุนเวียนของสารใน Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) การที่จะควบคุมไม่ให้ช่วงที่ 2 และ 3 ซ้อนกัน อาจควบคุมได้โดยการควบคุมชนิดของแร่ธาตุในอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการละลายของกาซออกซิเจนและการเติม Metabolic salt ในปริมาณเล็กน้อย การที่จะควบคุมได้เช่นนี้จะถือได้ว่าเป็นการควบคุมการหมักที่ประสบความสำเร็จอย่างสมบูรณ์ ดังรูปที่ 2-3b



(I) Germination phase (II) Growth phase (III) Acid accumulation phase.
Solid line· mycelium. broken line: citric acid.

รูปที่ 2-3 ช่วงเวลาการหมักกรดซิตริก (a,b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามกระบวนการทางชีวเคมีของการผลิตและการสะสมกรดซิตริกก็ยังไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจนลงไปว่าทฤษฎีใดที่จะอธิบายการผลิตกรดซิตริกได้อย่างถูกต้อง ซึ่งทฤษฎีเหล่านี้ได้แก่

1. การเกิดความผิดปกติในวัฏจักรของ TCA cycle ซึ่งอาจเกิดจากคุณสมบัติของเชื้อนั้นเองที่สามารถสร้างและสะสมกรดซิตริกซึ่งเกิดจากการรวม acetyl CoAกับ oxaloacetic acid โดยเกิดสภาวะการยับยั้งของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการเปลี่ยนกรดซิตริกไปเป็นกรดไอโซซิตริก ดังแสดงในรูปที่ 2-4 Ramakrishnan และคณะ(1955) พบว่าการสะสมกรดซิตริกของเชื้อ *A.niger* อาจเกิดจากความผิดปกติของเอนไซม์ aconitase และเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ต่อมาก็มีผู้สกัดเอนไซม์เหล่านี้ได้ในระหว่างการหมักและไม่พบความผิดปกติที่เกิดขึ้นของเอนไซม์ดังกล่าวในวัฏจักร TCA cycle (La Nauze,I.M.,1996.)

การลดความเข้มข้นของอนุมูลโลหะบางชนิด เช่น สังกะสี,เหล็ก,แมงกานี สและทองแดง ซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการหายใจ จะมีผลให้เพิ่มผลผลิตของกรดซิตริกได้ แต่สำหรับทองแดงนั้นเป็น specific inhibitor ของเอนไซม์ aconitase (O.Kirk,1964.)

2. การเกิดกรดออกซาลิค จะมีผลยับยั้งต่อ TCA cycle โดยกรดชนิดนี้เกิดจากการรวมตัวของ oxaloacetate และ glyoxylate ในวิถี glyoxylate แต่ในสภาพที่มี NADH สูงจะทำให้ปริมาณกรดออกซาลิคที่เกิดจากวิถี glyoxylate นั้นลดลง ซึ่งจะมีผลทำให้ oxaloacetate และacetate รวมตัวกันเป็นกรดซิตริกได้ (J.Wiley and Sons,1976.) ดังแสดงในรูปที่ 2-4 โดยปกติกรดออกซาลิคจะมีแนวโน้มที่จะถูกสร้างขึ้นในสภาพที่มีพีเอชเป็นกลางหรือด่าง แต่อย่างไรก็ตามในสภาพพีเอชเป็นกรดหรือช่วงที่มีพีเอชต่ำๆก็อาจจะเกิดขึ้นได้ (S.Usami,1987.) ในกรณีที่ มีการใช้ไนโตรเจนพื้นฐานเช่น $NaNO_3$ หรือการมีแหล่งฟอสฟอรัสที่มีปริมาณสูง หรือการที่มีสังกะสีหรือไม่มีแมงกานีส หรือเส้นใยของราถูกตัดหรือถูกทำลายไปในระหว่างกระบวนการหมัก

5. ปัจจัยที่มีต่อการผลิตกรดซิตริก

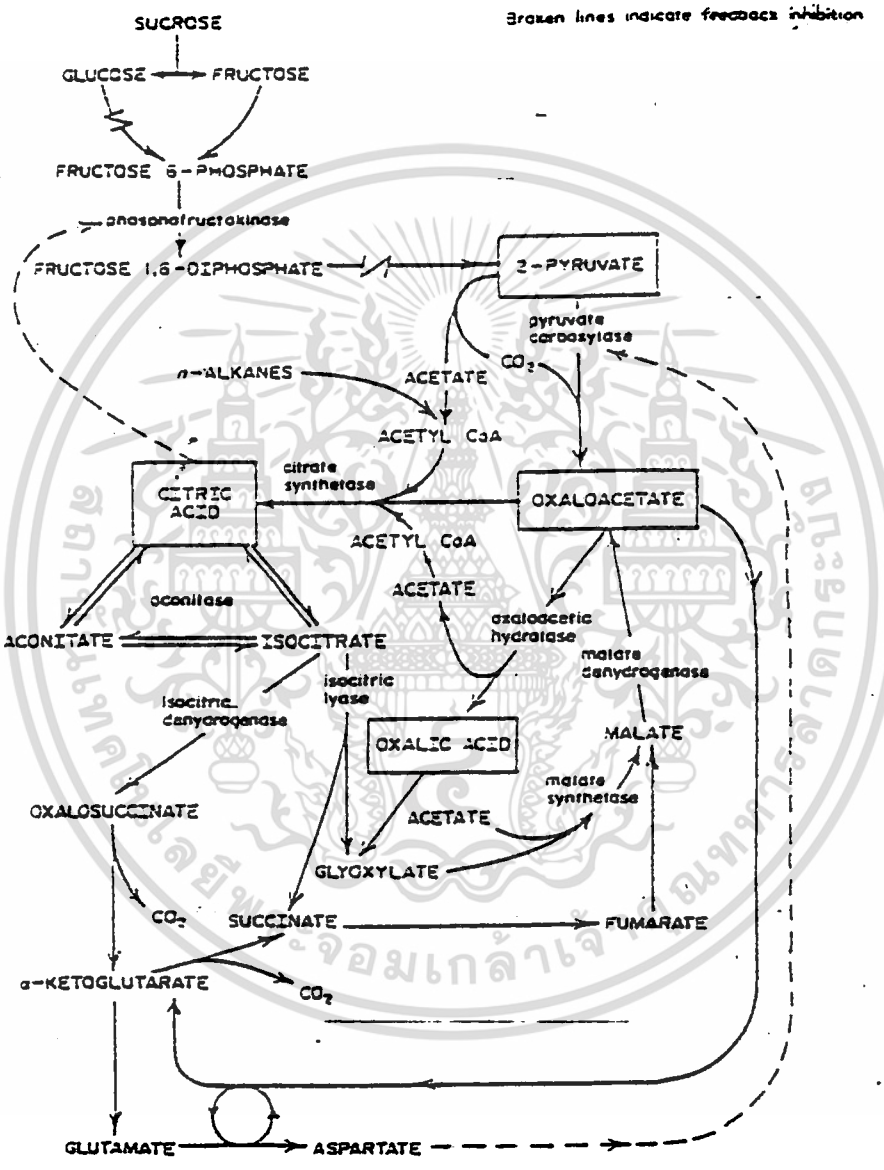
ปัจจัยที่มีต่อการผลิตกรดซิตริกมีดังนี้ คือ

5.1 ชนิดของจุลินทรีย์

5.2 ชนิดของกระบวนการหมัก

5.3 สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2-4 แสดงปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสลายกรดซิตริก

ที่มา : กรรณิการ์ วรพฤกษ์จารุ และคณะ(1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1 ชนิดของจุลินทรีย์

เนื่องจากในกระบวนการหมักกรดซิตริกจะพบว่าเกิดกรดออกซาลิค และกรดไอโซซิตริกด้วยเสมอ ไม่ว่าจะเป็นการหมักโดยใช้เชื้อราหรือยีสต์ ดังนั้นจึงเป็นปัญหาในการคัดเลือกเชื้อ เพราะนอกจากจะต้องคัดเลือกเชื้อสายพันธ์ที่ให้ปริมาณกรดซิตริกสูง ผลผลิตสม่ำเสมอแล้วยังต้องให้กรดอินทรีย์ชนิดที่ไม่ต้องการอื่นๆน้อยที่สุด เพื่อง่ายต่อการแยกกรดซิตริก นอกจากนี้ยังต้องพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์ให้ได้สายพันธุ์ที่ผลิตกรดซิตริกได้สูงยิ่งขึ้น โดยการทำการผ่าเหล่า (mutation) และการคัดเลือกเชื้อ (selection) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีใช้กันมานานแล้ว

ในการผ่าเหล่านั้นสามารถทำได้โดยอาศัยการใช้รังสี (UV, gamma rays, X-rays) และสารเคมี (nitrous acid , nitrosoguanidine, ethyleneamine, nitrogen mustard) ทั้งนี้โดยนำสปอร์ของเชื้อรามาฉายรังสีหรือนำสารละลายสปอร์มาเติมสารเคมีแล้วจึงนำไปคัดเลือกหาเชื้อที่ต้องการ (หรือที่เรียกว่า mutants) ที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณสูง อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติมักจะมีปัญหาในการคัดเลือกหา mutant ดังกล่าว ทั้งนี้เพราะในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการในการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริกที่สูงได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว ตามปกติจะใช้วิธีเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฉายรังสี หรือการเติมสารเคมีลงบนอาหารแข็ง (agar plate technique) เช่น neutral rod หรือ bromthymol blue เป็นต้น เนื่องจากคุณสมบัติในการเปลี่ยนสีของสารดังกล่าวเมื่อสภาพความเป็นกรดด่าง(pH) เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นเมื่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดซิตริกออกมาจะทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่เชื้อเจริญเปลี่ยนไปทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณนั้นเปลี่ยนตามไปด้วย จึงทำให้สามารถแยกจุลินทรีย์ที่ต้องการออกมาได้ อย่างไรก็ตามวิธีที่กล่าวมานี้ไม่ใช่วิธีการที่ดีและถูกต้องที่สุด เพราะจากการศึกษาพบว่าชนิดของกรดอินทรีย์ที่ผลิตจากเชื้อราจัดเป็นกรดอินทรีย์ที่ขึ้นกับสภาพความเป็นกรด-ด่าง(pH dependent) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้น ถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และปรับพีเอชเท่ากับ 6-7 เพื่อใช้ในการตรวจหา mutant ที่ผลิตกรดซิตริก แต่ mutant ที่ผลิตกรดซิตริกกลับเป็นเชื้อที่ผลิตกรดออกซาลิก (oxalic acid-producing mutants) ขึ้นมาแทน ดังนั้นการหา mutant ที่ผลิตกรดซิตริกจึงจำเป็นต้องปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเป็นกรด ซึ่งในกรณีเช่นนี้ทำให้การตรวจสอบผลของการคัดเลือกเป็นไปได้ยาก เพราะสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมจะเปลี่ยนแปลงตามความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ชนิดของกระบวนการหมักกรดซิตริก

กระบวนการหมักกรดซิตริกอาจแบ่งเป็น 3 วิธี คือ

1. การหมักในสภาพที่เป็นของแข็งหรือโกจิ (Japanese koji process) เป็นวิธีดั้งเดิมที่นิยมทำกันในญี่ปุ่น โดยประมาณ 1ใน 5 ของกรดซิตริกในญี่ปุ่นจะผลิตโดยใช้วิธีนี้ เริ่มแรกทีเดียว ก็ใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร เป็นวัตถุดิบ เช่น กากมันฝรั่งชนิดหวาน ซังข้าวโพด โดยการปรับพีเอชให้อยู่ระหว่าง 1.8-2 โดยใช้*A.niger* โดยอุณหภูมิระหว่างการหมักไม่ควรเกิน 28 องศาเซลเซียสและมีการเติม 3-7% ของ filter cake ได้จากการหมักกรดกลูตามิคซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตของกรดซิตริกที่สูงขึ้น การเปลี่ยนแปลงในการหมักในช่วงเริ่มต้นนั้นแป้งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส ดังนั้นในช่วงดังกล่าวถ้ามีการเติมเอนไซม์อะไมเลสลงไปด้วยจะทำให้การหมักจะมีประสิทธิภาพดีขึ้น ต่อจากนั้นจะเป็นการนำเอาอาหารหมักมาเกลี่ยในถาดที่มีความลึก 3-5 ซม. นาน 5-8 วัน จะได้โกจิซึ่งสามารถจะเก็บเกี่ยวผลได้ โดยการนำมาใส่ใน percolator และสกัดกรดซิตริกด้วยน้ำ วิธีนี้จะได้ผลผลิตประมาณ 60-80 กรัมของกรดซิตริกอันไฮดรัส ต่อ 100 กรัมของน้ำตาลที่เติมลงไป

2. Liquid surface culture process หรือเรียกว่า เป็นการหมักในภาชนะตื้น (shallow pan process) จากการหมักวิธีนี้ทำให้ราคาของกรดซิตริกถูกลงจึงทำให้อุตสาหกรรมหลายแห่งหันมาผลิตกรดซิตริกโดยวิธีนี้มากขึ้น เริ่มแรกที่สหรัฐอเมริกาและประเทศแถบยุโรป แต่เทคนิคในการทำก็ยังปกปิดเป็นความลับอยู่ จึงไม่ทราบรายละเอียดทราบแต่เพียงหลักการที่ว่า ในการหมักอาหารและเชื้อจะถูกทำให้กระจายในภาชนะก้นแบน เช่น กะทะที่ทำด้วยอลูมิเนียมที่มีความบริสุทธิ์สูงหรือทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม เพื่อลดปัญหาการกัดกร่อนจากกรดและการปะปนของแร่ธาตุโลหะที่มีผลต่อการหมัก นอกจากนั้นแล้วยังมีการเป่าอากาศที่ชื้นลงไปบนผิวของน้ำหมักเป็นเวลา 5 หรือ 6 วัน จะต้องระวังไม่ให้มีการสะสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศซึ่งจะทำให้ลดปริมาณการผลิตกรดซิตริกได้ การผลิตกรดซิตริกโดยวิธีนี้สปอร์จะงอกภายใน 24 ชั่วโมง และจะเห็นเส้นใยสีขาวขุ่นปกคลุมผิวของน้ำหมัก ในเวลา 8-10 วัน หลังจากถ่ายเชื้อลงไป ความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีอยู่ 20-25% จะลดลงเหลือ 1-3% พอครบกำหนดเวลาในการหมักจะถ่ายน้ำหมักนี้ออกโดยเชื้อยังคงอยู่แล้วเติมอาหารลงไปใหม่ด้วยเทคนิคที่เฉพาะ จะได้เส้นใยลอยที่ผิวเหมือนเดิม วิธีนี้จะช่วยลดเวลาการผลิตลงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีนี้สามารถใช้โมลาสเป็นวัตถุดิบในการหมักได้ โดยในโมลาสจะมีซูโครสเป็นอาหารหลักและมีกลูโคสบ้าง นอกจากนี้ยังมีโปรตีน เปปไทด์ กรดอะมิโน และไอออน อนินทรีย์ แต่การใช้โมลาสจะต้องกำจัดโลหะที่ไม่ต้องการออกก่อนหรือลดปริมาณลง อาจทำโดยการดูดซับด้วย $CaCO_3$ หรือ colloidal silica tricalcium phosphate และแป้ง หรือจะใช้วิธีการเติม $Ca(OH)_2$ แล้วทำให้ร้อนหรือจะใช้ activated carbon ก็ได้ บางแหล่งที่ผลิตจะตกตะกอนเหล็กโดยเติม calcium ferrocyanide เพราะเหล็กมีบทบาทต่อการสร้างกรดออกซาลิก การสร้างสปอร์และรงควัตถุสีเขียวปนเหลืองสำหรับเชื้อ *A.niger* ในขณะที่มีการสร้างสปอร์ ซึ่งรงควัตถุนี้จะปะปนในน้ำหมักทำให้การแยกกรดออกมาลำบากมากขึ้น การหมักแบบนี้ได้ผลผลิตประมาณ 80-85% ของน้ำหนักคาร์โบไฮเดรตเริ่มต้นที่ให้ และสามารถแยกกรดซิตริกได้สูงถึง 90%

3. submerged culture process คือ การหมักโดยเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีขนาดใหญ่ขึ้น วิธีนี้จะให้ฟองอากาศผ่านน้ำหมักอย่างช้าๆ น้ำมักจะมีระดับความลึกประมาณ 15 ซม. อาหารที่ใช้จะประกอบด้วยซูโครส 100กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 5.0 กรัม KH_2PO_4 2.5 กรัม และ $MgSO_4$ 1.2 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร วิธีการนี้หลังจากเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุในถังหมักขนาดใหญ่แล้ว จะต้องมีการปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างกรดซิตริก เมื่อมีการให้อากาศอย่างต่อเนื่องโดยอากาศจะถูกเป่าผ่านน้ำหมักด้วยอัตรา 0.5-1.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที เวลาที่ใช้ในการหมัก 3-5 วัน อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำของเหลงที่ผ่านการหมักไปสกัดกรดซิตริก ในบางครั้งจะนำไมซีเลียมกลับมาใช้อีก

5.3 สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงต่อสภาพที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีดังนี้ คือ

5.3.1 ธาตุอาหาร

5.3.2 การแปรสภาพวัตถุดิบ

5.3.3 พีเอช

5.3.4 หัวเชื้อ

5.3.5 การควบคุมสภาพการหมัก

5.3.6 สารกระตุ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3.1 ธาตุอาหาร

ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เพื่อการผลิตกรดซิตริกขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ และชนิดของการหมัก ซึ่งพอแบ่งออกได้เป็น

1. คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส

พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดซิตริกสามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2-12 อะตอม เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานได้โดยขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ แหล่งคาร์บอนเหล่านี้ได้แก่ ซูโครส, กลูโคส, beet molasses, cane molasses, orange press liquor โดยทั่วไปความเข้มข้นที่พอเหมาะของน้ำตาลจะอยู่ระหว่าง 15-18% ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงกว่า 15-18% จะทำให้มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการหมักสูง ทำให้สิ้นเปลือง แต่ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่ำเกินไปจะทำให้ผลิตกรดซิตริกได้น้อยลง และเกิดการสะสมของกรดออกซาลิกด้วย (Kovats,1960)

การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และขบวนการหมักเป็นสำคัญ เช่น ถ้าใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อกินเวลานานกว่าใช้แอมโมเนียมไนเตรต แต่ถ้าใช้แอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นสูงกว่า 0.25% จะก่อให้เกิดความสะสมของกรดออกซาลิกขึ้น

ฟอสเฟตเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.1-0.2% ถ้าความเข้มข้นสูงจะทำให้เชื้อเจริญได้ดีแต่ผลิตกรดซิตริกได้ต่ำ

2. แร่ธาตุ (trace element)

ในบรรดาแร่ธาตุหลายชนิดแร่ธาตุที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการหมักคือ Fe^{++} และ Zn^{++} โดยทั่วไปแล้วแร่ธาตุทั้ง 2 ชนิดนี้ต้องมีความเข้มข้นต่ำจึงจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกแต่ถ้าความเข้มข้นสูงจะทำให้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตยืดยาวออกไป ทำให้เกิด vegetative growth

จากวัฏจักร TCA cycle พบว่าการสร้างกรดซิตริกจะถูกยับยั้งโดยเอนไซม์ aconitase และ isocitric dehydrogenase ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองนี้มีเหล็กเป็น activator ดังนั้นจึงต้องมีการลดผลกระทบของ Fe^{++} โดยการ pretreatment หรือการเติม Cu^{++} ลงไปเพราะ Cu^{++} เป็น specific inhibitor ของ aconitase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 2-2 ผลของไอออน ทองแดง และเหล็กในการผลิตกรดซิตริกจากกลูโคสของเชื้อ *A.niger*

Fe^{3+} (mg / liter)	Cu^{2+} (mg / liter)	Citric acid yield[a] (%)
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] (Grams citric acid produced / grams glucose supplied) * 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3.2 การแปรสภาพวัตถุดิบ

จากการที่แร่ธาตุที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลกระทบต่อการผลิตกรดซิตริก ดังนั้นจะต้องมีการค้นคว้าหาเทคนิคต่างๆเพื่อใช้ลดความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านั้น เทคนิคที่ใช้ในการแก้ไขปัญหาเท่าที่มีการศึกษาค้นคว้ามีดังนี้คือ

1. การแปรสภาพวัตถุดิบด้วยสารเคมีได้แก่ โพแทสเซียม เฟอโรไซยาไนด์ โดยมีวิธีการ 2 วิธี คือ

1.1 การเติมเฟอไรไซยาไนด์ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง

1.2 การแปรสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเฟอโรไซยาไนด์ในระดับความเข้มข้นสูงก่อนที่จะทำการถ่ายสปอร์ของเชื้อ

2. การใช้เรซินที่ใช้แลกเปลี่ยนประจุ ให้ผลดีกว่าการเติมสารเคมี

3. การปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา ให้สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในสภาพที่มีแร่ธาตุอยู่ในระดับความเข้มข้นสูง

4. การ pretreatment ด้วยกรด (Acid pretreatment) โดยปรับอาหารให้มี พีเอช 2 แล้วเก็บที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Aravantinos-Zafiris et al.,1994.)

5. pretreatment ด้วยอุณหภูมิ (Thermal pretreatment) โดยนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 10 นาที หรือเก็บที่ 50 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง (Aravantinos-Zafiris et al.,1994.)

5.3.3 พีเอช (pH)

ในการหมักจำเป็นต้องปรับพีเอชเริ่มต้น แต่ทั้งนี้ขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ด้วย เช่น กรณีใช้ซูโครสรวมถึงกากน้ำตาลที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแล้วให้ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.0 ทั้งนี้เพราะถ้าพีเอชสูงจะทำให้เกิดการสะสมกรดออกซาลิกแทน ส่วนในกรณีที่ใช้กากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการแปรรูปจำเป็นต้องปรับพีเอชเริ่มต้นสูงเพราะถ้าพีเอชต่ำจะทำให้ *A.niger* ถูกยับยั้งด้วยสารต่างๆ เช่น แร่ธาตุที่มีอยู่ในกากน้ำตาลนั้น

5.3.4 หัวเชื้อ

หัวเชื้อที่ใช้ในการหมัก อาจใช้ในลักษณะของสปอร์หรือเส้นใยในช่วงก่อนการเจริญเติบโต (pregrown mycelia) สำหรับการใช้สปอร์จำเป็นต้องเตรียมสารละลายสปอร์ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำกลั่นผสม Tween 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนับสปอร์ให้มีประมาณ 10^5-10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร การใช้สปอร์นิยมใช้ในการหมักในสภาพที่เชื้อเจริญที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการหมักในสภาพอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวเชื้อที่ใช้ในการหมักในสภาพอาหารเหลว สามารถใช้สปอร์หรือ pellet ก็ได้ แต่ถ้าใช้ pellet จะต้องเตรียมขึ้นโดยถ่ายสปอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจริญเติบโต (growth medium) บ่มในสภาพอาหารเหลวเป็นเวลา 2-3 วัน จนเกิดเป็น pellet ขึ้นมา จึงนำไปใช้ต่อไป

สำหรับหัวเชื้อที่ใช้ในลักษณะของเส้นใยช่วงก่อนการเจริญเติบโต (pregrown mycelia) การเตรียมจะต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบที่เหมือนกับที่ใช้ในการหมัก ทั้งนี้เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในการหมักได้ดีและรวดเร็ว

5.5.5 การควบคุมสภาพการหมัก

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

ในการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริก จัดเป็นการหมักในสภาพที่มีอากาศ (aerobic fermentation) ดังนั้นเชื้อจึงจำเป็นต้องได้รับอากาศในปริมาณมากเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งในระหว่างการหมักสามารถควบคุมปริมาณอากาศได้ โดยอาศัยการให้อากาศ (aeration) และการกวน (agitation) ทั้ง 2 ระบบนี้จะช่วยทำให้การแพร่กระจายของออกซิเจนในน้ำหมักดี แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อและขนาดของถังหมักเป็นสำคัญ

การให้อากาศในน้ำหมักสามารถทำได้หลายแบบดังนี้คือ

1. การแพร่กระจายของอากาศลงสู่น้ำหมักโดยตรง กล่าวคือ อากาศที่อยู่ในบริเวณเหนือผิวอาหารเลี้ยงเชื้อจะแพร่กระจายเข้าสู่น้ำหมัก

2. การปั๊มอากาศบริสุทธิ์ (sterile air) หรือออกซิเจน เข้าไปในบริเวณส่วนล่างของผิวหน้าอาหาร

3. การเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker)

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *A.niger* หรือเชื้อราอื่นๆอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิในระหว่างการหมักสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส จะทำให้ผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้ลดลงและในขณะเดียวกันจะเกิดการสะสมกรดออกซาลิกด้วย

ระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสม ในการผลิตกรดซิตริกขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะการหมักเป็นหลัก กล่าวคือ กรณีใช้เชื้อ *A.niger* ถ้าทำการหมักโดยเลี้ยงเชื้อที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (surface culture) ใช้เวลาบ่มเชื้อประมาณ 7-10 วัน ในขณะที่การหมักในสภาพอาหารเหลวใช้เวลาที่สั้นกว่า โดยใช้เพียง 4-5 วัน เท่านั้น สภาพในการหมักในสภาพอาหารแข็งใช้ระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมเท่ากับ 6-7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

5.5.6 สารกระตุ้น

มีการทดลองใช้สารกระตุ้นหลายชนิด เพื่อเพิ่มการผลิตกรดซิตริกโดย *A.niger* เช่น เมทานอล, เอทานอล, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, naphthoquinone, methylene blue เป็นต้น และพบว่า stimulant ที่ดีที่สุดคือ เมทานอล (CH_3OH) โดยเมทานอล จะช่วยทำให้การเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์เกิดช้าแต่จะเพิ่มการผลิตกรดซิตริก ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมทานอลไม่ได้ทำให้เมตาบอลิซึมของเชื้อเสียหายแต่กลับส่งผลดีต่อคุณสมบัติการซึมผ่านของสารที่เข้า-ออกเมมเบรนของเชื้อรา จึงทำให้การปลดปล่อยกรดซิตริกออกมาจากเส้นใยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น พบว่าเมทานอลจะช่วยทำให้ปริมาณกรดซิตริกเพิ่มขึ้นในการหมักโดย *A.niger* (Hossain et al., 1983; Hang et al., 1987.)

6. ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก

เมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุดลง กรดซิตริกจะปะปนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งเส้นใยของเชื้อรา และอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องแยกเอาเส้นใยออกแล้วทำการล้างเส้นใย ผ่าน vacuum filter หรือ rotary drum vacuum filter ซึ่ง pre-coated ด้วย filter aid

หลังจากผ่านการกรองแล้ว จะได้สารละลายกรดซิตริก นำสารละลายนี้มาทำให้มีความเป็นด่างเพิ่มขึ้น โดยใช้แคลเซี่ยมไฮดรอกไซด์ จนกระทั่งสารละลายเป็นกลางจะได้ตะกอนของ calcium citrate จึงทำการกรองตะกอน calcium citrate โดยใช้ conventional industrial filter แล้วทำการล้างตะกอน calcium citrate ด้วยน้ำ เพื่อจะล้างน้ำตาลหรือสารที่ติดมาออกไป ส่วน calcium citrate ที่ได้นำไปใส่ในถังที่ทนต่อกรด (acidulation tank) แล้วจึงเติมกรดซัลฟิวริกลงไปมากเกินพอประมาณ 0.2% เพื่อที่จะไปละลาย calcium citrate แยกแคลเซียมออกมาในรูปของ calcium sulfate ทำการแยกออก ส่วนสารละลายที่ได้ก็คือสารละลายของกรดซิตริกอย่างเจือจาง แล้วจึงนำสารละลายกรดซิตริกไปฟอกสีด้วยคาร์บอน และนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นต่อไป โดยการใช้ระบบ anion และ cation exchange resins นำไประเหยทำให้เป็นเกล็ดของกรดซิตริก ตอนทำให้เป็นเกล็ดถ้าใช้อุณหภูมิถึง 36.6 องศาเซลเซียส จะได้เกล็ดของกรดซิตริกแห้ง (anhydrous crystalis) แต่ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำกว่าก็จะได้เกล็ดของกรดซิตริกที่มีน้ำปนมาด้วย 1 โมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25408

บทที่ 3
อุปกรณ์และขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ มีทั้งหมด 6 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์ เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตกรดซิตริกได้สูง ซึ่งได้แก่

1.1 *Aspergillus niger* var Tieghem ATCC 11414	สัญลักษณ์	A
1.2 *A.carbonarius* (Bainier) Thom ATCC 8740	สัญลักษณ์	B
1.3 *A. ficuum* (Reichert) Hennings ATCC 12845	สัญลักษณ์	C
1.4 *A.niger* var Tieghem ATCC 26036	สัญลักษณ์	D
1.5 *A.niger* var Tieghem ATCC 26550	สัญลักษณ์	E
1.6 *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch TIST 5120	สัญลักษณ์	F

2. อุปกรณ์ สารเคมี และสารอาหารที่ใช้ในการทดลอง

2.1 อุปกรณ์ ได้แก่

1. เครื่องแก้ว
2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
3. spectrophotometer
4. Haemacytometer
5. กล้องจุลทรรศน์
6. rotary shaker
7. autoclave
8. hot air oven

2.2 สารเคมี ได้แก่

1. กรดซัลฟิวริก
2. NaOH
3. ฟีนอล์ฟทาลีน
4. screen methyl red
5. potato dextrose agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. copper reagent

7. Nelson 's reagent

2.3 น้ำทิ้ง (อาหารเหลว)

2.3.1 น้ำทิ้งของส้ม จากโรงงานส้มสด จังหวัดนนทบุรี

2.3.2 น้ำทิ้งของสับปะรด จากโรงงานมาลีสามพราน จังหวัดนครปฐม

2.3.3 น้ำทิ้งของสับปะรด จากโรงงานสยามอุตสาหกรรม (สับปะรด) , SAICO จังหวัดระยอง

3. ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.1 การตรวจสอบคุณสมบัติเริ่มต้นของน้ำทิ้ง วิเคราะห์ด้วยวิธีดังต่อไปนี้

1.การวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริก โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performamce Liquid Chromatography, HPLC)

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) โดยวิธี Nelson Somogyi

4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (total acid)

5. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid)

6. การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก ได้แก่ คอปเปอร์ (Copper) , แคลเซียม (Calcium), เหล็ก (Iron), แมกนีเซียม (Magnesium), แมงกานีส (Manganese) และสังกะสี (Zinc)

<u>หมายเหตุ</u> การวิเคราะห์ต่างๆ ดูภาคผนวก ข.

3.2 การหมักเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ (ข้อ 2.3) มาผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อจุลินทรีย์ตามข้อ 1

3.2.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยเส้นใยของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆตามข้อ 1 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โปเตโตเดกซ์โตรสอาการ์ (PDA) ในขวดแก้วทรงแบน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเจริญเต็มที่ หลังจากนั้นถ่ายสปอร์ออกจากขวดแก้วทรงแบนด้วยการล้างโดยใช้น้ำกลั่นแล้วกรองผ่านผ้าขาวบางที่ซ้อนทับกันหนา 4 ชั้น นำสปอร์แขวนลอย (spore suspension) มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิตกรดซิตริก

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงอาหารเหลว (ข้อ 2.3) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นบ่มบนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ทุกๆ 3 วัน จนครบวันที่ 15 ของการหมัก

3.2.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์

เก็บตัวอย่างปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านสำลี แล้วนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดซิตริกโดยวิธี HPLC และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Nelson Somogyi

3.2.4 ทำการวิจัยผลการทดลองเพื่อหาอาหารเหลวที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาผลิตกรดซิตริก และทำการเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถหมักกรดซิตริกได้สูงมา 3 สายพันธุ์ เพื่อทำการศึกษาในขั้นต่อไป

3.3 การปรับปรุงน้ำทิ้งเพื่อเป็นวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริก

3.3.1 ศึกษาความเป็นกรดเริ่มต้นของอาหารเหลวที่เหมาะสม

โดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) และผันแปรความเป็นกรดเริ่มต้นของอาหารเหลว เป็น 3, 4, 5 และ 6 ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ ที่เลือกได้จากข้อ 3.2.4 และผ่านการเตรียมสปอร์ตามข้อ 3.2.1 ลงในอาหารเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ตามข้อ 3.2.3

3.3.2 ศึกษาปริมาณเมทานอลที่เหมาะสม

โดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) ปรับความเป็นกรดเริ่มต้นของอาหารเหลวเป็น 6 และผันแปรปริมาณเมทานอลเป็น 4% และ0% (ไม่เติมเมทานอล) จากนั้นทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ และบ่มเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1 เก็บตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์ตามข้อ 3.2.3

3.3.3 การศึกษาอิทธิพลร่วมของความเป็นกรดเริ่มต้นกับปริมาณเมทานอล

โดยการวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (factorial completely randomized design) 4^4 โดยผันแปรความเป็นกรดเริ่มต้นของอาหารเหลว 4 ระดับ คือ 3, 4, 5 และ 6 และปริมาณเมทานอลที่ 4 ระดับ คือ 0%, 2%, 4% และ 6% ตามลำดับ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ และบ่ม เช่นเดียวกับข้อ 3.3.1 เก็บตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์ตามข้อ 3.2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การปรับปรุงความเร็วรอบของเครื่องเขย่าและอุณหภูมิในการบ่มให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริก

3.4.1 จากการทดลองข้อ 3.3 ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดที่สภาวะความเป็นกรดเริ่มต้นและปริมาณเมทานอลของน้ำทิ้งที่เหมาะสม 1 ค่า มา 1 สายพันธุ์

3.4.2 ทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์โดยเตรียมสปอร์ตามข้อ 3.2.1 ลงในอาหารเหลวที่ปรับสภาวะตามข้อ 3.4.1 ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว จากนั้นบ่มบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบผันแปรเป็น 100 และ 200 รอบต่อนาที และมีการผันแปรอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ตามลำดับ

3.4.3 ทำการบ่มเป็นเวลา 15 วัน และทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วันมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดซิตริก, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตรวจวัดการเจริญเติบโต โดยการหาน้ำหนักแห้งของเซลล์จุลินทรีย์ และตรวจปริมาณกรดทั้งหมด (total acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการตรวจสอบคุณสมบัติเริ่มต้นของน้ำทิ้ง

จากการนำน้ำทิ้งของส้มซึ่งจากการนำเปลือกส้มที่ผ่านการคั้นน้ำส้มออกแล้วนำมาหีบด้วยเครื่องหีบอ้อย และน้ำทิ้งของสับปะรดซึ่งได้จากกระบวนการปอกเปลือกสับปะรด ซึ่งมีปริมาณมากมาตรวจสอบคุณสมบัติเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งเหล่านี้มาเป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อจุลินทรีย์ ผลจากการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4-1

จากตารางที่ 4-1 พบว่า คุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ทั้ง 3 แหล่งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% และยังพบว่าน้ำทิ้งทั้ง 3 แหล่งมีปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ อยู่ค่อนข้างสูง น่าที่จะนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-1 แสดงคุณสมบัติของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ 3 แหล่ง

คุณสมบัติ	แหล่งวัตถุดิบ		
	แหล่งที่ 1	แหล่งที่ 2	แหล่งที่ 3
ปริมาณกรดซิตริก (g/l)	12 .0	4.5	3.0
ปริมาณโปรตีน (mg/l)	1158.64	230.72	120.40
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	40.0	51.0	92.0
ปริมาณกรดทั้งหมด (g/l)	10.66	4.97	2.13
ปริมาณของแข็งทั้งหมด (g/l)	148.4	62.8	56.2
ค่าความเป็นกรด (pH)	3.71	4.07	4.00
ปริมาณโลหะหนัก (µg/ml)			
- คอปเปอร์ (Copper)	0.63	0.29	0.27
- แคลเซียม (Calcium)	265.4	163.5	92.7
- เหล็ก (Iron)	10.17	15.45	27.79
- แมกนีเซียม (Magnesium)	130.0	102.0	53.0
- แมงกานีส (Manganese)	1.07	26.14	11.28
- สังกะสี (Zinc)	2.12	0.73	0.66

หมายเหตุ แหล่งที่ 1 หมายถึง น้ำทิ้งของส้มจากโรงงานส้มสด

แหล่งที่ 2 หมายถึง น้ำทิ้งสับปะรดจากโรงงานมาลีสามพราน

แหล่งที่ 3 หมายถึง น้ำทิ้งสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งมาผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดลองนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดซิตริกได้สูงมา 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *A.niger* var Tieghem ATTC 11414 (A), *A.carbonarius* (bainier) Thom ATTC 8740 (B), *A.ficuum* (Reichert) Hennings ATTC 12845 (C), *A.niger* var tieghem ATTC 26036(D), *A.niger* var Tieghem ATTC 26550 (E), *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch TIST 5120 (F) มาผลิตกรดซิตริกโดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ 3 แหล่ง ซึ่งได้แก่ น้ำทิ้งของส้มจากโรงงานส้มสด (O), น้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานมาลีสามพราน (P_1), น้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม (P_2) มาเป็นวัตถุดิบในการหมักที่อุณหภูมิห้องและความเร็วรอบของเครื่องเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4-2

จากผลดังตารางที่ 4-2 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ทั้ง 3 แหล่ง เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริกได้ และเชื้อส่วนใหญ่จะผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดประมาณวันที่ 12-15 จากการเปรียบเทียบปริมาณกรดซิตริกที่ได้จากน้ำทิ้งทั้ง 3 แหล่ง แม้ว่าปริมาณกรดซิตริกที่ตรวจวัดได้เมื่อเลี้ยงเชื้อ A, B, C , D, E และ F ในน้ำทิ้งส้มจะมีแนวโน้มที่สูงกว่าน้ำทิ้งจากแหล่งอื่น แต่เนื่องจากน้ำทิ้งของส้มมีปริมาณกรดซิตริกสูง (จากตารางที่ 4-1) ดังนั้นปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อผลิตได้นั้นจึงมีปริมาณน้อยกว่าการใช้แหล่งน้ำทิ้งอื่นๆ จากเหตุผลนี้จึงพบว่าแหล่งน้ำทิ้งที่เหมาะสมในการนำมาผลิตกรดซิตริกมากที่สุด ได้แก่ น้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม (P_2) ซึ่งมีปริมาณกรดซิตริกเริ่มต้นเพียง 3 กรัมต่อลิตร แต่ในการหมักของเชื้อ F และ E สามารถตรวจปริมาณกรดซิตริกได้ถึง 14.8 และ 11.65 กรัมต่อลิตรตามลำดับ รองลงมาคือ น้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานมาลีสามพราน (P_1) ซึ่งตรวจปริมาณกรดซิตริกที่เชื้อ C และ B หมักได้ 15.1 และ 13.1 ตามลำดับ

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้เลือกน้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม (P_2) มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ C, E และ F เพื่อทำการศึกษาในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-2 แสดงปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่เชื้อจุลินทรีย์ 6 สายพันธุ์ ผลิตขึ้นโดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ 3 แหล่งเป็นวัตถุดิบ

แหล่งน้ำทิ้ง	เชื้อจุลินทรีย์	เวลา (วัน)*	ปริมาณกรดซิตริก สูงสุด (กรัม / ลิตร)
น้ำทิ้งของส้มจาก	A	9	12.0
โรงงานส้มสด	B	9	11.35
	C	15	13.2
	D	12	10.68
	E	15	13.5
	F	15	14.2
น้ำทิ้งของสับปะรด	A	12	10.6
จากโรงงานมาลี	B	12	13.1
สามพราน	C	12	15.1
	D	12	8.55
	E	9	8.25
	F	15	7.9
น้ำทิ้งของสับปะรด	A	12	8.15
จากโรงงานไซโก้	B	12	9.6
	C	12	9.6
	D	12	4.7
	E	15	11.65
	F	15	14.8

* เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของหมักที่ให้ปริมาณกรดซิตริกได้สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลของความเป็นกรดเริ่มต้นของอาหารเหลว (น้ำทิ้ง) ที่มีต่อการผลิตกรดซิตริก

จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ *A.ficuum* (Reichert) Hennings ATTC 12845 (C), *A.niger* var Tieghem ATTC 26550 (E) และ *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch TIST 5120 (F) มาผลิตกรดซิตริกโดยใช้ น้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม (P_2) ที่มีการปรับค่าความเป็นกรดเริ่มต้นต่างกันเป็น 3, 4, 5 และ 6 มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตและทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน ผลที่ได้ดังตารางที่ 4-3

จากรายงานของ Xu และคณะในปีคศ. 1989 พบว่า พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกจะอยู่ในช่วง 4-5 ในขณะที่ Clark และ Lentz (1963) และ Hossain และคณะ (1984) พบว่าพีเอชเริ่มต้นควรเป็น 5.0-6.5 ดังนั้นการทดลองนี้จึงผันแปรความเป็นกรดเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3, 4, 5 และ 6 จากผลการทดลองตามตารางที่ 4-3 จะพบว่า การปรับความเป็นกรดในน้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม (P_2) ซึ่งเดิมมีความเป็นกรดเริ่มต้นเป็น 4 ให้กลายเป็น 3, 5 และ 6 นั้น จะได้พีเอชที่ 6 เป็นพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ C และ E ในการผลิตกรดซิตริก โดยพีเอชเริ่มต้นดังกล่าวเชื้อสามารถผลิตกรดซิตริกได้ 17.3 และ 15.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการปรับพีเอชเป็นร้อยละ 24.85 และ 30.26 ตามลำดับ ในขณะที่พีเอชที่ 5 เป็นพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ F ซึ่งสามารถผลิตกรดซิตริกได้ 2.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลิตได้สูงกว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่ไม่มีการปรับพีเอชร้อยละ 6.8 จะเห็นได้ว่าการเพิ่มค่าความเป็นกรดขึ้นเรื่อยๆมิได้มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของกรดซิตริก แต่พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ แสดงดังรูปที่ 4-1

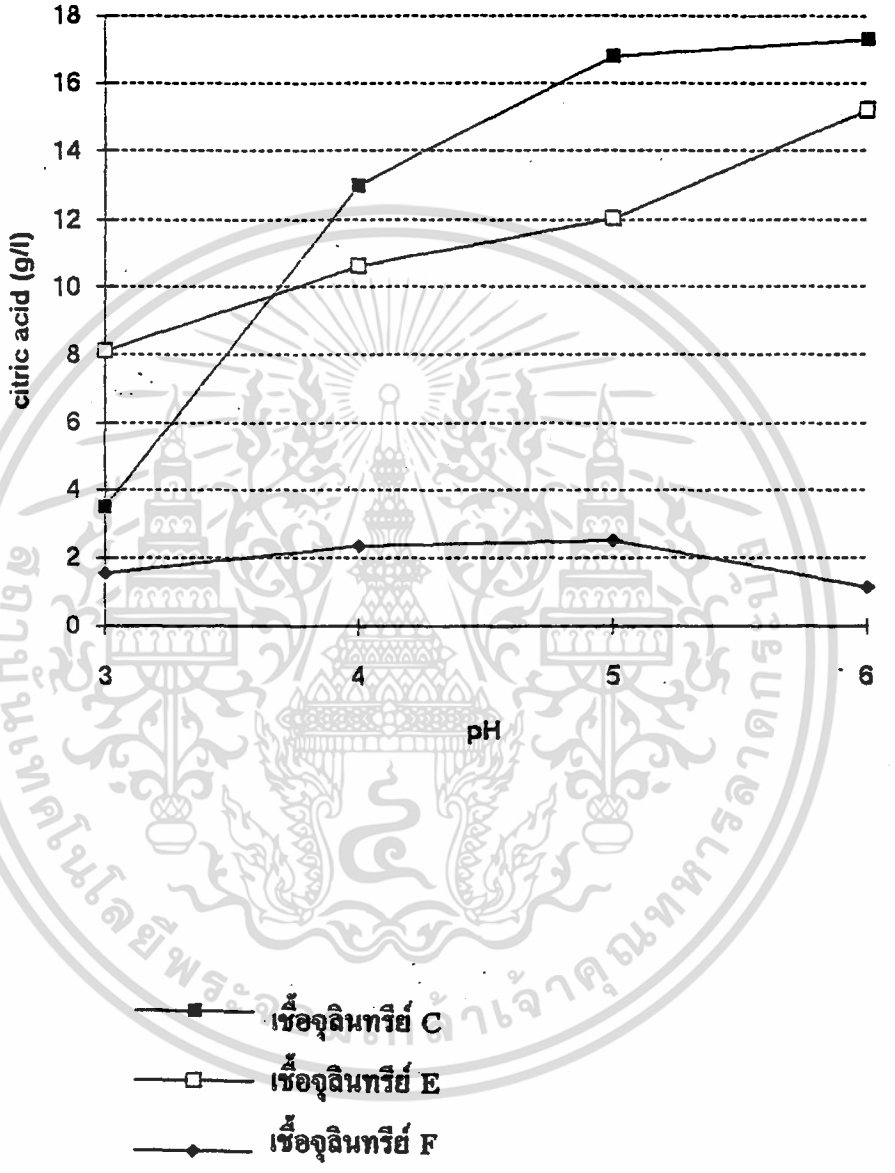
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-3 แสดงปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่เชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ ผลิตได้ในอาหารเหลวที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างกัน

เชื้อจุลินทรีย์	ความเป็นกรดเริ่มต้น	ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด (กรัม / ลิตร)
C	3	3.5
	4	13.0
	5	16.8
	6	17.3
E	3	8.1
	4	10.6
	5	12.05
	6	15.2
F	3	1.55
	4	2.33
	5	2.5
	6	1.125

A.ficuum (Reichert) Hennings ATTC 12845 (C), *A.niger* var Tieghem ATTC 26550 (E) และ *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch TIST 5120 (F) หมักใน น้ำทิ้งของสับปะรดจาก โรงงานสยามอุตสาหกรรม (P_2) ที่มีการปรับค่าความเป็นกรดเริ่มต้นต่างกันเป็น 3, 4, 5 และ 6 และทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-1 ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่ผลิตได้ในอาหารเหลวที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ผลการศึกษาปริมาณเมทานอลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริก

จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ *A.ficuum* (Reichert) Hennings ATTC 12845 (C), *A.niger* var Tieghem ATTC 26550 (E) และ *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch TIST 5120 (F) มาผลิตกรดซิตริกโดยใช้ น้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม (P_2) ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 และแปรผันปริมาณเมทานอลเป็น 0% และ 4% มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริกที่อุณหภูมิห้องความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4-4

จากตารางที่ 4-4 พบว่าเมทานอลมีผลกระทบต่อการผลิตกรดซิตริกของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ กล่าวคือ เมื่อมีการเติมเมทานอลลงไปในอาหารเหลวปริมาณ 4% เปรียบเทียบกับไม่เติมเมทานอลในอาหารเหลว (0%) พบว่าเมื่อเติมเมทานอล 4% เชื้อจุลินทรีย์ C, E และ F สามารถผลิตกรดซิตริกได้ 24.2, 16.0 และ 5.0 ตามลำดับ ซึ่งผลิตกรดซิตริกได้สูงกว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเหลวที่ไม่เติมเมทานอลถึงร้อยละ 28.5, 5.0 และ 77.5 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-4 แสดงผลของเมทานอลต่อการผลิตกรดซิตริกสูงสุด โดยเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ ซึ่งหมักในอาหารเหลวที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0

เชื้อจุลินทรีย์	ปริมาณเมทานอล (%)	ปริมาณกรดซิตริกสูงสุด (กรัม / ลิตร)
C	0	17.3
	4	24.2
E	0	15.2
	4	16.0
F	0	1.125
	4	5.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ผลการศึกษาอิทธิพลร่วมของความเป็นกรดเริ่มต้นกับปริมาณเมทานอล

จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ *A.ficuum* (Reichert) Hennings ATTC 12845 (C), *A.niger* var Tieghem ATTC 26550 (E) และ *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch TIST 5120 (F) มาผลิตกรดซิตริกโดยใช้ น้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม (P_2) ที่มีการผันแปรความเป็นกรดเริ่มต้น 3, 4, 5 และ 6 และปริมาณเมทานอลเป็น 0%, 2%, 4% และ 6%ตามลำดับมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริกและบ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4-5

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเมทานอล และความเป็นกรดเริ่มต้นมีผลต่อปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ นอกจากนั้นอิทธิพลร่วมของปัจจัยทั้ง 2 ยังมีผลต่อปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 90% ในทุกๆเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณกรดซิตริกที่ได้ในแต่ละระดับของปริมาณเมทานอลและความเป็นกรดเริ่มต้นโดยวิธี Duncan 's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าปริมาณเมทานอลที่ใช้ร้อยละ 4 ในน้ำทิ้งของสับปะรดที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดเป็น 6 หรือ 5 นั้น เชื้อ C สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด และแตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้ปริมาณกรดซิตริกเป็น 24.2 และ 24.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ E นั้นจะเจริญและผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดเมื่อใช้ปริมาณเมทานอลร้อยละ 6 และความเป็นกรดเริ่มต้นเป็น 5 โดยปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้เป็น 20.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ F จะผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดเริ่มต้น 6 และปริมาณ เมทานอลเป็น ร้อยละ 4 แสดงดังรูปที่ 4-2.1-4-2.3

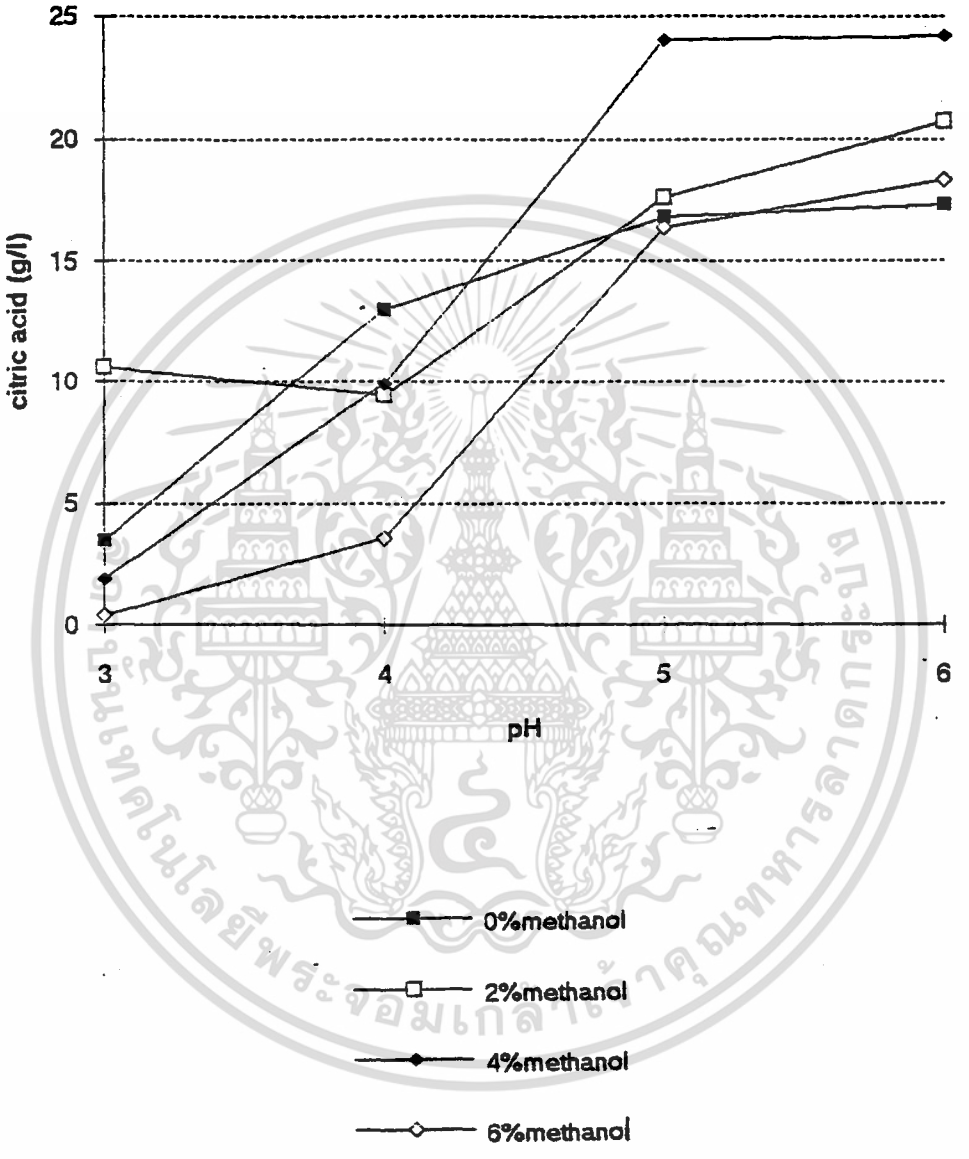
จากผลการทดลองที่ได้ศึกษามาทั้งหมดนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อ C เป็นเชื้อที่ศักยภาพสูงสุดในการผลิตกรดซิตริก เมื่อใช้น้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม (P_2) ซึ่งมีการปรับสภาพให้มีค่าความเป็นกรดเริ่มต้นเท่ากับ 6 และเติมเมทานอลลงในน้ำทิ้งร้อยละ 4 เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตกรดซิตริกที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อ C และวัตถุดิบที่มีการปรับสภาพที่เหมาะสมดังกล่าวมาผลิตกรดซิตริกเพื่อศึกษาหาอุณหภูมิในการบ่มและความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-5 แสดงปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตได้ในอาหารเหลว ที่มีการปรับค่าพีเอชและปริมาณเมทานอลต่างๆ

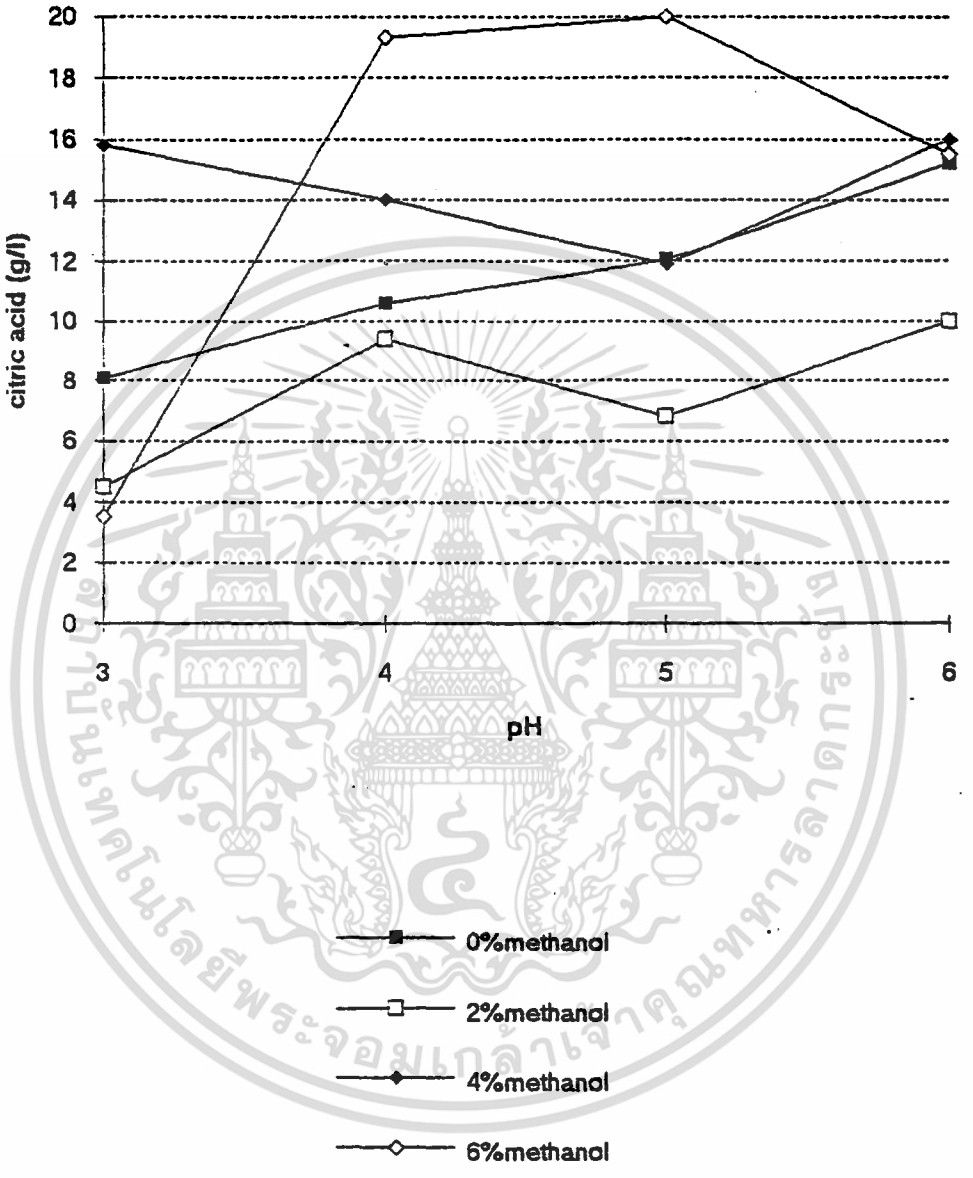
ค่าความเป็นกรด (pH)	ปริมาณเมทานอล (%)	ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่เชื้อผลิตได้ (g/l)		
		เชื้อ C	เชื้อ E	เชื้อ F
3.0	0	3.5	8.1	1.55
	2	10.6	4.5	0.8
	4	1.9	15.8	0.75
	6	0.41	3.5	0.315
4.0	0	13.0	10.6	2.33
	2	9.4	9.4	0.35
	4	9.9	14.0	1.26
	6	3.6	19.3	0.45
5.0	0	16.8	12.05	2.5
	2	17.6	6.8	0.55
	4	24.0	11.9	0.28
	6	16.4	20.0	2.06
6.0	0	17.3	15.2	1.125
	2	20.7	10.0	2.3
	4	24.2	16.0	5.0
	6	18.3	15.5	2.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



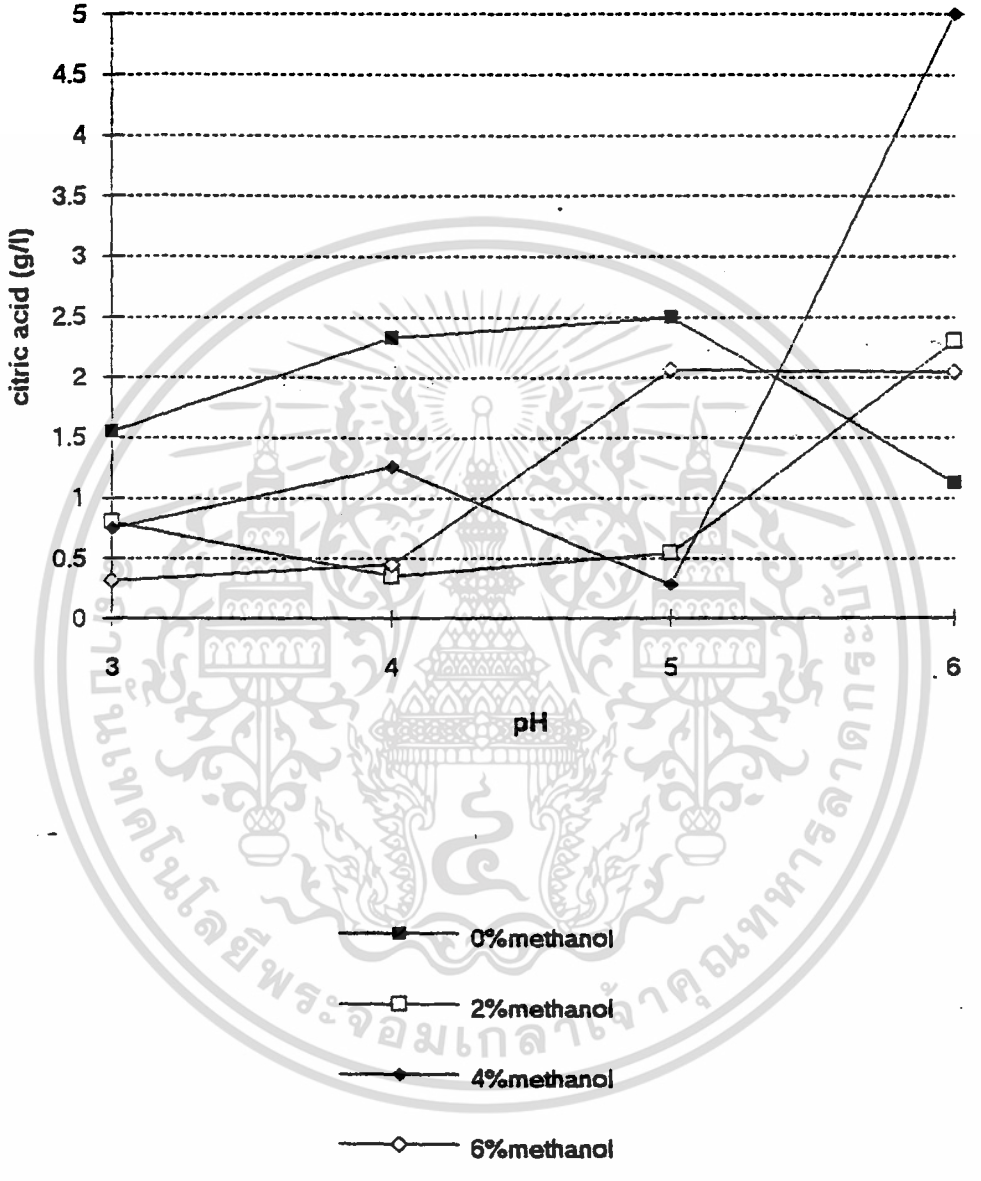
รูปที่ 4-2.1 แสดงปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่เชื้อจุลินทรีย์ C ผลิตได้จากน้ำทิ้ง P_2 ที่มีการปรับค่าความเป็นกรดเริ่มต้น และปริมาณเมทานอลค่าต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-2.2 แสดงปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่เชื้อจุลินทรีย์ E ผลิตได้จากน้ำทิ้ง P_2 ที่มีการปรับค่าความเป็นกรดเริ่มต้น และปริมาณเมทานอลค่าต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-2.3 แสดงปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่เชื้อจุลินทรีย์ F ผลิตได้จากน้ำทิ้ง P_2 ที่มีการปรับค่าความเป็นกรดเริ่มต้น และปริมาณเมทานอลค่าต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ผลการปรับปรุงความเร็วรอบของเครื่องเขย่าและอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริก

จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ *A.ficuum* (Reichert) Hennings ATTC 12845 (C) มาผลิตกรดซิตริกโดยใช้ น้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม (P_2) ที่มีการปรับสภาพความเป็นกรดเริ่มต้นเป็น 6 และเติมเมทานอลลงไปร้อยละ 4 มาเป็นวัตถุดิบ บ่มที่อุณหภูมิและความเร็วรอบของเครื่องเขย่าแตกต่างกัน ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4-6

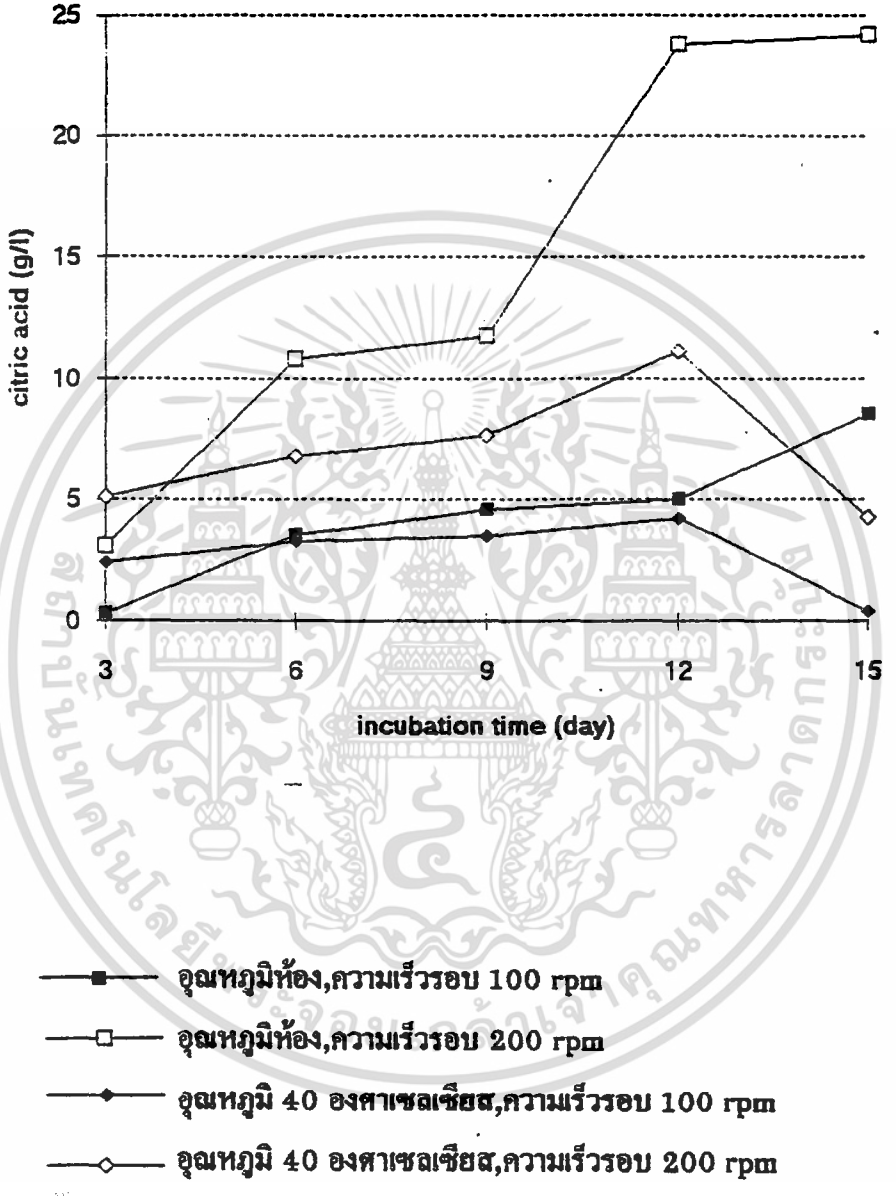
จากตารางที่ 4-6 จะเห็นได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ *A.ficuum* (Reichert) Hennings ATTC 12845 (C) สามารถผลิตกรดซิตริกโดยใช้น้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม (P_2) ที่มีการปรับสภาพความเป็นกรดเริ่มต้นเป็น 6 และเติมเมทานอลลงไปร้อยละ 4 มาเป็นวัตถุดิบ ได้อย่างดี และเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เชื้อสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงถึง 24.2 กรัมต่อลิตร และพบว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40องศาเซลเซียสที่ความเร็วรอบ 100และ 200รอบต่อนาที เชื้อจะผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณน้อยมาก หรือกรณีที่บ่มโดยให้ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าเป็น 100 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิ 40องศาเซลเซียสก็ตาม ผลผลิตกรดซิตริกที่ได้ก็มีปริมาณน้อยเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าความเร็วรอบและอุณหภูมิในการบ่มก็เป็นปัจจัยสำคัญที่จะต้องทำการศึกษาเพื่อหาความเหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-6 ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่ผลิตได้เมื่อมีการปรับปรุงอุณหภูมิและความเร็วรอบของเครื่องเขย่าค่าต่างๆกัน

อุณหภูมิ	ความเร็วรอบของ shaker (รอบต่อนาที)	ปริมาณกรดซิตริก (g/l)				
		วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15
อุณหภูมิห้อง	100	0.32	3.5	4.55	5.0	8.55
	200	3.05	10.8	11.75	23.8	24.2
40 องศาเซลเซียส	100	2.4	3.25	3.45	4.2	0.385
	200	5.1	6.8	7.68	11.1	4.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-3 แสดงผลกระทบของอุณหภูมิและความเร็วรอบที่มีต่อการผลิตกรดซิตริก ของ *A.ficuum* (Reichart)Hennings ATCC 12845

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ผลการศึกษาสภาวะที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก

ผลที่ได้จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณสูงมาทำการหมักน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ซึ่งผ่านการปรับสภาพให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตมาทำการศึกษาหาสภาวะที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักได้ผลดังตารางที่ 4-7 โดยใช้เชื้อ *A.ficuum* (Reichert) Hennings ATTC 12845 (C) หมักน้ำทิ้งสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 และเติมเมทานอลร้อยละ 4 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

จากตารางที่ 4-7 จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์จะผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไปในการผลิต สังเกตได้จากปริมาณกรดซิตริกที่เพิ่มขึ้นกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ ลด ลงในแต่ละวัน ค่าความเป็นกรดจะลดลงเมื่อมีการสะสมของกรดซิตริกในน้ำหมักเพิ่มขึ้น และพีเอชจะลดลงต่ำสุดเมื่อกรดซิตริกมีปริมาณสูงสุดคือในวันที่ 15 ของการหมัก ซึ่งวัดปริมาณกรดได้ 24.2 กรัมต่อลิตร และพบว่าการผลิตกรดซิตริกจะเกิดควบคู่ไปกับการเจริญของเซลล์ ด้วย ดังรูปที่ 4-4

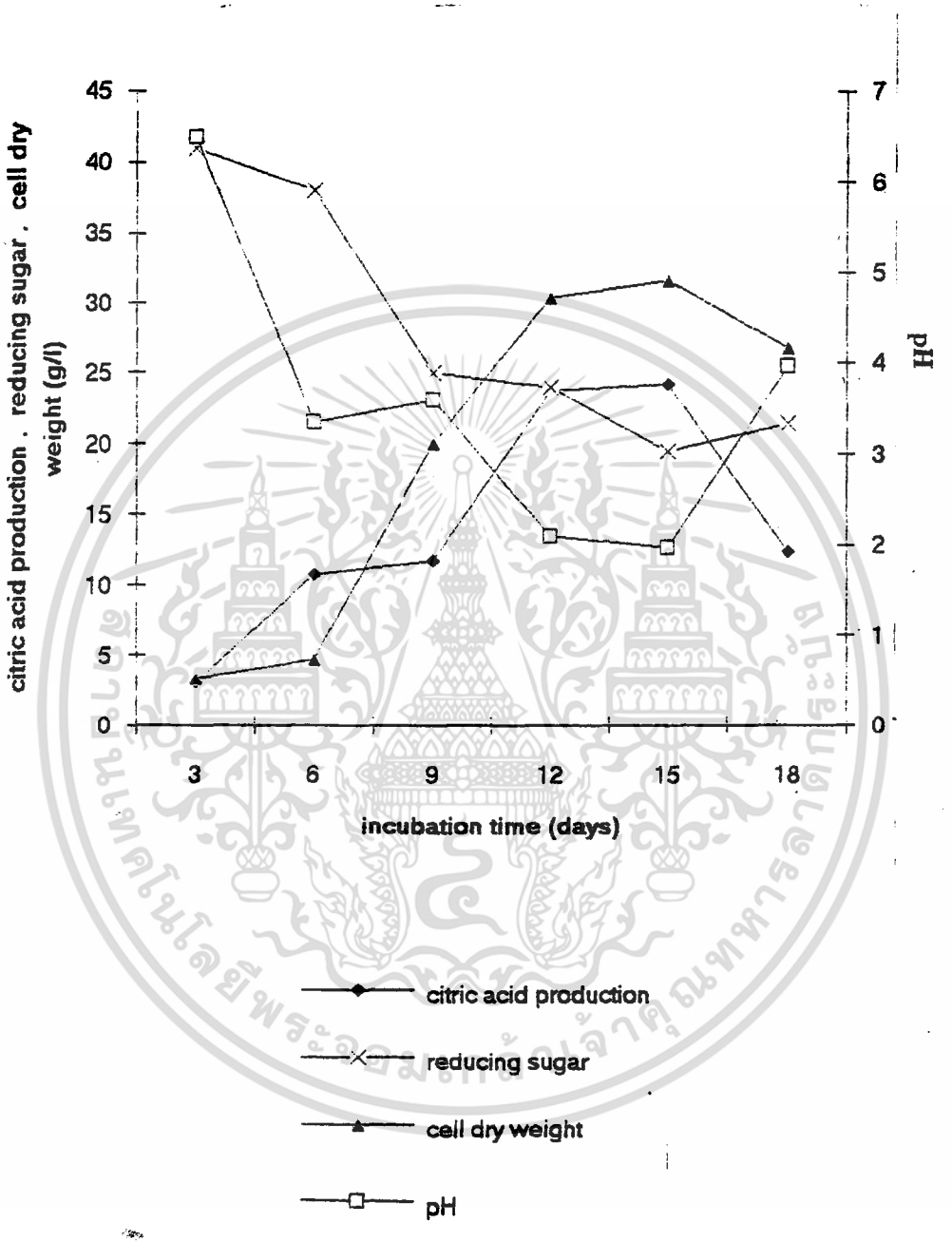
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-7 แสดงการเปลี่ยนแปลงต่างๆระหว่างการหมัก

วันที่	การเปลี่ยนแปลงต่างๆระหว่างการหมัก			
	กรดซิตริก (g/l)	น้ำตาลรีดิวส์ (g/l)	ค่าความเป็นกรด (pH)	น้ำหนักแห้ง (g/l)
3	3.05	41.0	6.5	3.312
6	10.8	38.0	3.35	4.71
9	11.75	25.0	3.6	20.1
12	23.8	24.0	2.1	30.42
15	24.2	19.5	1.98	31.6
18	12.4	21.5	3.96	26.8

โดยใช้เชื้อ *A.ficuum* (Reichert) Hennings ATTC 12845 (C) หมักน้ำทิ้งสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 และเติมเมทานอลร้อยละ 4 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-4 แสดงการเปลี่ยนแปลงต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการนำน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ ได้แก่ น้ำทิ้งของส้มจากโรงงานส้มสด , น้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานมาลีสามพรานและจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์และน้ำตาลรีดิวซ์ เหลืออยู่สูง มาเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อรา 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus niger* var Tieghem ATCC 11414 ,*A.carbonarius* (Bainier) Thom ATCC 8740, *A. ficuum* (Reichert) Hennings ATCC 12845, *A.niger* var Tieghem ATCC 26036 และ *A.niger* var Tieghem ATCC 26550 และยีสต์ 1 สายพันธุ์ได้แก่ *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch TIST 5120 พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ *A. ficuum* (Reichert) Hennings ATCC 12845 มีศักยภาพสูงในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำทิ้งของสับปะรดจากโรงงานสยามอุตสาหกรรม โดยผลิตได้ 9.6 กรัมต่อลิตรของน้ำทิ้ง และเมื่อนำน้ำทิ้งดังกล่าวมาทำการปรับสภาพให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกโดยปรับน้ำทิ้งให้มีสภาพความเป็นกรดเท่ากับ 6.0 และเติมเมทานอลร้อยละ 4.0 นำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *A. ficuum* (Reichert) Hennings ATCC 12845 สามารถผลิตกรดซิตริกได้เพิ่มขึ้นเป็น 24.2 กรัมต่อลิตรของน้ำทิ้ง ซึ่งเป็นปริมาณสูงกว่าเดิมถึงร้อยละ 60.33 จากประเด็นที่ได้กล่าวมาแล้วนี้สามารถกล่าวได้ว่าน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้สามารถนำมาผลิตกรดซิตริกโดยการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ได้ และจะผลิตได้ในปริมาณสูงมากขึ้นเมื่อมีการปรับสภาพให้มีความเหมาะสมต่อการผลิต ทั้งนี้ทั้งนั้นก็จะต้องมีการคิดคำนวณถึงความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจในการที่จะนำน้ำทิ้งกลับมาใช้ใหม่ ในงานวิจัยนี้ถึงจะมิได้ทำการคิดคำนวณเอาไว้ แต่ผลการทดลองที่ได้ก็สามารถนำมาใช้ประกอบการวิจัยใหม่ๆ และเป็นแนวทางในการพัฒนาทางเทคโนโลยีต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

1. สูตรอาหาร

Potato Dextrose Agar (PDA)

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

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein)

ชั่งฟีนอล์ฟทาลีน 2.5 กรัม ละลายใน เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 75 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2.2 สารละลายมาตราฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตราฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์หาได้โดยการไทเทรตกับสารละลายมาตราฐานโพแทสเซียมโฮโดรเจนพทาเลตซึ่งเป็นสารละลายมาตราฐานปฐมภูมิ

ก. สารละลายมาตราฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต(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. สารละลายสตือกโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 50 เตรียมได้โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เป็นของแข็งหนัก 250 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือด และตั้งทิ้งไว้จนเย็นถึงอุณหภูมิห้อง จำนวน 500 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ควรแช่บีกเกอร์ในน้ำเพื่อถ่ายเทความร้อน บรรจุสารละลายที่ได้ลงในขวดโพลีเอทิลีน

ค. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ปราศจากคาร์บอเนตเข้มข้นประมาณ 0.10 F เตรียมได้โดยต้มน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ให้เดือดประมาณ 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง ใช้กระจกนาฬิกาปิดปากบีกเกอร์ไว้ นำสารละลายสตือกโซเดียมไฮดรอกไซด์จากข้อ ข. มา 4 มิลลิลิตร เติมลงไปแล้วใช้แท่งแก้วค่อยๆคน พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขณะที่คน ถ่ายสารละลายที่ได้ทั้งหมดลงในขวดที่มีจุกปิดให้แน่น ถ้าเป็นขวดโพลีเอทิลีน ที่มีจุกเกลียวปิดจะดีมาก เก็บสารละลายนี้ไว้ใช้ตลอดการทดลอง

การไทเทรตหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมได้ในข้อ ค. จะต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วย การไทเทรตกับสารละลายมาตราฐานปฐมภูมิในข้อ ก. โดยดำเนินการดังนี้

1. บรรจุสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในออโตบิวเรต

2. ใช้ปิเปตต์ขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายมาตราฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 150-250 มิลลิลิตร แล้วเติม 2-3 หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีนลงไป เขย่าสารละลายที่ได้ แล้วนำไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จากออโตบิวเรตจนได้สีชมพูอ่อนเกิดขึ้น บันทึกระดับของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้

3. ทำการไทเทรตซ้ำอีกครั้ง หาปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้จะต้องไม่แตกต่างกันเกินกว่า 0.1 มิลลิลิตร ถ้าเกิน ต้องทำการไทเทรตซ้ำอีก แล้วนำปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใกล้กัน 2 ค่า มาหาค่าเฉลี่ย นำไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

ก. การวิเคราะห์โปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method

1. นำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรมาใส่ใน Kjeldahl flask
2. เติม K_2SO_4 7.68 กรัม $CuSO_4.5H_2O$ 0.28 กรัม และ selenium dioxide 0.04 กรัม ลงไปใน Kjeldahl flask เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst)
3. ค่อยๆเติม H_2SO_4 conc. 12 มิลลิลิตร ลงไปใน Kjeldahl flask ใส่ลูกแก้วกันกระเด็น 2-3 เม็ด
4. นำไปย่อย (digest) ตอนแรกใช้ไฟอ่อนๆ จนกระทั่งไม่มีฟองเกิดขึ้นแล้วจึงใช้ไฟแรง ในระหว่างการย่อยให้เขย่าฟลาสก์เป็นครั้งคราว
5. ย่อยต่อไปจนสารละลายใสเป็นสีฟ้าหรือเขียว แล้วจึงย่อยต่ออีก 10 นาที ปิดไฟ
6. ปล่อยให้สารละลายเย็น เติมน้ำกลั่นที่ไม่มีแอมโมเนียลงไป 20 มิลลิลิตร (เวลาเติมน้ำกลั่นให้ล้างที่รอบๆปากฟลาสก์เพื่อให้สารที่เกาะอยู่ละลายลงไปรวมกัน) ต่อ ฟลาสก์เข้ากับ Kjeldahl bulb เขย่าฟลาสก์จนสารละลายต่างๆละลายหมด
7. ต่อฟลาสก์เข้ากับเครื่องกลั่น
8. นำ H_3BO_3 (4%) 50 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสก์มารองสารละลายที่ได้จากการกลั่นตัว (distillate) ระวังต้องให้ปลายท่อกลั่นอยู่ใต้ H_3BO_3 ตลอดเวลา เมื่อเตรียมทุกอย่างเรียบร้อยแล้วค่อยๆเติม NaOH 50% ลงไป 50 มิลลิลิตร ปิดปากฟลาสก์ด้วย Kjeldahl bulb แล้วเขย่าฟลาสก์จะได้สารละลายสีดำ
9. กลั่นจนได้ distillate 150-200 มิลลิลิตร เมื่อครบให้เลื่อนฟลาสก์ออก ให้ปลายท่อกลั่นแตะที่ปากฟลาสก์ 5 นาที
10. ทิ้งฟลาสก์ไว้ให้เย็น แล้วจึงนำไปไทเทรตกับ 0.1 N H_2SO_4
11. หยดอินดิเคเตอร์ (indicator) ลงไป 2-3 หยด อินดิเคเตอร์ที่ใช้คือ screened methyl red ซึ่งเป็นส่วนผสมของ 0.16% methyl red และ 0.083% bromcresol green ในแอลกอฮอล์
12. ปริมาณกรดมาตรฐานที่ใช้ในการไทเทรต นำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีน (Total Kjeldahl Nitrogen ,TKN)
13. ทำ blank ควบคู่กันไปด้วย โดยใช้ทุกอย่างเหมือนกัน ยกเว้น ไม่ต้องใส่ตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณโปรตีน(TKN)จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$TKN\ (mg/l) = \frac{(A-B)*280}{10}$$

A = มิลลิลิตรของ H_2SO_4 ที่ใช้กับน้ำตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของ H_2SO_4ที่ใช้กับ blank

ข. การหาน้ำหนักแห้ง : ดำเนินงานตามวิธีของ Miller Method ดังนี้

วิธีการ

1. นำกระทงอลูมิเนียมอบที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำไปตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง(Desiccator) แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งที่แน่นอน(W_1)
2. นำตัวอย่างที่ทำการปั่นแยก ส่วนใสนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบอื่นๆ ส่วนตะกอนนำไปใส่ในกระทงอลูมิเนียมที่อบไว้
3. อบที่ 80 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ประมาณ 24-48 ชั่วโมง
4. นำมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก(W_2)
5. นำค่าน้ำหนักมาทำการคำนวณก็จะได้ค่าน้ำหนักแห้งของเซลในอาหาร 100 มิลลิลิตร

$$\text{น้ำหนักแห้ง} = \frac{(W_2-W_1)*1000}{100} \quad \text{กรัมต่อลิตร}$$

ค. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) :โดย วิธี Nelson Somogyi

สารเคมี

1. Copper reagent เตรียมโดยสารละลาย $Na_2HPO_{24}.12H_2O$ 71กรัม และโซเดียมโปรแทสเซียมทาร์เทรต 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล จำนวน 100 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 10.0 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 80 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ทำให้ร้อน เติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1.0 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอนกรองก่อนออกนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Nelson reagent เตรียมโดยสารละลาย $(NH_3)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติม $Na_2AsO_4.7H_2O$ 6 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นลงไป คนให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายมาตราฐานของน้ำตาลกลูโคส เตรียมสารละลายกลูโคส (analytical grade glucose) โดยอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง ความเข้มข้น 20 40 60 80 100 120 140 และ 160 ไมโครกรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่นบรรจุในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติม copper reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันที โดยแช่ในน้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัด ค่า O.D. ด้วยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวช่วงคลื่น 520 นาโนเมตร

   เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่า O.D.

2. การวิเคราะห์ตัวอย่าง ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 ถึง 100 ไมโครกรัม จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดสอบ แล้วนำไปวิเคราะห์ตามวิธีการเตรียม standard curve ของน้ำตาลกลูโคสข้างต้น คำนวณปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างจาก standard curve ของน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

Aspergillus niger var Tieghem ATCC 11414	สัญลักษณ์	A
A.carbonarius (Bainier) Thom ATCC 8740	สัญลักษณ์	B
A.ficuum (Reichert) Hennings ATCC 12845	สัญลักษณ์	C
A.niger var Tieghem ATCC 26036	สัญลักษณ์	D
A.niger var Tieghem ATCC 26550	สัญลักษณ์	E
Candida pulcherrima (Lindner) Windisch TIST 5120	สัญลักษณ์	F

รูปที่ 5-1 แสดงเชื้อต่างๆที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ วรพฤกษ์จารุ, นันทนา ธีรวันน์เสถียร, เสาวลักษณ์ วิริยะสมบัติกุล. การศึกษาสภาวะของชนิดน้ำตาลและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก โดย *Aspergillus niger*. โครงงานพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2535.

ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ , การผลิตกรดซิตริก จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม , พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 11-1 ถึง 11-18 ,โรงพิมพ์โดราชไทยรุ่งกิจ,1991.

Aravantinos - Zafiris , Constantin Tzia, Vassiliki Oreopoulou, Christos D Thomopoulos. Fermentation of Orange Processing Wastes for Citric Acid Production . J.Sci Food Agric 65(1994) :117-120.

Clark D S , Lentz C P. Submerged citric acid fermentation of beet molasses in tank- type fermenters . Biotechnol. Bioengng .5 (1984):193-199.

Hang Y D, Luh B S, Woodams E E. Microproduction of citric acid by solid state fermentation of kiwifruit peel . J. Food Sci. 52(1987):226-227.

Hossain M, Brooks J D, Maddox I S . Production of citric acid from whey permeate by fermentation using *Aspergillus niger*. N Z J. Diary Sci Technol. 18(1983) :161-168.

Hossain M, Brooks J D, Maddox I S . The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus* niger. Appl Microbiol Biotechnol .19(1984) : 393-397.

J. Wiley and Sons. Mass and energy balance analysis of metabolic pathways applied to citric acid production by *A. niger*. Biotechnol and Bioeng .18(1976) : 425-431.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Kunda S, Panda T, Majumdar S K, Guha B, Bandyopadhyay K K . Pretreatment of indian cane molasses for increased production of citric acid . Biotechnol Bioengng . 26 (1984) : 1114-1121.

La Nauze ,J.M. Aconitase and isocitric dehydrogenase of *A.niger* in selection to citric acid production. J. Gen. Microbiol. 44(1960): 73-81.

L .B. Lockwood , Organic acid Production . In J . E . Smith and D .R . Derry (des) The filamentous Fungi Vol. I : pp.141-151 , Edward arnold , London , 1975 .

O. Kirk , Encyclopedia of Chemical , Citric acid 2nd ed. : pp.524-541 , John wiley and Sons New york. 1964.

Ramakrishnan , C.U. , R. Stell and C.P.Lentz . Mechanism of citric acid fermentation and accumulation in *A.niger* . Appl.Microbiol. 20 (6).(1955) : 270-273.

S.C. Presscott and C.G. Dunn, Industrial Microbiology ,McGrawhill , New york .1949 .

S. Usami , From Memories of the school of science and Engineering ,42 : pp.17-26.1987.

Xu D-B, Kubicek C P, Roehr M. A comparison of factors influencing citric acid production by *Aspergillus niger* grown in submerged culture and on filter paper. Appl. Microbiol Biotechnol .30(1989) : 444-449.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้