อิทธิพลของตัวพาต่อการผลิตกรดมะนาวของ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง

ปริญญานิพนธ์

ของ

มนัส สุวามิน

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
พฤษภาคม 2547

ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ม 164อ

อิทธิพลของตัวพาต่อการผลิตกรดมะนาวของ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง

บทคัดย่อ

ของ

มนัส สุวามิน

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
พฤษภาคม 2547

มนัส สุวามิน. (2547). *อิทธิพลของตัวพาที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวของ Aspergillus niger Yang no.2 ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ, รองศาสตรจารย์ ดร.สมศักดิ์ สรั่งบิน, รองศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี วัฒนโภคาสิน.

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 6 ชนิด คือ แกลบ ผักตบชวา ชานอ้อย ซังข้าวโพด กาบมะพร้าว และฟางข้าว ถูกนำมาแปรเปลี่ยนรูปร่างจนได้เป็นวัสดุที่มีลักษณะแตกต่างกัน 13 รูปแบบ และนำไปหาปริมาณของวัสดุแต่ละรูปแบบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้วัสดุแต่ละรูปแบบเป็นตัวพา เพื่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง โดยการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SS medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส 140 g/L เป็นสารต้นตอคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน พบว่า เมื่อใช้ ฟางข้าวท่อนยาว (3.5 – 4.5 เซนติเมตร) ปริมาณ 9 กรัมต่อเพลทเป็นตัวพา จะให้ผลผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด คือ 95.36 g/L ในวันที่ 4 ของการหมัก และ เมื่อนำฟางข้าวท่อนยาว ปริมาณ 9 กรัมต่อเพลท มาใช้เป็นตัวพาในการผลิตกรดมะนาว โดยใช้แป้งชนิดต่างๆ ได้แก่ Soluble starch แป้งข้าวจ้าว แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพด ในปริมาณ 140 g/L เป็นสารต้นตอคาร์บอน หมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SS medium ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดมะนาว เอนไซม์ Glucoamylase เอนไซม์ β-Glucosidase และน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน พบว่า การหมักโดยแป้งแต่ละชนิดจะได้ปริมาณของกรดมะนาว เอนไซม์ Glucoamylase เอนไซม์ β-Glucosidase และน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่แตกต่างกัน โดย Soluble starch ให้ผลผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด คือ 73.93 g/L ในวันที่ 4 ของการหมัก นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาปริมาณของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ Glucoamylase จะมี activity สูงในช่วงแรกของการหมัก ซึ่งอยู่ในช่วง 6.0-10.0 U/mL ในขณะที่ activity ของเอนไซม์ β-Glucosidase จะมีปริมาณที่ต่ำกว่าเอนไซม์ Glucoamylase โดยมี activity อยู่ในช่วง 0.2-0.6 U/mL

EFFECT OF CARRIER FOR CITRIC ACID PRODUCTION OF *Aspergillus niger* Yang No.2 IN SEMI-SOLID CULTURE

AN ABSTRACT

BY

MANAS SUWAMIN

Presented in partial of the requirements

for the Master of Education degree in Chemistry

at Srinakharinwirot University

May 2004

Manas Suwamin. (2004). *Effect of carriers for citric acid production of Aspergillus niger Yang no.2 in semi-solid culture.* Master thesis, M.Ed (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Thararat Supasiri, Assoc. Prof. Dr. Yuwadee Watanapokasin, Assoc. Prof. Dr. Somsak Sarangbin.

Agricultural crop (Husk, Water hyacinth, Rice straw, Corn cob, Coir, and Bagasse) were used as a carrier for citric acid production from *Aspergillus niger* Yang no.2 in semi-solid culture. By using glucose at 140 g/L in SS medium as carbon source and varying and/or modifying the size, shape, and amount of carriers for citric acid production, citric acid was produced in highest amount (95.36 g/L) when using rice straw (3.5-4.5 cm length) at 9 g/plate. It was found that citric acid production was obtained in different amount when four kinds of starch were used as carbon source and rice straw as carrier. The highest amount of citric acid was obtained from soluble starch as carbon source at 73.93 g/L on the fourth day of cultivation. Glucoamylase and β-glucosidase activities were determined everyday during the cultivation period (7 day). It was found that the enzyme glucoamylase posseses higth activity (6.0-10.0 U/mL) in the first period of fermentation while β-glucosidase have low activity (0.2-0.6 U/mL).

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

อิทธิพลของตัวพาต่อการผลิตกรดมะนาวของ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง

ของ

นายมนัส สุวามิน

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.นภาภรณ์ หะวานนท์)
วันที่ 28 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2547

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธารารัตน์ ศุภศิริ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ยุวดี วัฒนโภคาสิน)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ สรั่งบิน)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ ศรีไพโรจน์)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(อาจารย์ ดร. วัลยา อุทัยสาง)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความความกรุณาอย่างสูงจาก อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ทั้ง 3 ท่านคือ รศ.ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ รศ.ดร.สมศักดิ์ สรั่งบิน , และ รศ.ดร.ยุวดี วัฒนโภคาสิน ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และข้อแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการวิจัย ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ประเสริฐ ศรีไพโรจน์ ที่กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการสอบให้ข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ช่วยสั่งสอนให้ความรู้ เอ็นดู เมตตา และเอื้อเฟื้อในด้านต่างๆ เป็นอย่างดี และ ขอขอบพระคุณ ดร.วัลยา อุทัยสาง ที่สอนวิธีการใช้เครื่องมือ พร้อมทั้งกรุณามาเป็นกรรมการสอบให้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และสารเคมี ระหว่างทำการวิจัย

ขอบคุณเพื่อนร่วมรุ่นร่วมสถาบัน สมณรัตน์ ประนัดฎา ฆาสินี ที่เป็นกำลังใจ คอยให้คำปรึกษา และ ช่วยเหลือกันตลอดมา ขอขอบคุณ คุณสุมาลี ที่คอยช่วยเหลือการทำการวิจัย ขอบคุณ คุณสมัชชา ที่เอื้อเฟื้อคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการพิมพ์ปริญญานิพนธ์นี้ ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ภาควิชาเคมี ทุกคน สำหรับน้ำใจไมตรี และ ความปรารถนาดีที่มีให้กันเสมอมา

ท้ายสุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ-คุณแม่ และญาติพี่น้อง ซึ่งได้ให้มาซึ่งความรัก ความเอาใจใส่ ความอบอุ่น และทุนการศึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจอันยิ่งใหญ่ของข้าพเจ้ามาโดยตลอด

มนัส สุวามิน

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
	ความสำคัญของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	2
	นิยามศัพท์เฉพาะ	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	คุณสมบัติและประโยชน์ของกรดมะนาว	4
	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว	5
	ลักษณะทั่วไปของ *Aspergillus niger*	6
	การคัดเลือกพันธุ์	7
	การผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลว	7
	แหล่งคาร์บอน	8
	หลักทั่วไปในการเก็บรักษาและเตรียมเชื้อจุลินทรีย์	8
	ชีวเคมีการผลิตกรดมะนาว	10
	วัตถุดิบ	12
	สัญฐานวิทยาของเชื้อรา	14
	การเก็บเกี่ยวผลผลิต	15
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
3	วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	18
	วัสดุอุปกรณ์	18
	สารเคมี	18
	ขั้นตอนการดำเนินงาน	19

สารบัญ(ต่อ)

บทที่		หน้า
3 (ต่อ)	การเตรียมและเก็บรักษาเชื้อ	20
	การผลิตกรดมะนาวด้วยสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็งเมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นตัวพา	20
	การเตรียม Culture filtrate สำหรับการเจริญแบบกึ่งแข็ง	30
	การผลิตกรดมะนาวโดยมีสารจำพวกแป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอน	30
	การวัดกรดมะนาวใน Culture filtrate	30
	การวัดน้ำตาลรีดิวซ์	31
	การวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์	31
4	ผลการวิจัย	32
	อิทธิพลของการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว.	32
	ผลการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมที่สุดของฟางข้าว (ท่อนยาว)	54
	ผลการศึกษาการใช้ตัวพาในการหมักกรดมะนาวโดยใช้แป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอน	55
5	สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ	65
	สรุปผลการทดลอง	65
	อภิปรายผลการทดลอง	66
	ข้อเสนอแนะ	68
บรรณานุกรม		70
ภาคผนวก		73
ประวัติย่อผู้วิจัย		76

บัญชีตาราง

ตาราง หน้า

1 อะไมโลสและอะไมโลเพคตินในแป้งชนิดต่างๆ 12

2 สมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน..... 13

3 สรุปปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดของตัวพาแต่ละชนิด..... 53

4 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพา..... 54

5 ปริมาณเอนไซม์ glucoamylase และ β-Glucosidase ที่ผลิตได้
จากการใช้ Soluble starch เป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 57

6 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตได้จากการใช้
Soluble starch เป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 57

7 ปริมาณเอนไซม์ glucoamylase และ β-Glucosidase ที่ผลิตได้
จากการใช้แป้งข้าวจ้าวเป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 59

8 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตได้จากการใช้
แป้งข้าวจ้าวเป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 59

9 ปริมาณเอนไซม์ glucoamylase และ β-Glucosidase ที่ผลิตได้
จากการใช้ แป้งมันสำปะหลังเป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 61

10 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตได้จากการใช้
แป้งมันสำปะหลังเป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 61

11 ปริมาณเอนไซม์ glucoamylase และ β-Glucosidase ที่ผลิตได้
จากการใช้ แป้งข้าวโพดเป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 63

12 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผลิตได้จากการใช้
แป้งข้าวโพดเป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 63

13 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยใช้สารจำพวกแป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 64

14 องค์ประกอบของ Czapek-Dox minimum medium (solution)..... 74

15 องค์ประกอบของ SS medium (solution)..... 74

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว	4
2	ลักษณะของ *Aspergillus niger*	6
3	Conidiophore ของ *Aspergillus niger*	6
4	Tricaboxylic acid cycle	11
5	ลักษณะของแกลบ	20
6	ลักษณะของผักตบชวา (รูปวงแหวน)	21
7	ลักษณะของผักตบชวา (รูปลิ่ม)	22
8	ลักษณะของผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่)	22
9	ลักษณะของผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก)	23
10	ลักษณะของกาบมะพร้าว (ชิ้น)	24
11	ลักษณะของกาบมะพร้าว (ผง)	24
12	ลักษณะของซังข้าวโพด (แผ่น)	25
13	ลักษณะของซังข้าวโพด (ชิ้น)	26
14	ลักษณะของซานอ้อย (หยาบ)	26
15	ลักษณะของซานอ้อย (ละเอียด)	27
16	ลักษณะของฟางข้าว (ท่อนยาว)	28
17	ลักษณะของฟางข้าว (ท่อนสั้น)	28
18	กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีแกลบเป็นตัวพา	33
19	กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มีแกลบเป็นตัวพา	34
20	กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีผักตบชวา (รูปวงแหวน) เป็นตัวพา	35
21	กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มีผักตบชวา (รูปวงแหวน) เป็นตัวพา	35
22	กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีผักตบชวา (รูปลิ่ม)เป็นตัวพา	36
23	กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มีผักตบชวา (รูปลิ่ม) เป็นตัวพา	37

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

24 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่) เป็นตัวพา..... 38

25 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มีผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่) เป็นตัวพา..... 38

26 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก)เป็นตัวพา..... 39

27 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มีผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก) เป็นตัวพา..... 40

28 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีกาบมะพร้าว (ชิ้น) เป็นตัวพา..... 41

29 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มี กาบมะพร้าว (ชิ้น) เป็นตัวพา..... 41

30 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีกาบมะพร้าว (ผง) เป็นตัวพา..... 42

31 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มี กาบมะพร้าว (ชิ้น) เป็นตัวพา..... 43

32 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีซังข้าวโพด (แผ่น) เป็นตัวพา..... 44

33 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มีซังข้าวโพด (แผ่น) เป็นตัวพา..... 44

34 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีซังข้าวโพด (ชิ้น) เป็นตัวพา..... 45

35 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มีซังข้าวโพด (ชิ้น) เป็นตัวพา..... 46

36 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีชานอ้อย (หยาบ) เป็นตัวพา..... 47

37 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มีชานอ้อย (หยาบ) เป็นตัวพา..... 47

38 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีชานอ้อย (ละเอียด) เป็นตัวพา..... 48

39 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มีชานอ้อย (ละเอียด) เป็นตัวพา..... 49

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

40 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพา..... 50

41 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มีฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพา..... 50

42 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีฟางข้าว (ท่อนสั้น) เป็นตัวพา..... 51

43 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในการหมักที่มีฟางข้าว (ท่อนสั้น) เป็นตัวพา..... 52

44 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพา..... 54

45 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการใช้ Soluble starch เป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 56

46 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการใช้แป้งข้าวจ้าว เป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 58

47 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการใช้แป้งมันสำปะหลัง เป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 60

48 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการใช้แป้งข้าวโพด เป็นสารต้นตอคาร์บอน..... 62

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ภูมิหลัง

กรดมะนาว (Citric acid) เป็น กรดอินทรีย์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมยา และ อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากกรดมะนาวละลายน้ำได้ดี ให้รสเปรี้ยว และมีความเป็นพิษต่ำ ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม จะใช้กรดมะนาวเป็นสารปรับสภาพความเป็นกรดและเพิ่มรสชาติ นอกจากนี้ กรดมะนาวยังมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์อีกหลายด้าน ได้แก่ สามารถป้องกันการเสียในอาหารหรือน้ำเชื่อมเข้มข้น (Syrup) การตกตะกอนในไวน์ การตกผลึกในน้ำผึ้ง การเหม็นหืนในผลิตภัณฑ์จำพวกไขมันและช็อกโกแลต และการเปลี่ยนสี กลิ่น รส ในเนื้อปู กุ้ง พืชผัก ผลไม้บรรจุกระป๋อง นอกจากนี้ยังช่วยรักษากรดแอสคอร์บิกที่มีในธรรมชาติของอาหาร ในอุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง ใช้เป็นสารปรับค่าความเป็นกรดด่าง ป้องกันการออกซิเดชัน (Antioxidant) ช่วยทำให้เกิดฟองในยาลดกรดในกระเพาะอาหาร และเนื่องจาก กรดมะนาวสามารถย่อยสลายได้ง่าย ในปัจจุบันจึงนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอกแทนฟอสเฟต และใช้กำจัดกำมะถันในโรงงาน อุตสาหกรรม

การที่กรดมะนาวมีประโยชน์หลายด้านดังกล่าว จึงทำให้ความต้องการในการใช้กรดมะนาว มีมาก เพื่อตอบสนองความต้องการในการใช้กรดมะนาวในอุตสาหกรรมเหล่านี้ จึงมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาการผลิตกรดมะนาวขึ้นอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้การผลิตมีประสิทธิภาพสูง

ปัจจุบันการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม อาศัยการหมักด้วยเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ ถึงแม้ว่าวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อผลิตกรดมะนาวมีแนวโน้มเป็นไปได้ก็ตาม แต่ให้ผลไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตที่ได้รับจากการหมัก จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถนำมาใช้ในการผลิตกรดมะนาวได้ เช่น เชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรีย จากการศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า เชื้อรา *Aspergillus niger* เป็นราที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม (กำเนิด สุภัณวงษ์. 2532 : 69) เพราะการปฏิบัติงานในกระบวนการผลิตสามารถทำได้ง่าย สามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกในการผลิตกรดมะนาว และผลผลิตที่ได้มีความคงตัวและมีปริมาณสูง ในการศึกษาขั้นต้นพบว่าปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อรา *Aspergillus niger* ในการผลิตแบบกึ่งแข็ง (Semi-solid culture) คือการใช้วัสดุให้เชื้อรายึดเกาะ หรือ ที่เรียกว่าตัวพา (Carrier)

เป็นที่ทราบกันดีว่า ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก เช่น ฟางข้าว แกลบ ผักตบชวา เป็นต้น วัสดุเหล่านี้ หาง่าย ราคาถูก การใช้วัสดุเหล่านี้ในการพัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตกรดมะนาว จะเป็นการเพิ่มมูลค่า และคุณค่าของวัสดุเหล่านี้ ซึ่งท้ายสุดจะเป็นการลดต้นทุนในการผลิตกรดมะนาว อันเป็นเป้าหมายสำคัญของการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการที่จะหาความสัมพันธ์ของตัวพา จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ไม่ว่าจะเป็น ชนิด รูปร่าง ขนาด และปริมาณ ที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด ในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาว เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นตัวพา โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบ Semi–solid culture อาทิ เช่น ชนิด รูปร่าง ขนาด และปริมาณ ต่อการผลิตกรดมะนาว โดยใช้กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน

1.2.2 ศึกษาผลการใช้ตัวพาเมื่อมีสารจำพวกแป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอน โดยใช้ เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบ Semi–solid culture ต่อการผลิตกรดมะนาว

1.3 ความสำคัญของงานวิจัย

การศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในครั้งนี้ เป็นการศึกษาเพื่อนำวัสดุที่มีอยู่ในท้องถิ่นซึ่งมีราคาถูกมาใช้ประโยชน์ นำมาเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเพื่อให้เป็นสารเคมีที่มีราคาสูง ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการหมักกรดมะนาวและประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการหมักกรดมะนาวในประเทศไทยให้มีต้นทุนต่ำ สามารถแข่งขันกับตลาดต่างประเทศได้ และช่วยลดการนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศ อีกทั้งเป็นการใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศให้เกิดคุณค่าสูงสุด ซึ่งส่งผลดีต่อเศรษฐกิจของประเทศทั้งในทางตรงและทางอ้อม

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 ศึกษาคุณลักษณะของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรบางประการเช่น ลักษณะทางกายภาพ เป็นต้น เพื่อใช้เป็นตัวพาในการผลิตกรดมะนาว ในการวิจัยจะใช้ทั้งหมด 6 ชนิด คือ แกลบ ผักตบชวา ซังข้าวโพด ชานอ้อย กาบมะพร้าว และ ฟางข้าว

1.4.2 ศึกษาความสัมพันธ์ของรูปร่าง ขนาด ปริมาณ และชนิดของตัวพาจากข้อที่ 1 ที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยใช้กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน เมื่อเจริญ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเลี้ยงแบบ Semi-solid culture

1.4.3 นำผลการศึกษาจากข้อที่ 2 ที่แสดงให้เห็นว่ามีการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด มาใช้ในการผลิตกรดมะนาวด้วยสารต้นตอคาร์บอนชนิดอื่น ได้แก่ Soluble starch แป้งข้าวจ้าว แป้งมันสำปะหลัง และ แป้งข้าวโพด

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.5.1 **ตัวพา** (Carrier) หมายถึง วัสดุที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้จุลินทรีย์ได้ยึดเกาะ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับอาหาร อากาศ และแร่ธาตุที่จำเป็น

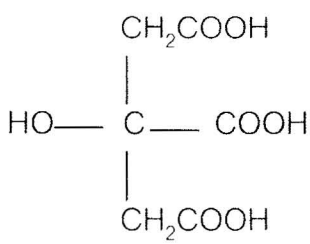
1.5.2 **สารต้นตอคาร์บอน** (Carbon source) หมายถึง สารที่เป็นแหล่งของพลังงาน และอะตอมของธาตุคาร์บอนที่จุลินทรีย์นำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆของเซลล์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณสมบัติและประโยชน์ของกรดมะนาว

2.1.1 สมบัติของกรดมะนาว

กรดมะนาว หรือ กรดซิตริก (Citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล 3 หมู่ (Tricarboxylic acid) มีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxy-1,2,3-propantricarboxylic acid หรือ β-hydroxy tricarboxylic acid มีสูตรทางเคมีเป็น $C_6H_8O_7$ มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 1 กรดมะนาวมีน้ำหนักโมเลกุล 192.12 ประกอบด้วย คาร์บอน 37.51% ไฮโดรเจน 4.20% และออกซิเจน 58.29% มีค่า pK_1 เท่ากับ 3.128 ค่า pK_2 เท่ากับ 4.767 และ pK_3 เท่ากับ 6.396 เมื่ออยู่ในสภาพแอนไฮดรัส จะมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 153^{0}C แต่ถ้าอยู่ในรูปโมโนไฮเดรตจะมีจุดหลอมเหลว เป็น 100^{0}C และความสามารถในการละลาย ขึ้นกับอุณหภูมิ โดยอุณหภูมิสูงจะละลายได้ดี (ชะไมพร. 2541; อ้างอิงจาก Windholz *et al*,1976)



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว (Citric acid)

2.1.2 ประโยชน์ของกรดมะนาว

กรดมะนาวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน ไม่ว่าจะเป็น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เภสัชกรรม และอุตสาหกรรมอื่นๆ โดยจุดประสงค์ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแต่ละประเภทก็จะแตกต่างกัน คือ

2.1.2.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ส่วนมากใช้กรดมะนาวเป็นสารทำให้เกิดกรดและเพิ่มรสชาติ ในเครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ (Soft drinks) จะเพิ่มให้รสชาติเย็น (Cool test) มักเติมใน น้ำอัดลม น้ำหวาน น้ำผลไม้ เครื่องดื่มเกลือแร่ ไวน์ เยลลี่แยม ลูกอม อาหารกระป๋อง และ

อาหารแช่แข็ง นอกจากนั้นยังสามารถป้องกันการขุ่นและการตกตะกอนของเครื่องดื่มที่ทำจากผลไม้ รวมทั้งสามารถนำไปเป็นสารป้องกันการออกซิเดชัน (antioxidants) ในลักษณะต่างๆได้ เช่น ใช้ในการป้องกันการเหม็นหืนของ อาหารจำพวกไขมันและน้ำมัน หรือ ใช้เพื่อช่วยรักษากรดแอสคอร์บิกที่มีในธรรมชาติของผักผลไม้ เป็นต้น

2.1.2.2 อุตสาหกรรมด้านเภสัชกรรม ใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมในการทำยาบางชนิด โดยใช้เป็นสารปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ช่วยทำให้เกิดฟองเมื่อรวมตัวกับคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนตในยาลดกรดในกระเพาะอาหาร ใช้ในการเตรียมยาแอสไพริน ช่วยในการละลายยาถ่ายและยาบรรเทาปวด ใช้เป็นสารกันการตกตะกอน ใช้เป็นสารทำให้เกิดความคงตัวของกรดแอสคอร์บิค ใช้เป็นสารเพิ่มรสชาติของยา และ นอกจากนี้ยังใช้เฟอริกแอมโมเนียซิเทรตช่วยในการรักษาโรคโลหิตจาง

2.1.2.3 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ใช้เป็นส่วนผสมของครีมนวดผม น้ำยาเซทผม โลชันทาผิว โดยใช้กรดมะนาวเป็นสารปรับความเป็นกรดด่าง ทำให้เกิดความแวววาว และความอ่อนนุ่มของผลิตภัณฑ์

2.1.2.4 อุตสาหกรรมอื่นๆ ใช้กรดมะนาวในรูปไตรโซเดียมซิเทรตแทนสารฟอสเฟตในการทำผงซักฟอก ใช้ไดไฮโดรเจนซิเทรตในการกำจัดซัลเฟอร์ไดออกไซด์จากก๊าซเชื้อเพลิงในโรงงานไฟฟ้าและเตาหลอมโลหะ นอกจากนี้ยังใช้กรดมะนาวเป็นส่วนผสมในสารทำความสะอาดโลหะ และล้างสนิม เนื่องจากสามารถรวมตัวกับโลหะหนักได้ดี

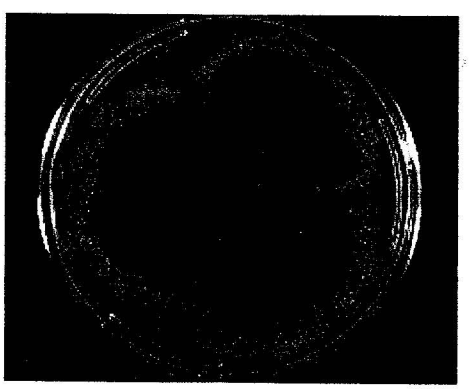
2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้ในการผลิตกรดมะนาวได้ เช่น เชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรีย ในปี 1917 Currie ผลิตกรดมะนาวได้เป็นครั้งแรกโดยใช้ *Aspergillus niger* และปัจจุบันยังคงใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดมะนาว ซึ่งข้อดีของการใช้ *Aspergillus niger* ในการผลิตกรดมะนาว คือ การปฏิบัติงานในกระบวนการผลิตสามารถทำได้ง่าย เชื้อราสามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกในการผลิตกรดมะนาว และ ผลผลิตที่ได้มีความคงตัวและมีปริมาณสูง

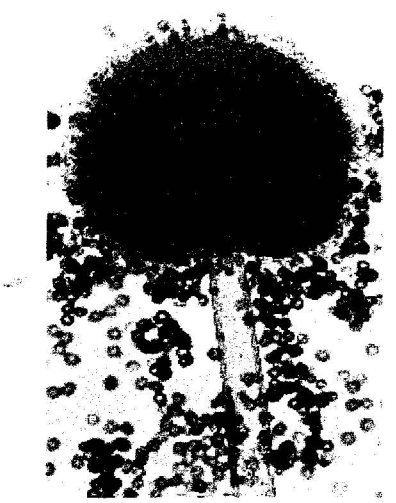
ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวจะแปรเปลี่ยนตามสายพันธุ์ของเชื้อราและวิธีการที่ใช้ นั่นคือ สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้ดีในสภาวะที่เรียกว่า Semi-solid culture เมื่อนำมาใช้ในการผลิตกรดมะนาวด้วยวิธี Shaking culture ก็อาจให้ผลผลิตกรดมะนาวได้ไม่ดี (Sarangbin S., *et al*, 1994) ส่วนสายพันธุ์ที่สามารถใช้คาร์บอนชนิดหนึ่งได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นก็อาจทำให้การผลิตกรดมะนาวได้ไม่ดี จึงทำให้มีการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดและมีราคาถูก สำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด

2.3 ลักษณะทั่วไปของ *Aspergillus niger*

Aspergillus niger เป็นเชื้อราที่นิยมใช้ในการผลิตกรดมะนาวด้วยกรรมวิธีการหมัก เชื้อรานี้จัดเป็นเชื้อราชั้นสูงใน Sub-division Eumycotina, Class Ascomycetes, Subclass Euascomycetidae โดยทั่วไป เชื้อราตัวนี้มีสีดำ แต่เมื่อเชื้อรานี้ถูกทำให้กลายพันธุ์ก็อาจเปลี่ยนสีเป็นน้ำตาลเขียวออกเหลือง หรือขาวก็ได้ ดังภาพประกอบ 2 ลักษณะของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ก็คือ เส้นใยของเชื้อรามีผนังกั้นเป็นห้องๆ ก้านชูอับสปอร์ (Conidiophore หรือ Stalk) ดังภาพประกอบ 3 ตั้งอยู่บนเซลล์ชนิดพิเศษที่เรียกว่า "Foot cell" เซลล์นี้มีขนาดใหญ่และผนังหนา ปลายสุดของก้านชูอับสปอร์จะมีหนึ่งสปอร์ (Vesicle) อับสปอร์นี้มีรูปร่างต่างๆกัน เช่น กลม รี และอื่นๆ บนอับสปอร์จะมีหนาม (Sterigma) อยู่โดยรอบหรือเพียงบางส่วนในบางครั้งจะสร้างหนามสองชั้น หนามชั้นแรกสุด (Primary sterigma) จะติดอยู่กับอับสปอร์ ส่วนหนามชุดที่สอง (Secondary sterigma) จะอยู่ถัดจากหนามชั้นแรกออกมา ถัดจากหนามจะเป็นที่ตั้งของสปอร์ (Conidia) สปอร์นี้อาจจะเกิดจากการยืดตัวของหนามแล้วสร้างผนังกั้น บางครั้งสปอร์จะติดกันเป็นสาย โดยสปอร์ที่อยู่นอกสุดของสายจะเป็นสปอร์ที่แก่ที่สุด



ภาพประกอบ 2 ลักษณะของ *A. niger*



ภาพประกอบ 3 Conidiophore ของ *A. niger*

2.4 การคัดเลือกพันธุ์

Aspergillus niger ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักในปัจจุบันเป็นเชื้อราที่ถูกทำให้กลายพันธุ์โดยใช้กรรมวิธีและสารเคมีต่างๆ เพื่อให้สามารถสร้างกรดมะนาวออกมาได้มากขึ้น (Das, 1972) แต่การรักษาประสิทธิภาพในการผลิตกรดของเชื้อให้คงที่ตลอดไปนั้นเป็นเรื่องลำบาก มักพบเสมอว่า เชื้อราที่เพาะจากสปอร์ที่เก็บไว้นานเกินไปนั้นจะผลิตกรดมะนาวออกมาได้น้อย ซึ่งเหตุผลของเรื่องนี้ยังไม่แน่ชัด วิธีแก้อย่างหนึ่งคือทำการถ่ายเชื้ออย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ Rohr และคณะ (1976) ได้เสนอแนะวิธีคัดเลือกพันธุ์ *Aspergillus niger* ที่ให้ผลผลิตสูงโดยทำการเพาะสปอร์เดี่ยวๆ ของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 115 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจหาปริมาณกรดมะนาวที่เกิดขึ้น โดยพ่นด้วยสารละลายของ *p*-Dimethyl-aminobenzaldehyde ที่มีความเข้มข้น 4% ซึ่งละลายอยู่ใน Acetic acid anhydride ให้ความร้อนที่ 140 องศาเซลเซียส 1 นาที ถ้ามีกรดมะนาวอยู่จะเกิดสีม่วงขึ้น (เพียง 1 ไมโครกรัมของกรดมะนาวก็สามารถตรวจพบได้) และปฏิกิริยานี้จำเพาะต่อกรดมะนาวเท่านั้น โดยกรดแร่หรือกรดอินทรีย์อื่นๆ ที่ผลิตได้จากเชื้อราจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารตรวจสอบแต่ประการใด ประสิทธิภาพในการสร้างกรดของโคโลนีมีหน่วยวัดเรียกว่า แอซิดยูนิเทจ (Acidunitage) (AU-value) ซึ่งมีค่าเท่ากับอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางของวงแหวนสีม่วงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ถ้าโคโลนีสร้างกรดออกมามากค่า (AU-value) ก็จะสูงตามด้วย

2.5 การผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลว

การผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลว(shake culture)ก็เป็นการผลิตกรดมะนาวที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดมะนาวอีกวิธีหนึ่ง โดยการหมักนอกจากจะใช้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงแล้วยังต้องควบคุมองค์ประกอบของอาหาร อุณหภูมิระหว่างการหมัก การให้อากาศ ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการหมักต้องไม่เร็วหรือช้าเกินไป ในระหว่างที่มีการหมักเอากรดมะนาวนั้นอาจแบ่งออกเป็น 2 ระยะ (Hockenhull, 1960) คือ ช่วงแรกของการหมักเชื้อราจะมีอัตราการเจริญสูงสุด น้ำตาลส่วนหนึ่งจะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญและสร้างเซลล์ ระยะแรกนี้เชื้อราจะผลิตกรดออกมาน้อยระยะถัดมาอัตราการเจริญของเชื้อราจะลดลง แต่เชื้อราจะเริ่มสร้างกรด ในระยะนี้ ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสิ่งสำคัญมาก ถ้าควบคุมไม่ดี ผลผลิตกรดมะนาวที่ได้จะมีปริมาณน้อย เพราะเชื้อราอาจสร้าง กรดอินทรีย์ตัวอื่น

2.6 แหล่งคาร์บอน (Carbon sources)

ในทางทฤษฎีแล้วน้ำตาลที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2-7 และชนิด 12 คาร์บอน สามารถเปลี่ยนเป็นกรดมะนาวได้ (Prescott & Dunn, 1959) แต่น้ำตาลที่ดีที่สุดในการผลิตกรดมะนาวโดย *Aspergillus niger* ก็คือ ซูโครส ถัดไปคือ กลูโคสและฟรุกโตส ตามลำดับ (Hossain; et al, 1983) ขณะที่กาแลคโตสไม่ให้กรดมะนาวออกมาเลย แต่เชื้อเจริญได้ดีพอๆ กับเลี้ยงในซูโครส (Hossain; et al, 1984) ส่วน Miall (1978) ประสบผลสำเร็จจากการใช้กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้ง นอกจากนี้ยังอาจใช้น้ำตาลจากอ้อยหรือหัวผักกาดหวานก็ได้ โดยปริมาณของน้ำตาลที่ใช้ทั่วไปจะอยู่ในช่วง 140 – 200 กรัมต่อลิตร (Prescott & Dunn, 1959) ส่วน Currie (1959) ใช้ซูโครสที่มีความเข้มข้น 125-150 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรดมะนาว ทางด้าน Doelger กับ Prescott (1934) พบว่าเมื่อใช้ซูโครสเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อดำเนินการหมักไปได้ 9-12 วัน และยังพบอีกว่าถ้าใช้น้ำตาลเกิน 150 กรัมต่อลิตร จะเหลือน้ำตาลภายหลังจากการหมักสูงกว่าปกติ(ต่ำกว่า 30 กรัมต่อลิตร) เมื่อทดแทนซูโครสด้วยฟรุกโตสหรือกลูโคส 10-50 กรัมต่อลิตร (จากจำนวนทั้งหมด 140 กรัมต่อลิตร) ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จะลดลงเมื่อเทียบกับการหมักที่ใช้ซูโครสเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ซูโครสที่ถูกย่อยไปบางส่วนในระหว่างการนึ่งฆ่าเชื้อจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลิตลดลงได้

2.7 หลักทั่วไปในการเก็บรักษาและเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

2.7.1 การคัดเลือกพันธุ์

เชื้อที่ใช้ในการหมักนั้นต้องผ่านการคัดพันธุ์มาแล้ว โดยเชื้อที่คัดไว้จะต้องไม่กลายพันธุ์ง่ายและมีความสามารถในการให้ผลผลิตที่ต้องการ เชื้อเหล่านี้อาจได้มาจากการปรับปรุงพันธุ์ในห้องปฏิบัติการที่ใดที่หนึ่ง หรืออาจได้มาจากการทดสอบสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อแล้วคัดเลือกพันธุ์ที่ดีเอาไว้ ความคงที่ของเชื้อเป็นลักษณะที่มีความสำคัญมากอันหนึ่ง เพราะอัตราการทำงานและผลผลิตที่ได้ไม่ควรมีการเปลี่ยนแปลง

2.7.2 การรักษากิจกรรมของเชื้อ

เชื้อที่เก็บรักษาไว้จะต้องเป็นเชื้อบริสุทธิ์และต้องอยู่ในสภาพที่ว่องไวอยู่เสมอ จุดประสงค์นี้สามารถบรรลุได้โดยให้ทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารที่เหมาะสมเป็นระยะๆ และจะต้องบ่มเชื้อจนเชื้อถึงระยะ Maximal stationary phase แล้วจึงนำไปเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิที่ต่ำพอที่ป้องกันการเจริญของเชื้อได้ การถ่ายเชื้อไม่สม่ำเสมอ และบ่อยเกินไปอาจทำให้ลักษณะบางอย่างของเชื้อเปลี่ยนแปลงได้

2.7.3 **เชื้อที่ต้องการเก็บไว้เป็นสต็อก** (Stock cultures)

ควรจะเตรียมให้อยู่ในรูปที่เก็บรักษาไว้ได้นานๆ โดยไม่ต้องทำการถ่ายเชื้อเพื่อที่เชื้อจะได้ไม่กลายพันธุ์และจะได้ใช้เป็นแหล่งของเชื้อต่อไปได้ ถ้าเกิดการสูญหายหรือการตายของเชื้อที่นำไปใช้ในกระบวนการ ปัจจุบันมักจะเก็บสต็อกเชื้อไว้โดยวิธีการไลโอฟิลไลซ์ (Lyophilization) และการเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว แม้ว่าในบางแห่งยังคงใช้พาราฟินเหลวเทปิดทับเชื้อที่เลี้ยงไว้ในอาหารวุ้นธรรมดา เราอาจเก็บเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิห้องไว้ได้นานหลายเดือน เมื่อเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ประกอบอยู่ร้อยละ 1 ดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วอาจใช้เป็นที่เก็บสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่แห้งได้นานพอสมควร

2.7.4 **การรักษาสภาพความบริสุทธิ์ของเชื้อ**

เพื่อให้เกิดความแน่ใจในความบริสุทธิ์ของเชื้อจึงควรนำเชื้อมาจากห้องปฏิบัติการที่มีการถ่ายเชื้ออย่างสม่ำเสมอ หรือทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์อยู่เสมอ การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทำได้หลายวิธี แล้วแต่ชนิดของเชื้อที่ต้องการทดสอบ การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์นั้น จะตรวจได้ต่อเมื่อสิ่งเจือปนนั้นแตกต่างจากเชื้อที่เรามีอยู่ และต้องมีจำนวนมากพอ อีกวิธีหนึ่งก็คือ การเพาะเชื้อในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเหมาะสมต่อการเจริญของสิ่งปนเปื้อน แต่ไม่เหมาะสมกับเชื้อที่ต้องการเก็บรักษา อีกวิธีหนึ่งก็คือการตรวจหาสารบางชนิดที่เชื้อที่เก็บรักษาไม่สามารถผลิตได้

2.7.5 **การเตรียมเชื้อ**

ควรเตรียมเชื้อตั้งต้นขึ้นใหม่เสมอจากแม่เชื้อเดิมหรือสต็อกเชื้อเดิม นำแม่เชื้อเหล่านั้นไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณมาก เพื่อให้เชื้อเพิ่มจำนวนให้มากพอที่จะนำไปใช้ในกระบวนการหมักได้ การเพิ่มจำนวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เชื้อนั้น ประกอบด้วยเชื้อที่ต้องการเท่านั้น มีจำนวนสัดส่วน (ถ้าเป็นเชื้อผสม) และการทำงานเท่ากันตลอด มีความว่องไวในการให้ผลผลิตที่ต้องการ และ สามารถต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้พอสมควรในกรณีที่จำเป็น การเตรียมเชื้อแต่ละครั้งนั้นจะต้องพยายามให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกันหมดไม่ว่าจะในด้านการเตรียมอาหารเลี้ยง การเพาะเชื้อ การบ่มเชื้อเป็นต้น การที่จะเก็บเชื้อในระยะใดของการเจริญนั้นขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ที่ต้องการ เช่นถ้าต้องการให้เชื้อเจริญทันทีและรวดเร็วก็เก็บเกี่ยวเชื้อที่อยู่ในระยะที่เรียกว่า Logarithmic phase of growth แต่ถ้าต้องการให้เชื้อสามารถทนทานต่อความร้อนหรือสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้มากขึ้น ก็ควรเก็บเกี่ยวเชื้อที่อยู่ในระยะต้นของ Maximal stationary phase อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อมักจะใช้อุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิเหมาะสมของเชื้อ เมื่อเชื้ออยู่ในระยะที่ต้องการแล้วจะต้องลดอุณหภูมิลงเพื่อมิให้มีการเจริญเติบโตต่อไปได้อีก

2.8 ชีวเคมีการผลิตกรดมะนาว

Citric acid cycle (Tricarboxylic acid cycle : TCA cycle) ดังแสดงในภาพประกอบ 4 เป็นแนวทางในการผลิตกรดมะนาวโดยอาศัยการหมักด้วยเชื้อรา โดยเฉพาะในกลุ่ม *Aspergillus niger* ทั้งนี้กรดมะนาวที่ได้จะเกิดการสะสมในปริมาณสูง เนื่องจากความผิดพลาดในการทำงานของ TCA cycle เป็นสำคัญ สำหรับเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดมะนาว ได้แก่ Aconitase, Isocitrate dehydrogenase และ Citric synthase โดยในช่วงของการสะสมกรดมะนาว เอนไซม์สองชนิดแรกจะมีกิจกรรมในระดับต่ำ ในขณะที่เอนไซม์ Citric synthase มีกิจกรรมในระดับสูง จึงทำให้เกิดการรวมตัวของ Acetyl CoA กับ Oxaloacetate เกิดเป็นกรดมะนาวขึ้น

สาร Oxaloacetate ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดมะนาว ถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยแนวทางในการสร้างหลายรูปแบบดังนี้

อาศัยปฏิกิริยา Dehydrogenation ของ Malate โดยอาศัยเอนไซม์ Malate dehydrogenase ดังสมการ

$$\text{Malate} + \text{NAD}^{+} \longrightarrow \text{Oxaloacetate} + \text{NADH} + \text{H}^{+}$$

อาศัยปฏิกิริยา Carboxylation ของ Pyruvate โดยอาศัยการรวมตัวของ Pyruvate กับคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งถูกเร่งด้วยเอนไซม์ Pyruvate carboxylase ดังสมการ

$$\text{Pyruvate} + CO_2 + H_2O + \text{ATP} \longrightarrow \text{Oxaloacetate} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

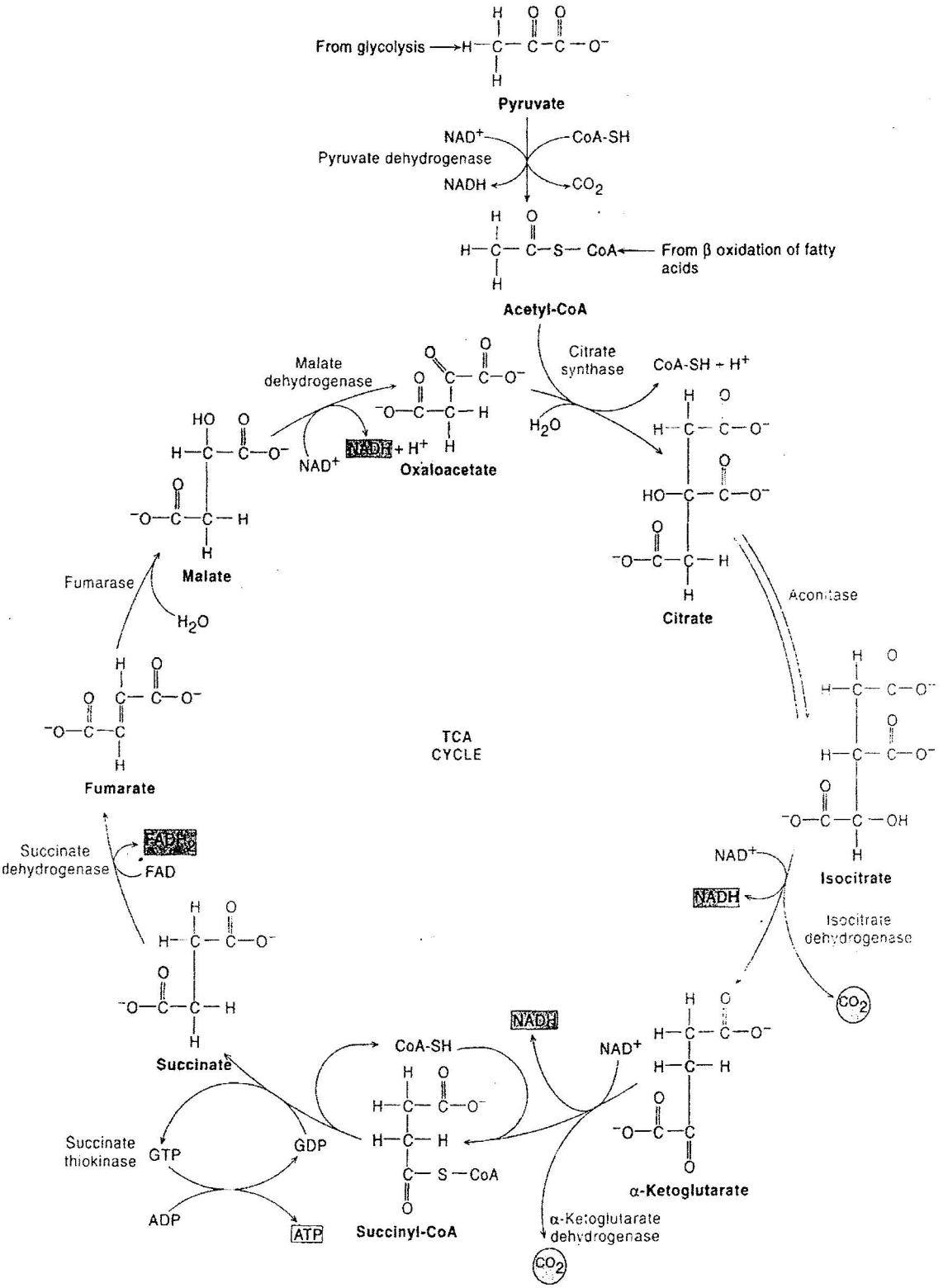
อาศัยปฏิกิริยา Carboxylation ของ Phosphoenolpyruvate โดยอาศัยหลัก Phosphoenolpyruvate carboxylase system (พบในยีสต์) ทั้งนี้จะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวของ Phosphoenolpyruvate กับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยไม่ต้องอาศัยพลังงาน หรือ ATP

อาศัย Glyoxylate cycle โดยที่เกิดการรวมตัวของ Glyoxylate กับ Acetyl CoA ซึ่งถูกเร่งด้วยเอนไซม์ Malate synthetase ดังสมการ ทั้งนี้ Malate ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนต่อไปเป็น Oxaloacetate อีกทอดหนึ่ง

$$\text{Glyoxylate} + \text{Acetyl CoA} \longrightarrow \text{Malate} + \text{Coenzyme A}$$

สำหรับ Glyoxylate ที่ใช้นี้ สามารถสังเคราะห์ได้โดยอาศัยเอนไซม์ Isocitritase ดังนี้

$$\text{Isocitrate} \longrightarrow \text{Succinate} + \text{Glyoxylate}$$



ภาพประกอบ 4 Tricarboxylic acid cycle

2.9 วัตถุดิบ (Raw material)

ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมัก ต้องพิจารณาถึงประโยชน์และราคาที่คุ้มกับการลงทุน การใช้น้ำตาลซึ่งมีราคาสูงจึงไม่เหมาะสมกับการหมักในอุตสาหกรรม ดังนั้นอุตสาหกรรมการผลิตกรดมะนาวจึงนิยมใช้แป้งซึ่งมีราคาต่ำเป็นวัตถุดิบในการหมัก

2.9.1 องค์ประกอบภายในแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรทชนิดหนึ่ง ประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เท่ากับ 6:10:5 และมีสูตรโมเลกุลคือ $(C_6H_{12}O_5)_n$ ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิด คือ อะไมโลส (Amylose) และ อะไมโลเพคติน (Amylopectin) พอลิเมอร์ทั้งสองชนิดนี้เป็นโฮโมพอลิเมอร์ คือ มีกลูโคสเป็นมอนอเมอร์เหมือนกัน และอัตราส่วนของ อะไมโลสและอะไมโลเพคตินจะมีค่าคงที่ในแป้งแต่ละชนิด ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แสดงอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในแป้งชนิดต่างๆ

แหล่งแป้ง	อะไมโลส		อะไมโลเพคติน	
	ปริมาณ (%)	DP เฉลี่ย	ปริมาณ (%)	DP เฉลี่ย
แป้งสาลี	28	1,300	72	4,800
แป้งข้าวโพด	28	930	72	8,200
แป้งข้าวจ้าว	17	1,000	83	4,700
แป้งมันฝรั่ง	21	4,900	79	9,800
แป้งมันสำปะหลัง	17	2,600	83	-

ที่มา : กล้าณรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ (2543). *เทคโนโลยีของแป้ง*. หน้า 16-21

2.9.1.1 อะไมโลส (Amylose) เป็นพอลิเมอร์สายตรง โดยโมโนเมอร์ คือกลูโคสจะเรียงต่อกันเป็นเส้นตรงด้วยพันธะ α-(1,4) ปริมาณอะไมโลส ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง นอกจากนี้ดีกรีของพอลิเมอร์ไรเซชัน (Degree of polymerization, DP) ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้งด้วยเช่นกัน อะไมโลสสามารถทำปฏิกิริยากับไอโอดีนและสารประกอบอินทรีย์หลายชนิดได้ สารประกอบเชิงซ้อนของอะไมโลสและไอโอดีนจะให้สีน้ำเงินซึ่งสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณแป้งได้

2.9.1.2 อะไมโลเพคติน (Amylopectin) เป็นพอลิเมอร์ที่มีกิ่งก้านและแขนง ประกอบด้วยกลูโคสต่อกันเป็นโซ่แขนงที่ทุกๆ 20 –30 หน่วยของพันธะ α-(1, 4) ด้วยพันธะ α-(1, 6)

อะไมโลเพคทินเป็นหนึ่งในพอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดที่พบในธรรมชาติ จะมี DP เฉลี่ยมากกว่า 1 ล้าน น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของอะไมโลเพคตินจะไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้งเลย และมีค่ามากกว่าประมาณ 1,000 เท่าเมื่อเทียบกับของอะไมโลส

ตาราง 2 แสดงสมบัติที่สำคัญของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน

คุณสมบัติ	อะไมโลส	อะไมโลเพคทิน
ลักษณะโครงสร้าง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นเส้นตรง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นกิ่งก้าน
พันธะ	α-1,4	α-1,4 และ แตกกิ่งด้วย α -1,6
ขนาด	200 - 2,000 หน่วยกลูโคส	มากกว่า 10,000 หน่วยกลูโคส
การละลาย	ละลายน้ำได้น้อยกว่า	ละลายน้ำได้ดีกว่า
การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน	สีน้ำเงิน	สีแดงม่วง
การจับตัว	เมื่อให้ความร้อนแล้วทิ้งไว้จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง	ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง

ที่มา : กล้าณรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ (2543). *เทคโนโลยีของแป้ง*. หน้า 14

2.9.2 เอนไซม์ที่ใช้ย่อยแป้ง

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อแป้ง ไกลโคเจน และพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharide) โดยจะไฮโดรไลซ์ (Hydrolyze) พันธะ α-(1, 4) และ α-(1, 6) Glycosidic เอนไซม์อะไมเลสมีหลายชนิด เช่น

2.9.2.1 α-Amylase (1, 4-α-D-Glucan Glucanohydrolase. EC 3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่ตัดหน่วยของกลูโคสจากด้านใน (Endo-splitting enzyme) ซึ่งจะไฮโดรไลซ์พันธะ α -(1, 4) Glycosidic ของซับเสตรทที่เป็นแป้ง แบบสุ่ม (Random)

2.9.2.2 β-Amylase (1, 4-β-D-Glucan Maltohydrolase. EC 3.2.1.2) เป็นเอนไซม์ที่ตัดหน่วยของกลูโคสจากด้านนอก (Exo-splitting enzyme) และมีการย้ายหน่วยของมอลโตส (Moltose) อย่างต่อเนื่องจากด้านปลายนอนรีดิวซิ่ง (Non-reducing end) ของสายพอลิแซคคาไรด์

จนกระทั่งเมื่อเอนไซม์เคลื่อนมาจนถึงพันธะ α-(1,6) Glycosidic ซึ่งเป็นพันธะที่พบในอะไมโลเพคตินและไกลโคเจน ปฏิกิริยาจะหยุดทันที

2.9.2.3 Glucoamylase (1, 4-α-D-Glucan Glucanohydrolase. EC 3.2.1.3) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์แป้งจากด้านนอก (Exo-splitting enzyme) และมีการย้ายหน่วยของกลูโคส (Glucose) อย่างต่อเนื่องจากด้านปลายนอนรีดิวซิ่ง ของสายพอลิแซคคาไรด์ ปฏิกิริยาจะลดลงเมื่อเอนไซม์เคลื่อนมาจนถึงพันธะ α-(1, 6) Glycosidic ซึ่งเป็นพันธะที่พบในอะไมโลเพคตินและไกลโคเจน แต่อย่างไรก็ตามพันธะ α-(1, 6) Glycosidic ก็ยังมีการไฮโดรไลซ์อย่างต่อเนื่อง ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือกลูโคส

2.9.2.4 Pollunase (α-Dextrin 6 – Glucanohydrolase EC 3.2.1.41) เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ทำให้เกิด Debranching โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์พันธะ α-(1,6) Glycosidic ของ Pollulan (เป็นพอลิเมอร์สายตรงของ Maltotriosyl unit ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-(1, 6) Glycosidic) และ Dextrins ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของ α-Amylase และ β-Amylase ในการย่อยสลายอะไมโลเพคตินและไกลโคเจน

2.10 สัญฐานวิทยาของเชื้อรา

เชื้อรามีทั้งชนิดที่เป็นเซลล์เดียว เช่น ยีสต์ และที่เป็นหลายเซลล์เรียงเป็นเส้นใย (Hypha) กลุ่มของเส้นใยเรียกไมซีเลียม (Mycelium) เส้นใยทั่วไปมีความกว้าง 5-10 ไมโครเมตร และมีความยาวมาก เส้นใยประกอบด้วยผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และช่องว่างภายในที่บรรจุโปรโทพลาสม เยื่อหุ้มเป็นเยื่อ 2 ชั้นล้อมรอบโปรโทพลาสม ส่วนผนังเซลล์ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) หรือไคติน ในราชั้นต่ำ ผนังเซลล์ประกอบด้วยเซลลูโลส การเจริญของเส้นใยเกิดทางด้านใกล้ปลาย โดยมีการยืดตัวบริเวณนั้น เส้นใยจะมีการแบ่งตัวเว้าเข้ามาในเซลล์ (Centripetal invagination) และเกิดผนังกั้นโดยเยื่อหุ้มเซลล์คอดเข้ามาเกิดเป็นผนังที่ไม่สมบูรณ์ เพราะมีรูตรงกลางผนังเพื่อให้โปรโทพลาสซึมไหลเวียนถึงกันได้แม้แต่นิวเคลียสก็เคลื่อนที่จากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่งได้

เชื้อรานอกจากจะมีรูปร่างเป็นเส้นใยและเป็นเซลล์เดี่ยวๆแล้ว บางชนิดยังมีรูปร่าง 2 แบบ คือ ถ้าเจริญในดินหรือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง จะมีรูปร่างเป็นเส้นใย แต่ถ้าเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียต หรือในร่างกายโฮสต์ เช่น คน จะมีรูปร่างเป็นเซลล์เดียวแบบยีสต์ เช่น *Histroplasma capsulatum* ได้แก่เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่นกลากเกลื้อน และทำให้เกิดโรคกับธัญพืช เป็นต้น

2.10.1 การเจริญของเชื้อรา

เชื้อราเป็นเส้นใยจะมีการเจริญออกไปได้สองทิศทาง คือ ทางขวางจะเจริญไปเต็มที่แล้วจึงหยุด ส่วนการเจริญทางด้านยาวนั้น เส้นใยของเชื้อราจะงอกยาวออกไปและแตกแขนงอย่างไม่จำกัด ตราบที่สภาพแวดล้อมยังเหมาะสม สายใยเหล่านี้เรียกว่า Mycelium ทำให้เชื้อรามีขนาดใหญ่จน

มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า Mycelium มีสองชนิดคือ Vegetative mycelium เป็นส่วนที่ยึดเกาะกับอาหาร เพื่อทำหน้าที่นำอาหารไปสู่ส่วนต่างๆ อีกชนิดหนึ่งได้แก่ Aerial mycelium เป็นส่วนที่ยื่นไปในอากาศ ทำหน้าที่สร้างสปอร์ จึงเรียก Mycelium แบบนี้ว่า Reproduction mycelium ในบางระยะของการเจริญอาจพบ Mycelium มาเรียงอัดตัวประสานกันเป็นลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อ

2.10.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา

การเติบโตของเชื้อราจะเติบโตบริเวณปลายไฮฟา (Hypha tip) และมักมีการแตกแขนงอันแรก ทำให้เกิดแขนงอันที่สอง และสาม ต่อไป แขนงเหล่านี้เติบโตไปด้านหน้าทางของของโคโลนีและแยกห่างจากอันอื่นๆ การเจริญเติบโตจะหยุดลงเมื่อ Mycelium ใช้อาหารรอบๆ บริเวณนั้นหมดไป และแตกแขนงไปอย่างรวดเร็วในอาหารที่ยังไม่ได้ใช้ การเติบโตลักษณะนี้ทำให้มีโคโลนีลักษณะเป็นวงกลม ในอาหารแข็ง เส้นใยของเชื้อราบนอาหารแข็งบางส่วนหยั่งลึกลงไปในอาหารเพื่อดูดอาหารส่งไปให้ส่วนที่ไม่ได้สัมผัสอาหาร โคโลนีของราแตกต่างกัน บางชนิดเส้นใยจะอัดกันแน่น บางชนิดเส้นใยจะอยู่กันอย่างหลวมๆ มีลักษณะฟู ผิวหน้าโคโลนีบางชนิดแห้ง บางชนิดเปียก หรือเหนียว สีเส้นใยอาจมีสี ดำ เทา น้ำตาล แดง เหลือง ส่วนสปอร์ที่เห็นอาจมีสีเขียว น้ำตาลแกมเขียว ส้ม ชมพู น้ำตาล ดำ เทา เป็นต้น ส่วนการเจริญเติบโตของราบนอาหารเหลวมักเติบโตเป็นแผ่นอยู่บนผิวหน้าของอาหาร แต่ถ้าให้อากาศโดยการเขย่า เส้นใยจะรวมตัวกันเป็นกระจุก ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ เรียกว่า Pellet ซึ่งเป็นรูปแบบการเจริญที่มีผลต่อการเจริญและการเกิดผลิตภัณฑ์ภายใน Pellet เนื่องจากภายใน Pellet จะได้รับสารอาหารน้อยมากโดยเฉพาะบริเวณตรงกลางของ Pellet จนกระทั่งอาจไม่ได้รับสารอาหารเลย นอกจากนั้นแล้วผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นก็ไม่สามารถนำออกจาก Pellet ได้ ซึ่งบางครั้งจะทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์ได้ (Product inhibition)

2.11 การเก็บเกี่ยวผลผลิต

เมื่อกรดมะนาวมีปริมาณมากพอแล้ว จะกรองแยกของเหลวออกจากเชื้อ นำของเหลวที่ได้ไปต้มให้ร้อน ทำการคนตลอดเวลาแล้วเติมปูนขาวลงไปเพื่อตกตะกอนกรดมะนาวออกมาในรูปของเกลือแคลเซียม ล้างตะกอนเกลือโซเดียมซิเทรตในสารละลายในกรดกำมะถัน ที่มีค่าสมมูลย์เท่ากันกับเกลือซิเทรต จากนั้นกรองแยกเอาสารละลายกรดมะนาวออกจากตะกอนเกลือแคลเซียมซัลเฟต ดังสมการ

$$H_3(C_6H_5O_7)_{(aq)} + CaO_{(s)} \longrightarrow CaH(C_6H_5O_7)_{(s)} \downarrow + H_2O$$

$$CaH(C_6H_5O_7)_{(s)} + H_2SO_{4(aq)} \longrightarrow H_3(C_6H_5O_7)_{(aq)} + CaSO_{4\ (s)}$$

สารละลายกรดมะนาวที่กรองได้ นำไปฟอกสีด้วยผงถ่าน กรองได้สารละลายไม่มีสีของกรดมะนาว นำไประเหยในหม้อสูญญากาศจนเข้มข้น ใช้ในรูปของกรดมะนาวเข้มข้น หรืออาจนำไปตกผลึกออกมาในรูปของแข็งสีขาวก็ได้

2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การใช้กระบวนการหมักเพื่อผลิตสารชนิดต่างๆ ในอุตสาหกรรม จำเป็นจะต้องทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด เพื่อให้ผลผลิตที่ได้มีราคาไม่สูงเกินไป และสามารถแข่งขันกับการผลิตโดยวิธีอื่น เช่น กระบวนการ ทางเคมี หรือการสกัดจากพืชหรือสัตว์โดยตรง (สมใจ ศิริโภค. 2537 : 74) ในปัจจุบันมีการผลิตกรดมะนาว เพื่อรองรับกับความต้องการในการใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ กรดมะนาวมีสถานะเป็นต้นทุนของอุตสาหกรรมอื่นๆ หากราคาของกรดมะนาวถูกลงย่อมเป็นผลดีในหลายๆด้าน ราคาของกรดมะนาวจะลดลงได้ปัจจัยอย่างหนึ่งคือ ต้นทุนการผลิตกรดมะนาวลดลง ดังนั้น การลดต้นทุนในการผลิตจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ ทำให้มีการศึกษาวิจัยเพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวในหลายๆ ด้าน เช่น การศึกษาหาสารคาร์บอนที่ดีที่สุดและมีเชื้อราคาถูกสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตในลักษณะต่างๆ เป็นต้น ซึ่งพบว่า การพัฒนาการผลิตกรดมะนาวนั้นจะมีการวิจัยใน 3 แนวทางคือ การปรับปรุงสายพันธุ์ การเลือกใช้แหล่งต้นตอคาร์บอนให้มีราคาถูก และ การเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิต

การปรับปรุงสายพันธุ์นั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวนิยมทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการกลายพันธุ์โดยใช้ รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) K. Kirimura และคณะ (1992) พบว่าเมื่อทำการกลายพันธุ์ *Aspergillus niger* แล้ว สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการต้านทาน 2-deoxyglucose ได้นั้น จะมีการผลิตเอนไซม์ β–glucosidase ได้มาก และผลิตกรดมะนาวได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากนี้ ยุวดี (2543) ได้นำเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 มาทำการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี UV แล้วคัดเลือกพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์ที่มีการผลิต Protease น้อย พบว่า สายพันธุ์ที่สร้างขึ้นใหม่นี้ (*Aspergillus niger* SWU-52) สามารถผลิตกรดมะนาวจากสารจำพวกแป้งได้ดีกว่าสายพันธุ์เดิมถึง 1.5 เท่า นอกจากการฉายรังสี UV แล้ว การหลอมรวมโปรโตพลาสต์ ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะทำให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะเด่นของสองสายพันธุ์ที่นำมาหลอมรวม ดังเช่น สมศักดิ์ (2541) ได้ทำการหลอมรวมโปรโตพลาสระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* WU-2223L ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้สูงในสภาวะการเจริญแบบเขย่า กับเชื้อรา *Aspergillus usami* IAM 2185 ซึ่งมีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ที่ใช้ในการย่อยแป้ง ทำให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวสูงขึ้น ในการหมักที่มีการใช้แป้งเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน สำหรับการทดสอบการใช้สายพันธุ์ผสมที่สร้างขึ้น ชะไมพร (2541) ได้ทำการทดลองใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* 6 สายพันธุ์

โดยการเลี้ยงแบบผิวหน้า (Serface culture) คือใช้ SS medium agar และแบบเขย่า พบว่าสำหรับการหมักแบบ SS medium agar สายพันธุ์ผสม *Aspergillus niger* YT 11-2-3 ผลิตกรดมะนาวได้ 87.2 g/L ในขณะที่ *Aspergillus niger* Yang no.2 ผลิตกรดมะนาวได้ 13.5 g/L เมื่อมี Glucose 140 g/L เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ส่วนการหมักแบบเขย่าที่ใช้แหล่งต้นตอคาร์บอนเช่นเดียวกัน *Aspergillus niger* WU-2223L ผลิตกรดมะนาวได้ 14.0 g/L ส่วน *Aspergillus niger* Yang no.2 ผลิตกรดมะนาวได้ 9.7 g/L

ส่วนการลดต้นทุนการผลิตโดยการเลือกใช้วัตถุดิบ หรือ แหล่งต้นตอของคาร์บอนให้มีราคาถูกนั้นเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตระดับอุตสาหกรรม จึงมีความพยายามที่จะใช้แหล่งต้นตอของคาร์บอนให้มีราคาต่ำลง เช่น การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบเป็น Cellulose (มีหน่วยย่อยเป็น Glucose) และ Hemicellulose (มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาล Pentose) และลิกนิน ดังที่ S. Sarangbin และคณะ (1994) ได้ใช้ Cellulose ที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์ Cellulase เป็นสารต้นตอคาร์บอน ในการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการต้านทาน 2-deoxyglucose คือ *Aspergillus niger* C192 พบว่าสามารถผลิตกรดมะนาวได้ผลดี มี %Yield 68.2% นอกจากนี้ K. Kirimura และคณะ (1999) ยังพบว่า *Aspergillus niger* สามารถใช้น้ำตาล pentose ซึ่งได้แก่ Xylose และ Arabinose เป็นสารต้นตอคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวแบบ Semi-solid culture ได้ดีกว่าการหมักแบบ Submerge culture แม้ว่า *Aspergillus niger* มีความสามารถในการผลิต Xylanase แต่ *Aspergillus niger* ใช้ Glucose ในการผลิตกรดมะนาวได้ดีกว่า Xylose และ Arabinose รักฤดี (2540) ได้ใช้ชานอ้อยที่ผ่านการปรับแต่งโดยการแช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน พบว่า เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 สามารถใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนได้ แต่ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ยังอยู่ในระดับต่ำ

นอกจากนั้นกระบวนการผลิตที่ใช้กันมากในการผลิตกรดมะนาว คือ แบบเขย่า และแบบกึ่งแข็ง ในแบบเขย่า S. Rugsaseel และคณะ (1995) พบว่าในการหมักกรดมะนาวแบบเขย่า หากมีการเติมสารเพิ่มความเหนียวลงในถังหมักจะช่วยให้ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้มีมากขึ้น เมื่อศึกษาต่อจึงพบว่า เป็นเพราะ เมื่อไมซีเลียมของ *Aspergillus niger* ได้รับแรงกระแทกอย่างต่อเนื่อง จะมีการสะสมของโพลีแซคคาราไรด์ ที่ผิวของไมซีเลียมเพื่อลดแรงกระแทกที่มี สุจิมา (2540) ได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวจากกากมันสำปะหลัง ด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* Yang no.2 โดยการหมักแบบกึ่งแข็ง พบว่าอัตราส่วนของวัสดุหมักที่เหมาะสมคือ กากมันสำปะหลัง:แกลบ:รำข้าว คือ 10:3:1 และมี pH เริ่มต้น 4.25 โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30^{0}C ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเชื้อจะผลิตกรดมะนาวสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 4 วัน

บทที่ 3
วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

3.1 วัสดุอุปกรณ์

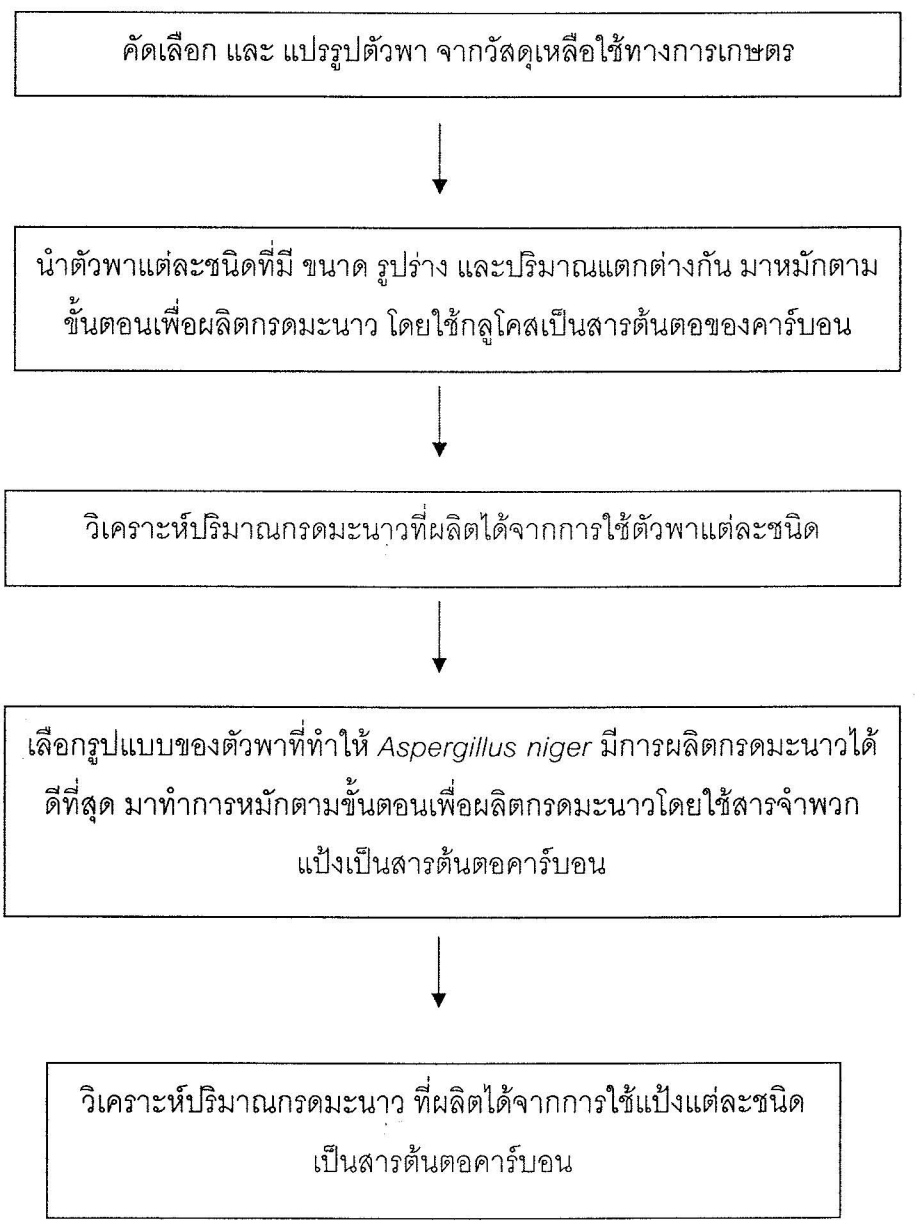
1. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
2. ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipet) พร้อมทิป (Tips) ขนาดต่างๆ
3. ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
4. หลอดทดลองฝาเกลียว และแบบไม่มีฝา
5. เครื่อง Hotplate and Magnetic stirrer
6. Magnetic bar
7. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
8. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
9. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave)
10. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.2 สารเคมี

1. กรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
3. โพแตสเซียมโซเดียมทาร์เตรท (Potassium sodium tartrate)
4. ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolpthalein)
5. กลูโคส (Glucose)
6. เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol)
7. แอมโมเนียมไนเตรท (Ammonium nitrate)
8. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate)
9. โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate)
10. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต (Magnesium sulfate heptahydrate)
11. แมงกานีสซัลเฟต (Manganese sulfate)
12. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (Ferric chloride hexahydrate)
13. โปแตสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (Potassium hydrogen phathalate)

14. ผงวุ้น (Bacto agar)
15. พาราไนโตรฟีนิลเบต้าดีกลูโคไพเรนโนไซด์ (p-Nitrophenyl-β-D–glucopyranoside)
16. Soluble starch
17. แป้งมันสำปะหลัง
18. แป้งข้าวโพด
19. แป้งข้าวจ้าว

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน



3.4 การเตรียมและเก็บรักษาหัวเชื้อ

แยกเอาสปอร์ของ *Aspergillus niger* Yang no.2 มาละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเผาไฟให้ร้อนแดงทิ้งไว้สักครู่ จุ่มลงในสารละลายสปอร์ แล้วเขี่ยเบาๆ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ (Czapek dox) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ปิดผนึกจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม เก็บรักษาหัวเชื้อที่ได้ในตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ 4^{0}C

3.5 การผลิตกรดมะนาวด้วยสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็งเมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นตัวพา

3.5.1 การเตรียมวัสดุเพื่อใช้เป็นตัวพา

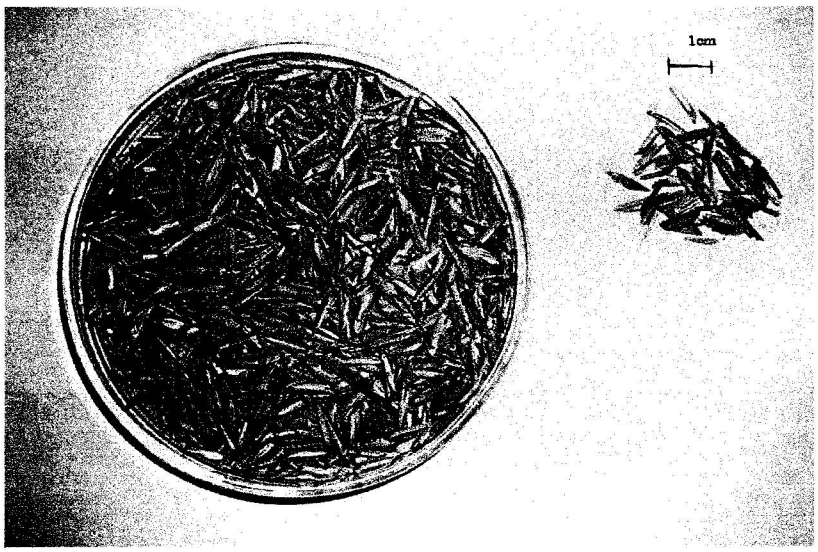
นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่เลือกไว้ 6 ชนิด ได้แก่ แกลบ ฟางข้าว ซังข้าวโพด กากมะพร้าว ผักตบชวา และชานอ้อย มา ตัด หั่น หรือปั่นตามความเป็นไปได้ของวัสดุชนิดนั้นๆ เพื่อให้มีรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน จากนั้นล้างทำความสะอาด อบให้แห้ง แล้วเก็บรักษาไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท ในการแปรรูปวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรตามความเหมาะสมของวัสดุแต่ละชนิด โดยพิจารณาตามความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม จะได้เป็นตัวพาที่ได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 13 รูปแบบ ดังต่อไปนี้ คือ

- แกลบ
- ผักตบชวา (รูปวงแหวน)
- ผักตบชวา (รูปลิ่ม)
- ผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่)
- ผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก)
- กากมะพร้าว (ชิ้น)
- กากมะพร้าว (ผง)
- ซังข้าวโพด (แผ่น)
- ซังข้าวโพด (ชิ้น)
- ชานอ้อย (หยาบ)
- ชานอ้อย (ละเอียด)
- ฟางข้าว (ท่อนยาว)
- ฟางข้าว (ท่อนสั้น)

3.5.1.1 ลักษณะของตัวพาแกลบ

3.5.1.1.1 การแปรรูป ใช้รูปทรงเดิมที่ได้จากโรงสี นำไปแช่น้ำ คัดเฉพาะส่วนที่จมน้ำ ล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100 ^{0}C จนน้ำหนักคงที่

3.5.1.1.2 ลักษณะที่ได้ เป็นรูปทรงเดิมของแกลบ ความยาว 0.9 –1.1 เซนติเมตร ดังแสดงในภาพประกอบ 5



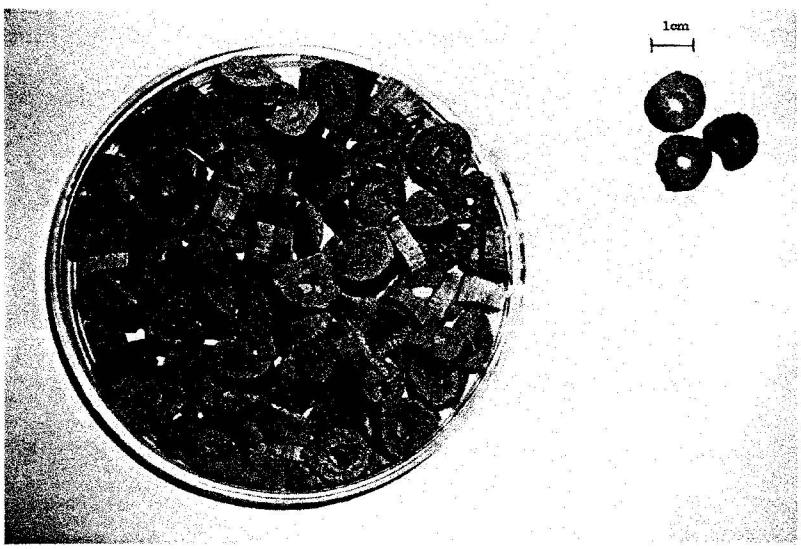
ภาพประกอบ 5 ลักษณะของแกลบ

3.5.2.1 ลักษณะของตัวพาผักตบชวา (รูปวงแหวน)

3.5.2.1.1 การแปรรูป นำลำต้นของผักตบชวาที่โตเต็มที่มาตัดตามแนวขวาง ล้างให้สะอาดแล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100^{0}C จนน้ำหนักคงที่

3.5.2.1.2 ลักษณะที่ได้ มีลักษณะเหมือนวงแหวน ด้านนอกสุดที่เป็นเปลือก เมื่อแห้งจะมีความแข็งมีความคงตัว เนื้อในมีลักษณะพรุนคล้ายฟองน้ำ หนา 0.4–0.6 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 – 1.4 เซนติเมตร ดังภาพประกอบ 6

ท 25039

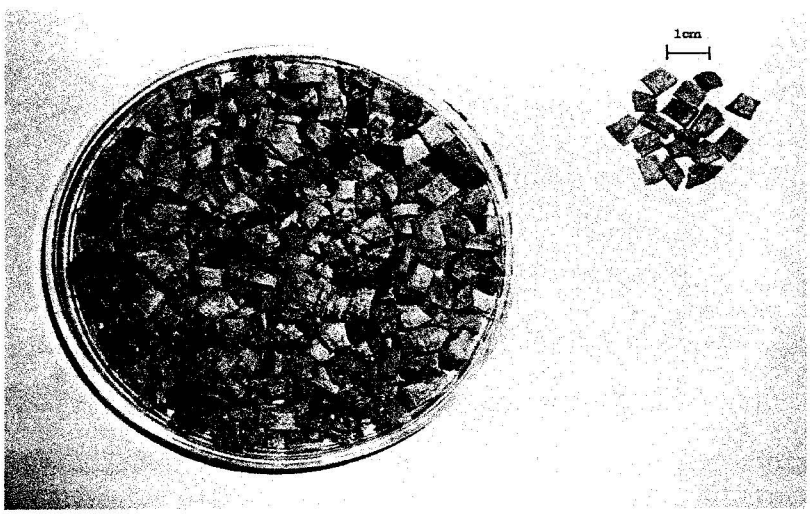


ภาพประกอบ 6 ลักษณะของผักตบชวา (รูปวงแหวน)

3.5.3.1 ลักษณะของตัวพาผักตบชวา (รูปลิ่ม)

3.5.3.1.1 การแปรรูป นำลำต้นของผักตบชวาที่โตเต็มที่มาผ่าตามแนวยาวเป็นสี่แฉก จากนั้นนำมาตัดแนวขวาง ล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100^{0}C จนน้ำหนักคงที่

3.5.3.1.2 ลักษณะที่ได้ มีลักษณะเหมือนลิ่ม แต่ละชิ้นจะมีขอบด้านหนึ่งเป็นส่วนของเปลือกซึ่งมีความคงตัว เมื่อนำมาอบเนื้อในที่มีลักษณะพรุนคล้ายฟองน้ำจะหดมาติดกับส่วนที่เป็นเปลือก ยาว 0.4 – 0.6 เซนติเมตร และกว้าง 0.3 – 0.5 เซนติเมตร ดังภาพประกอบ 7

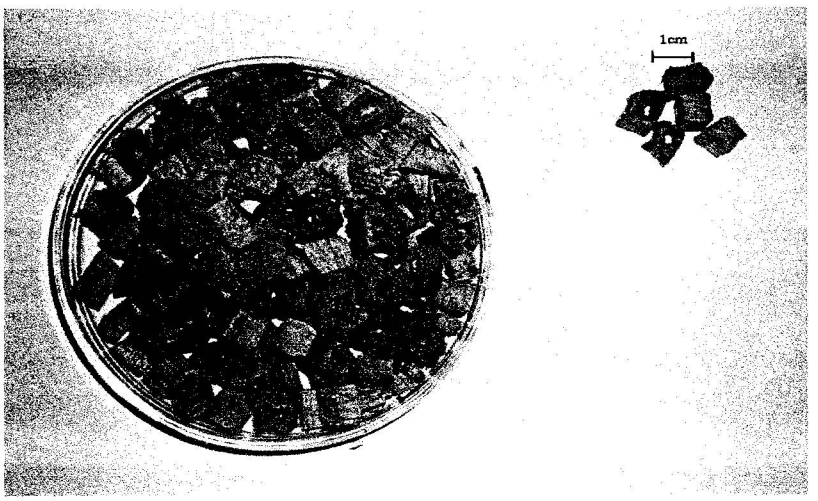


ภาพประกอบ 7 ลักษณะของผักตบชวา (รูปลิ่ม)

3.5.4.1 ลักษณะของตัวพาผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่)

3.5.4.1.1 การแปรรูป นำลำต้นของผักตบชวาที่โตเต็มที่ มาปลอกเอาเปลือกออก โดยให้เนื้อข้างในที่เหลือ เป็นแท่งสี่เหลี่ยม จากนั้นนำมาตัดแนวขวาง ล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100^{0}C จนน้ำหนักคงที่

3.5.4.1.2 ลักษณะที่ได้ มีลักษณะเป็นทรงสี่เหลี่ยม โดยตรงกลางมีรูกลม เนื่องจากมีแต่ส่วนของเนื้อในที่คล้ายฟองน้ำ ไม่มีเปลือกซึ่งมีความหนาแน่นสูงและคงตัว อยู่ด้วย ทำให้เมื่อนำไปอบแล้ว มีความหนาแน่นน้อย ขนาดยาว 0.8 – 1.0 เซนติเมตร และกว้าง 0.8 – 1.0 เซนติเมตร ดังภาพประกอบ 8

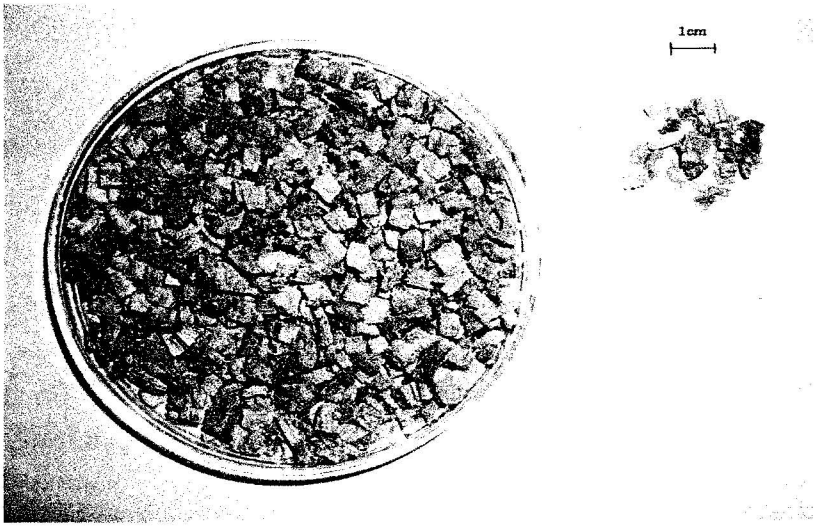


ภาพประกอบ 8 ลักษณะของผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่)

3.5.5.1 ลักษณะของตัวพาผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก)

3.5.5.1.1 การแปรรูป นำลำต้นของผักตบชวาที่โตเต็มที่ มาปลอกเอาเปลือกออก โดยให้เนื้อข้างในที่เหลือ เป็นแท่งสี่เหลี่ยม ผ่าแท่งสี่เหลี่ยมที่เป็นสี่แฉกตามแนวยาว จากนั้นนำมาตัดแนวขวาง ล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100^{0}C จนน้ำหนักคงที่

3.5.5.1.2 ลักษณะที่ได้ มีลักษณะเป็นทรงสี่เหลี่ยม เนื่องจากมีแต่ส่วนของเนื้อในที่คล้ายฟองน้ำ ไม่มีเปลือกซึ่งมีความหนาแน่นสูงและคงตัวอยู่ด้วย ทำให้เมื่อนำไปอบแล้ว มีความหนาแน่นน้อย ขนาดยาว 0.4 – 0.6 เซนติเมตร และกว้าง 0.3 – 0.5 เซนติเมตร ดังภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 ลักษณะของผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก)

3.5.6.1 ลักษณะของตัวพากาบมะพร้าว (ชิ้น)

3.5.6.1.1 การแปรรูป นำกาบมะพร้าวมาตัดตามขวาง จากนั้นหักให้เป็นชิ้นเล็กๆ ล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100^{0}C จนน้ำหนักคงที่

3.5.6.1.2 ลักษณะที่ได้ มีลักษณะรูปทรงคล้ายแท่งสี่เหลี่ยม มีขนาดยาว 1.0 – 1.5 เซนติเมตร และกว้าง 0.8 – 1.5 เซนติเมตร ดังภาพประกอบ 10

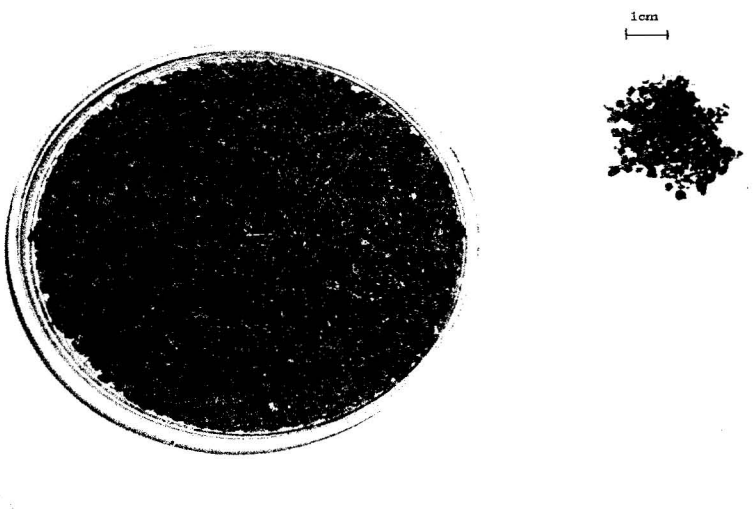


ภาพประกอบ 10 ลักษณะของกาบมะพร้าว (ชิ้น)

3.5.7.1 ลักษณะของตัวพากาบมะพร้าว (ผง)

3.5.7.1.1 การแปรรูป เป็นกาบมะพร้าว ที่ได้รับการปั่นตีจนเป็นชิ้นเล็กๆ ซึ่งก็คือ กาบมะพร้าวที่ใช้ในการปลูกต้นไม้ซึ่งหาซื้อได้ทั่วไป นำมาล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100^{0}C จนน้ำหนักคงที่

3.5.7.1.2 ลักษณะที่ได้ ส่วนประกอบหลักจะเป็น ขุยมะพร้าวที่มีลักษณะเป็นก้อนเล็กๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 – 0.4 เซนติเมตร และจะมีส่วนที่เป็นก้อนี่มีขนาดใหญ่กว่า และเส้นใยปนอยู่จำนวนหนึ่ง ดังภาพประกอบ 11

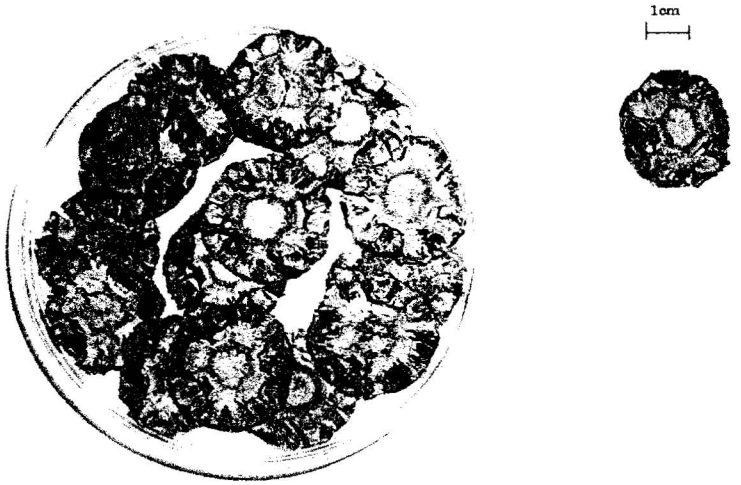


ภาพประกอบ 11 ลักษณะของกาบมะพร้าว (ผง)

3.5.8.1 ลักษณะของตัวพาซังข้าวโพด (แผ่น)

3.5.8.1.1 การแปรรูป นำซังข้าวโพดหวาน มาตัดตามขวางแนวฝักให้เป็นแผ่น แล้วนำมาล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100^{0}C จนน้ำหนักคงที่

3.5.8.1.2 ลักษณะที่ได้ มีลักษณะเป็นแผ่นกลม หนา 0.8 – 1.2 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 – 3.0 เซนติเมตร ดังภาพประกอบ 12

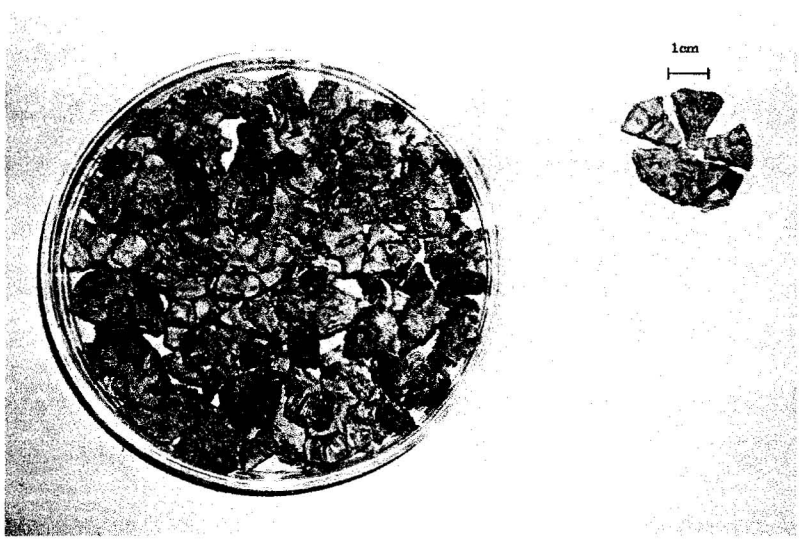


ภาพประกอบ 12 ลักษณะของซังข้าวโพด (แผ่น)

3.5.9.1 ลักษณะของตัวพาซังข้าวโพด (ชิ้น)

3.5.9.1.1 การแปรรูป นำซังข้าวโพดหวาน มาตัดตามขวางแนวฝักให้เป็นแผ่น แช่น้ำ แล้วนำมาล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100^{0}C จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปหักให้เป็นชิ้นเล็กๆ

3.5.9.1.2 ลักษณะที่ได้ เป็นรูปสามเหลี่ยมฐานโค้ง มีลักษณะคล้ายสามเหลี่ยมหนา 0.8 – 1.2 และ ยาว 1.0 – 1.5 เซนติเมตร ดังภาพประกอบ 13

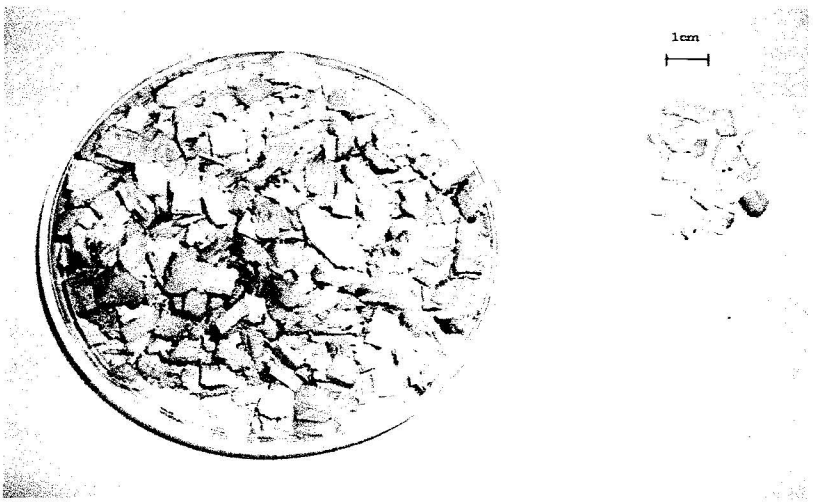


ภาพประกอบ 13 แสดงลักษณะซังข้าวโพด (ชิ้น)

3.5.10.1 ลักษณะของตัวพาซานอ้อย (หยาบ)

3.5.10.1.1 การแปรรูป นำซานอ้อยที่ผ่านการคั้น โดยเครื่องบีบลูกกลิ้ง ที่ติดกับมอเตอร์ไฟฟ้า นำมาตัดตามขวาง จากนั้นนำไปหักให้เป็นชิ้นเล็กๆ แช่น้ำ แล้วนำมาล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100^{0}C จนน้ำหนักคงที่

3.5.10.1.2 ลักษณะที่ได้ เป็นซานอ้อยชิ้นเล็กๆ ที่มีรูปแบบแตกต่างกัน 3 รูปแบบ ได้แก่ แบบที่เป็นแผ่นหรือแท่งหนา มีประมาณ 60% ของปริมาตรทั้งหมด แบบที่เป็นก้อน มีประมาณ 30% ของปริมาตรทั้งหมด และแบบที่เป็นเส้นกากเล็กๆ อีกประมาณ 10% ซึ่งทั้งหมดมีความหนาไม่เกิน 0.8 เซนติเมตร ดังภาพประกอบ 14

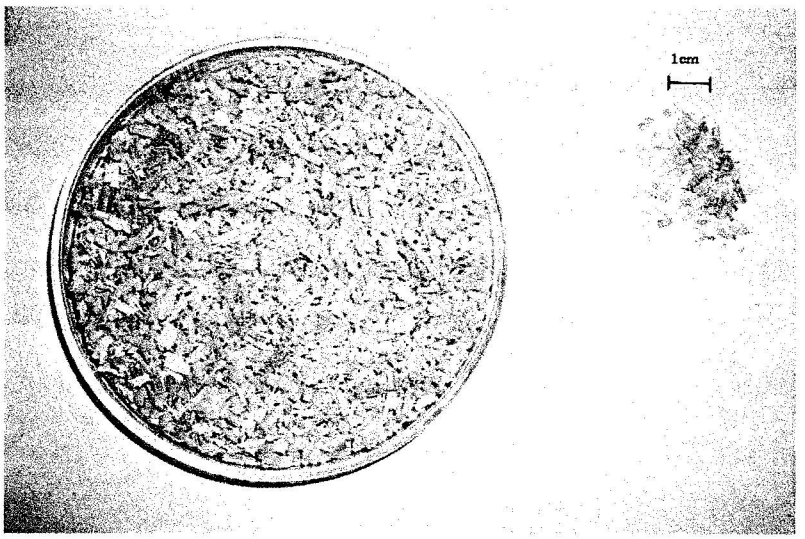


ภาพประกอบ 14 ลักษณะของซานอ้อย (หยาบ)

3.5.11.1 ลักษณะของตัวพาซานอ้อย (ละเอียด)

3.5.11.1.1 การแปรรูป นำซานอ้อยที่ผ่านการคั้นโดยเครื่อง โดยเครื่องบีบลูกกลิ้ง ที่ติดกับมอเตอร์ไฟฟ้า นำมาตัดตามขวาง จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นอาหารแห้ง นาน 30 วินาที แช่น้ำ แล้วนำมาล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100^{0}C จนน้ำหนักคงที่

3.5.11.1.2 ลักษณะที่ได้ เป็นซานอ้อยชิ้นเล็กๆ ที่มีรูปแบบแตกต่างกัน 2 รูปแบบ ได้แก่ แบบที่เป็นแท่งเล็กๆหรือเป็นเส้น มีประมาณ 70% ของปริมาตรทั้งหมด แบบที่เป็นก้อนเล็กๆหรือเป็นผง มีประมาณ 30% ของปริมาตรทั้งหมด ซึ่งทั้งหมด มีความยาวไม่เกิน 0.8 เซนติเมตร ดังภาพประกอบ 15

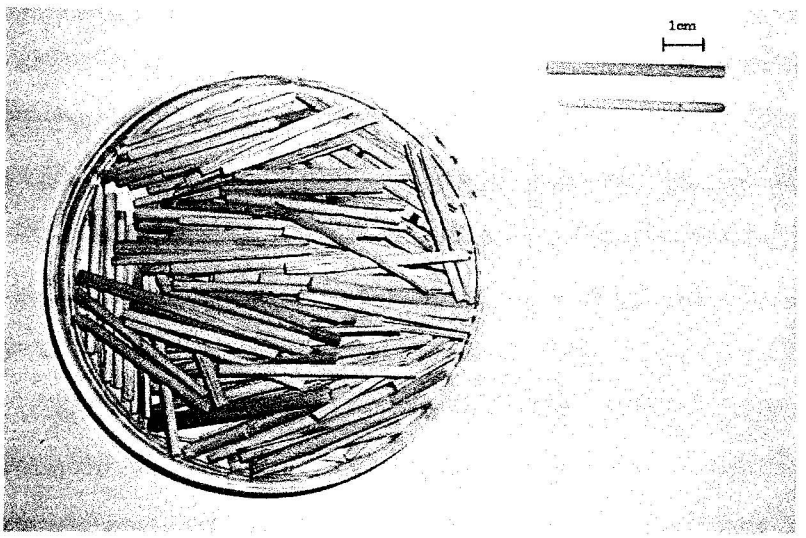


ภาพประกอบ 15 ลักษณะของซานอ้อย (ละเอียด)

3.5.12.1 ลักษณะของตัวพาฟางข้าว (ท่อนยาว)

3.5.12.1.1 การแปรรูป นำฟางข้าวมาเลือกเฉพาะส่วนที่เป็นลำต้นของฟางข้าว นำมาตัดเป็นท่อนๆ แล้วนำมาล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100^{0}C จนน้ำหนักคงที่

3.5.12.1.2 ลักษณะที่ได้ ฟางข้าวที่มีลักษณะเป็นท่อน มีความยาว 3.5 - 4.5 เซนติเมตร ดังภาพประกอบ 16

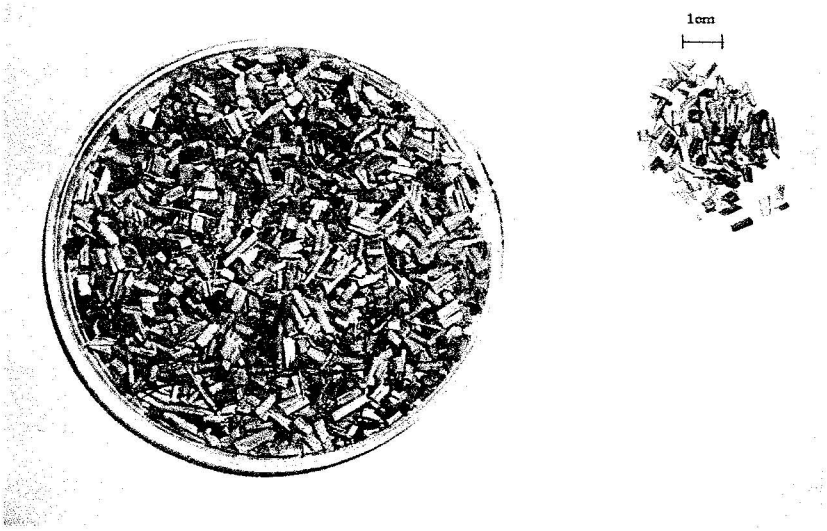


ภาพประกอบ 16 ลักษณะของฟางข้าว (ท่อนยาว)

3.5.13.1 ลักษณะของตัวพาฟางข้าว (ท่อนสั้น)

3.5.13.1.1 การแปรรูป นำฟางข้าวมาเลือกเฉพาะส่วนที่เป็นลำต้นของฟางข้าว นำมาตัดเป็นท่อนสั้นๆ แช่น้ำ แล้วนำมาล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 100^{0}C จนน้ำหนักคงที่

3.5.13.1.2 ลักษณะที่ได้ ฟางข้าวที่มีลักษณะเป็นชิ้นเล็กๆ มีความยาว 0.3 - 0.8 เซนติเมตร ดังภาพประกอบ 17



ภาพประกอบ 17 แสดงลักษณะตัวพาฟางข้าว (ท่อนสั้น)

3.5.2 การหาปริมาณตัวพาที่เหมาะสม

การหาปริมาณของตัวพาที่จะทำการทดลอง ทำโดยการใส่ตัวพาชนิดและรูปแบบนั้นๆ ลงในจานเลี้ยงเชื้อ (Plate) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่ใช้ในการทดลอง จนเต็ม แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้นั้นจะเป็นน้ำหนักสูงสุด ของตัวพาชนิดนั้นในการหมัก จากนั้นจึงกระจายน้ำหนักลดลงมา ให้เป็นช่วงน้ำหนักที่เท่ากัน 4 หรือ 5 ช่วงตามความเหมาะสม

3.5.3 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อให้มีการผลิตกรดมะนาว

ชั่งตัวพาตามน้ำหนักที่ได้จากข้อ 3.5.2 ลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรควบคุม (Synthetic medium, SS) ที่มี Glucose 140 g/L เป็นสารต้นตอคาร์บอน ปรับ pH ให้ได้ 4.25 แล้วดูดใส่ในแต่ละจานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้สารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อซึมเข้าไปในเนื้อวัสดุการเกษตรเหล่านั้นแล้วฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งภายใต้ความดัน (Autoclave)

ขั้นตอนนี้ทำในตู้ปลอดเชื้อโดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ เขี่ยสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตรที่เหมาะสม เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นใช้ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน โดยทำการวัดปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ทุก 2 วัน

3.6 การเตรียม Culture filtrate สำหรับการเจริญแบบกึ่งแข็ง

นำจานเลี้ยงเชื้อหลังการบ่มมาทำการสกัดกรดมะนาว โดยเขี่ยลงในบีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำให้แตกหักเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย เติมน้ำกลั่นอุณหภูมิ 60°C ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำการปั่นอย่างแรงด้วยเครื่อง Magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองพับจีบ จะได้ Culture filtrate ที่สามารถนำไปหาปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลรีดิวซ์ได้

3.7 การผลิตกรดมะนาวด้วยสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง โดยมีสารจำพวกแป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอน

เลือกตัวพาที่ชนิด รูปแบบ และปริมาณมีความเหมาะสมที่สุด คือ สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด จากการทดลองในข้อ 3.5 นำมาทำการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับข้อ 3.5.3 แต่เปลี่ยนสารต้นตอคาร์บอนเป็นสารจำพวกแป้ง ปริมาณ 140 g/L ดังต่อไปนี้

- Soluble starch
- แป้งข้าวจ้าว
- แป้งข้าวโพด
- แป้งมันสำปะหลัง

โดยจะบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยทำการวัดปริมาณกรดมะนาว แอคติวิตี้ของเอนไซม์ Glucoamylase และ β-Glucosidase และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทุกวัน

3.8 การวัดกรดมะนาวใน Culture filtrate

นำ Culture filtrate ที่ได้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด เป็น อินดิเคเตอร์ ไตเตรทกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (0.1 N) จนถึงจุดยุติ สังเกตได้จาก Culture filtrate จะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนๆ บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ และคำนวณหาปริมาณกรดมะนาวจากสูตร

$$\%Yield = \frac{F \times (V - B) \times 21.6 \times 210 \times 100}{(16 \times 15 \times \%C - source)}$$

Citric acid (g/L) = g/L (C- source) x %Yield /100

F = ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์

V = ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท

B = Blank

g/L (C- source) = ปริมาณของแหล่งต้นตอของคาร์บอนที่ใช้ หน่วยเป็น g/L

% C – source = เปอร์เซนต์ของแหล่งต้นตอคาร์บอนที่ใช้

3.9 การวัดน้ำตาลรีดิวซ์

เตรียม Culture filtrate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง แล้วเติม 3,5- Dinitrosalicylic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือโดยเทียบกับกราฟกลูโคสมาตรฐาน

3.10 การวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์

3.10.1 Glucoamylase

แอคติวิตี้ของเอนไซม์ Glucoamylase วัดโดยดัดแปลงวิธีการจาก Abe *et. al.* (1988) โดยในสารละลาย Reaction mixture (1 มิลลิลิตร) ประกอบด้วย 0.8 มิลลิลิตรของ 2% Soluble starch ในสารละลาย 50 mM Acetate buffer (pH 5.5) และ 0.2 มิลลิลิตร ของ Culture filtrate ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 15 นาที วัดปริมาณกลูโคสด้วย วิธีตามหัวข้อ 3.9 โดยกำหนดให้ 1 Unit (U) ของ Glucoamylase มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ 1 μmole ของ กลูโคส ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

3.10.2 β-Glucosidase

การวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ β-Glucosidase จะใช้ *p*-Nitrophenyl-β-D–glucopyranoside เป็นสับสเตรท โดยให้ 1 Unit (U) ของเอนไซม์ มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ 1 μmole ของกลูโคส ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 อิทธิพลของการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

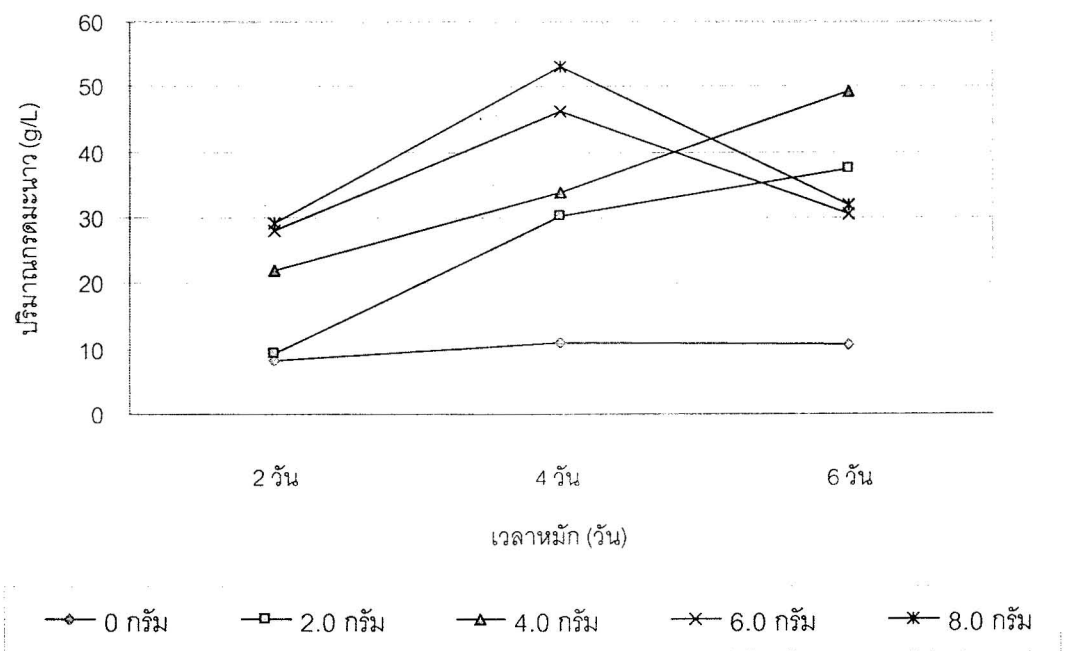
การทดลองจะใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 6 ชนิด ได้แก่ แกลบ ผักตบชวา กากมะพร้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย และฟางข้าว นำไปแปรรูปตามความเหมาะสมของวัสดุแต่ละชนิด โดยพิจารณาตามความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม ได้เป็นตัวพาที่ได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 13 รูปแบบ คือ

- แกลบ
- ผักตบชวา (รูปวงแหวน)
- ผักตบชวา (รูปลิ่ม)
- ผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่)
- ผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก)
- กากมะพร้าว (ชิ้น)
- กากมะพร้าว (ผง)
- ซังข้าวโพด (แผ่น)
- ซังข้าวโพด (ชิ้น)
- ชานอ้อย (หยาบ)
- ชานอ้อย (ละเอียด)
- ฟางข้าว (ท่อนยาว)
- ฟางข้าว (ท่อนสั้น)

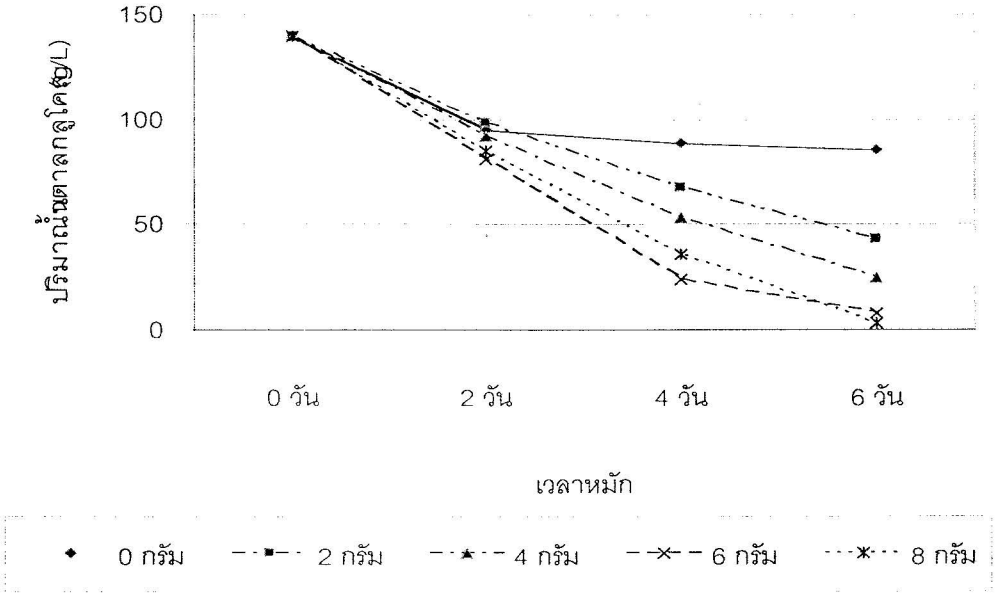
นำวัสดุแต่ละรูปแบบดังกล่าวไปใช้เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาวโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง โดยทำการแปรเปลี่ยนปริมาณของวัสดุแต่ละรูปแบบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ทำการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SS medium ที่มี น้ำตาลกลูโคส 140 g/L เป็นสารต้นตอคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทุก 2 วัน โดยจะแสดงลักษณะและผลการทดลองของตัวพาแต่ละชนิดดังต่อไปนี้

4.1.1 ผลการทดลองการใช้แกลบเป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำแกลบไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 8 กรัม ดังนั้นปริมาณของแกลบที่ใช้ในการหมัก คือ 2.0 กรัม 4.0 กรัม 6.0 กรัม และ 8.0 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 53.21 g/L (%Yield = 39.01) จากการใช้แกลบ 8 กรัม ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 18 และ ภาพประกอบ 19



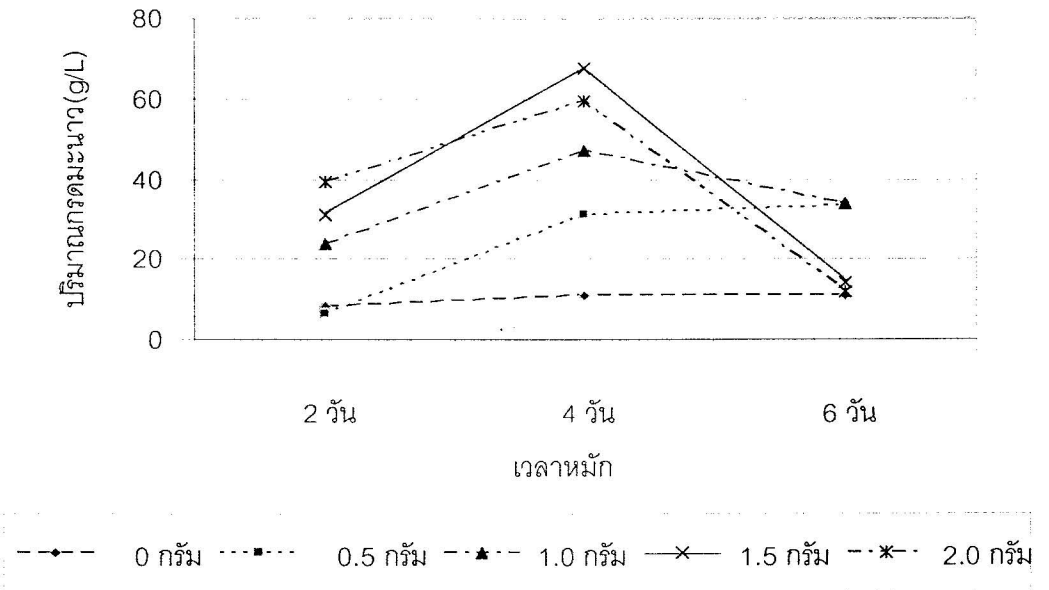
ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีแกลบเป็นตัวพา



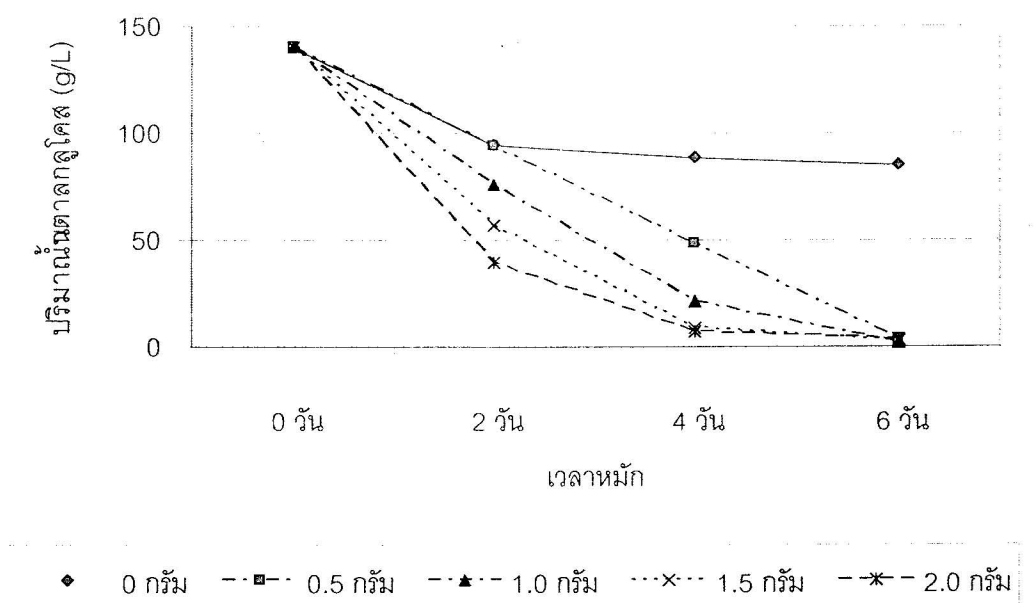
ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มีแกลบเป็นตัวพา

4.1.2 ผลการทดลองการใช้ผักตบชวา (รูปวงแหวน) เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำผักตบชวา (รูปวงแหวน) ไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 2 กรัม ดังนั้น ปริมาณของผักตบชวา (รูปวงแหวน) ที่ใช้ในการหมัก คือ 0.5 กรัม 1.0 กรัม 1.5 กรัม และ 2.0 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาว และ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 67.47 g/L (%Yield = 48.19) จากการใช้ผักตบชวา 1.5 กรัม ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 20 และ ภาพประกอบ 21



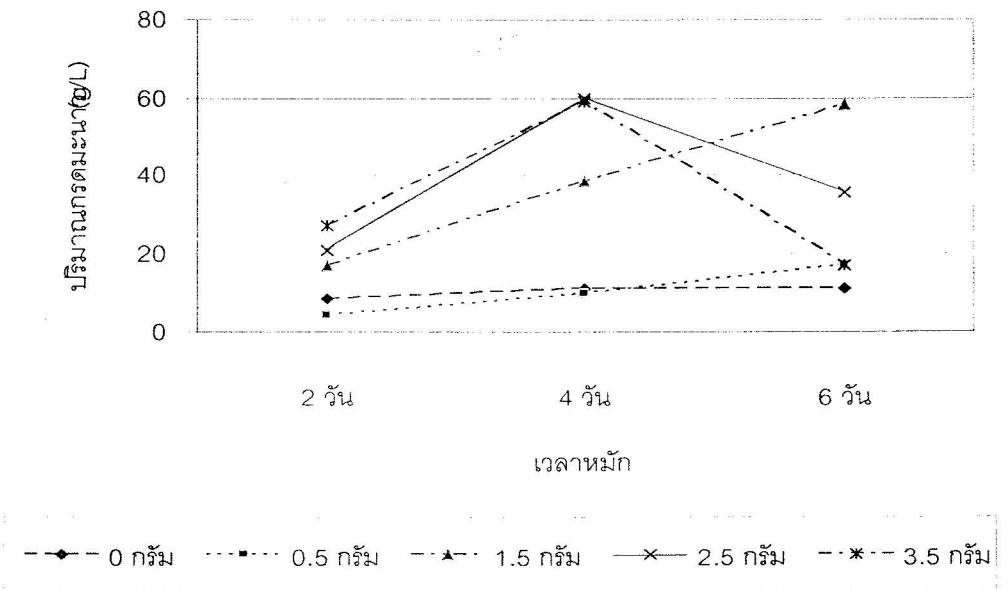
ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีผักตบชวา (รูปวงแหวน) เป็นตัวพา



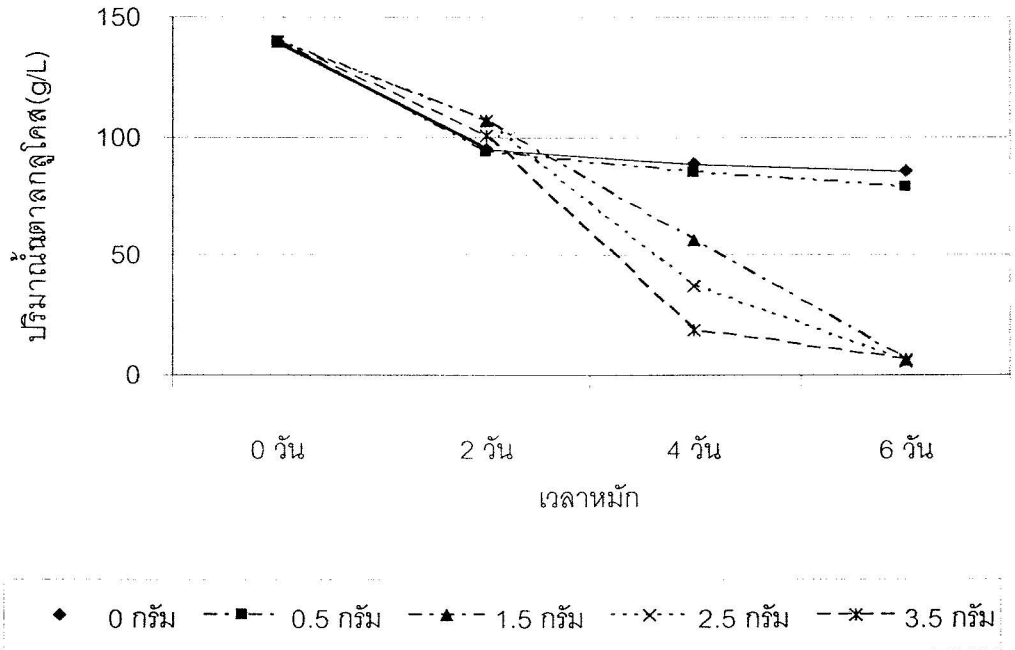
ภาพประกอบ 21 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มีผักตบชวา (รูปวงแหวน) เป็นตัวพา

4.1.3 ผลการทดลองการใช้ผักตบชวา (รูปลิ่ม) เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำผักตบชวา (รูปลิ่ม) ไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 3.5 กรัม ดังนั้นปริมาณของผักตบชวา (รูปลิ่ม) ที่ใช้ในการหมัก คือ 0.5 กรัม 1.5 กรัม 2.5 กรัม และ 3.5 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 59.91 g/L (%Yield = 42.79) จากการใช้ผักตบชวา 2.5 กรัม ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 22 และ ภาพประกอบ 23



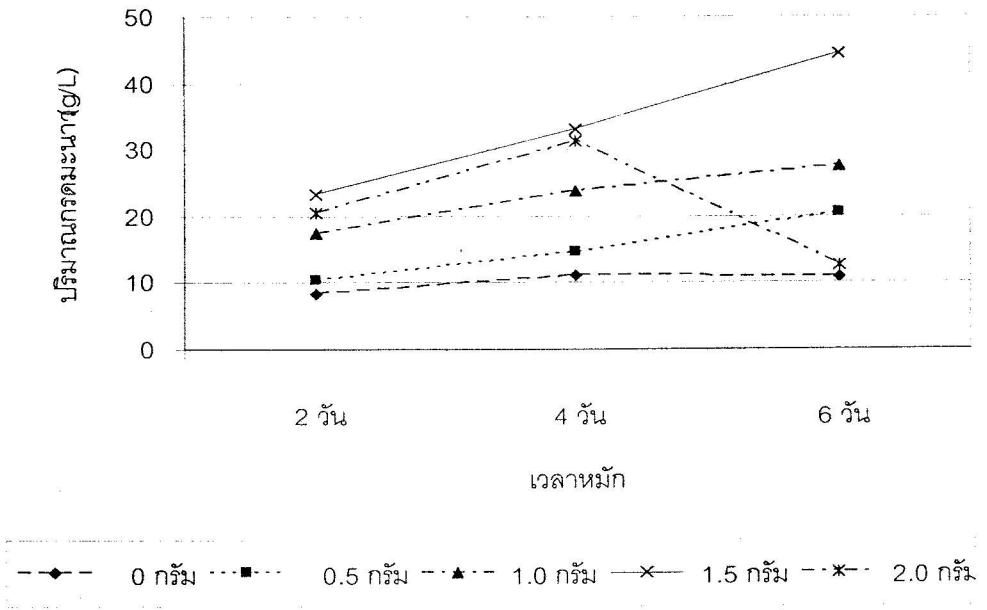
ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีผักตบชวา (รูปลิ่ม) เป็นตัวพา



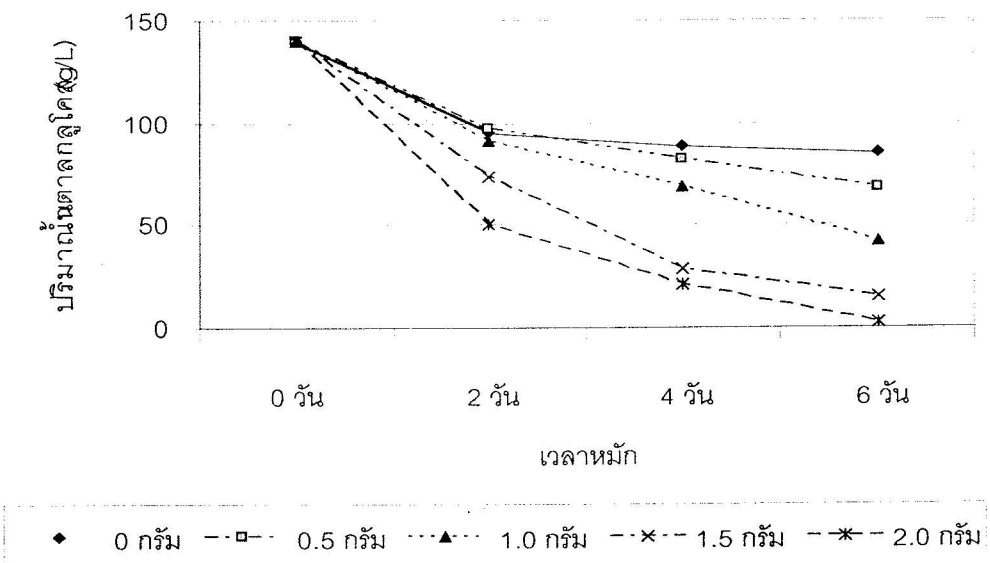
ภาพประกอบ 23 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มีผักตบชวา (รูปลิ่ม) เป็นตัวพา

4.1.4 ผลการทดลองการใช้ผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่) เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่) ไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 2 กรัม ดังนั้นปริมาณของผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่) ที่ใช้ในการหมัก คือ 0.5 กรัม 1.0 กรัม 1.5 กรัม และ 2.0 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 44.34 g/L (%Yield = 31.67) จากการใช้ผักตบชวา 1.5 กรัม ในวันที่ 6 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 24 และภาพประกอบ 25



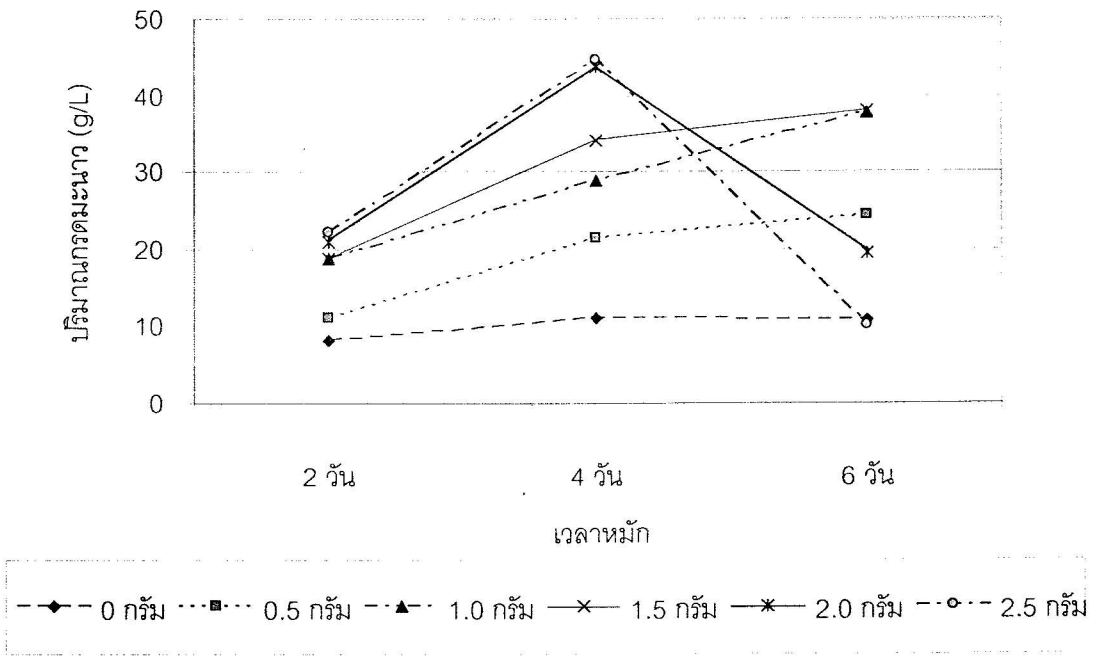
ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่) เป็นตัวพา



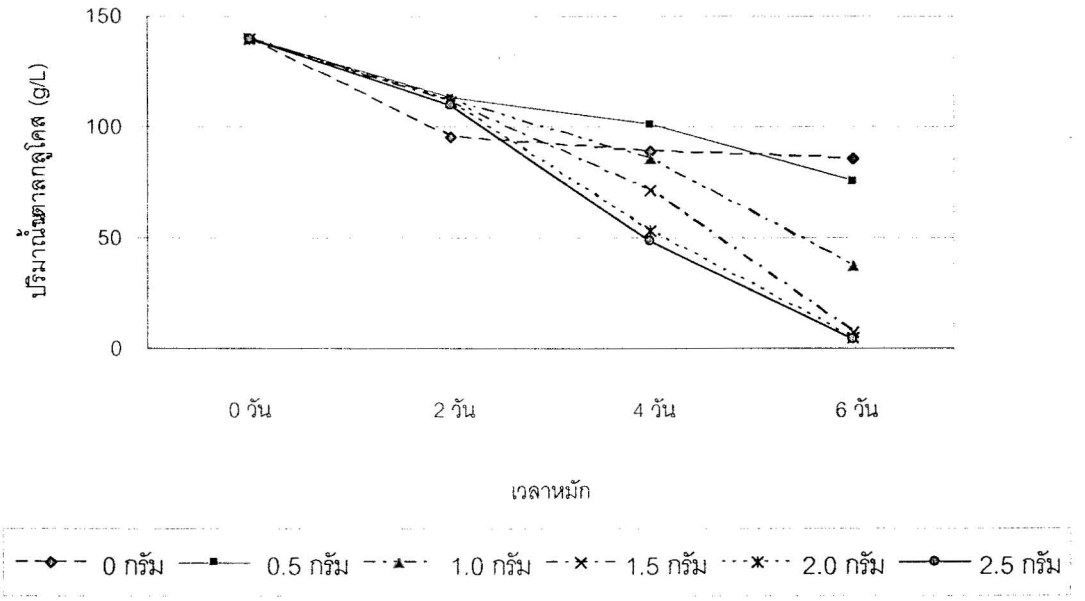
ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มีผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่) เป็นตัวพา

4.1.5 ผลการทดลองการใช้ผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก) เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก) ไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 2.5 กรัม ดังนั้นปริมาณของผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก) ที่ใช้ในการหมัก คือ 0.5 กรัม 1.0 กรัม 1.5 กรัม 2.0 กรัม และ 2.5 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุด คือ 44.70 g/L (%Yield = 31.93) จากการใช้ผักตบชวา 2.5 กรัม ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 26 และ ภาพประกอบ 27



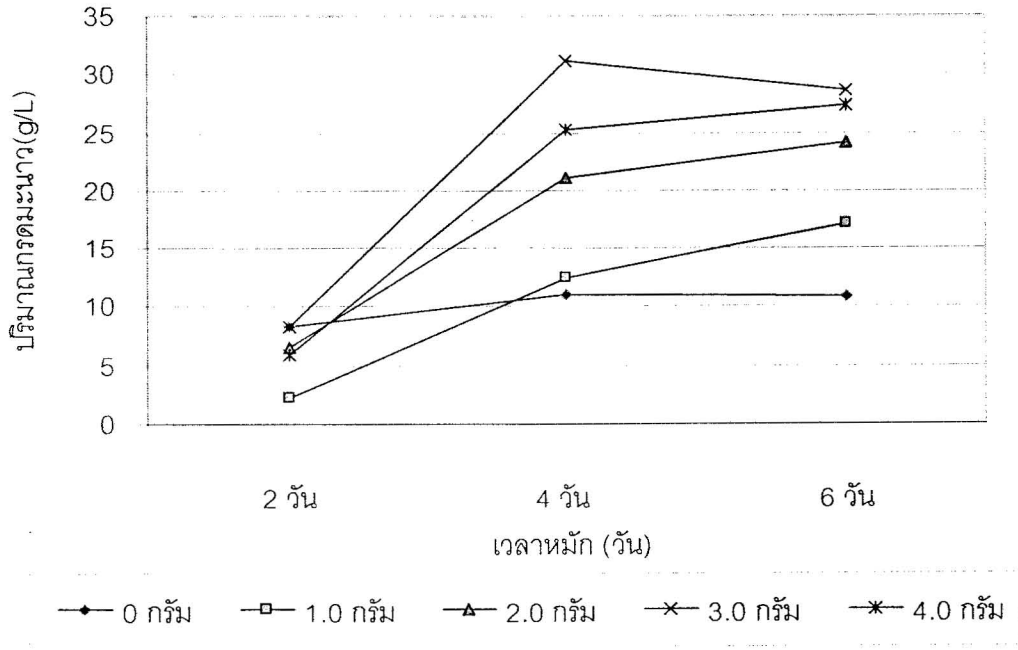
ภาพประกอบ 26 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก) เป็นตัวพา



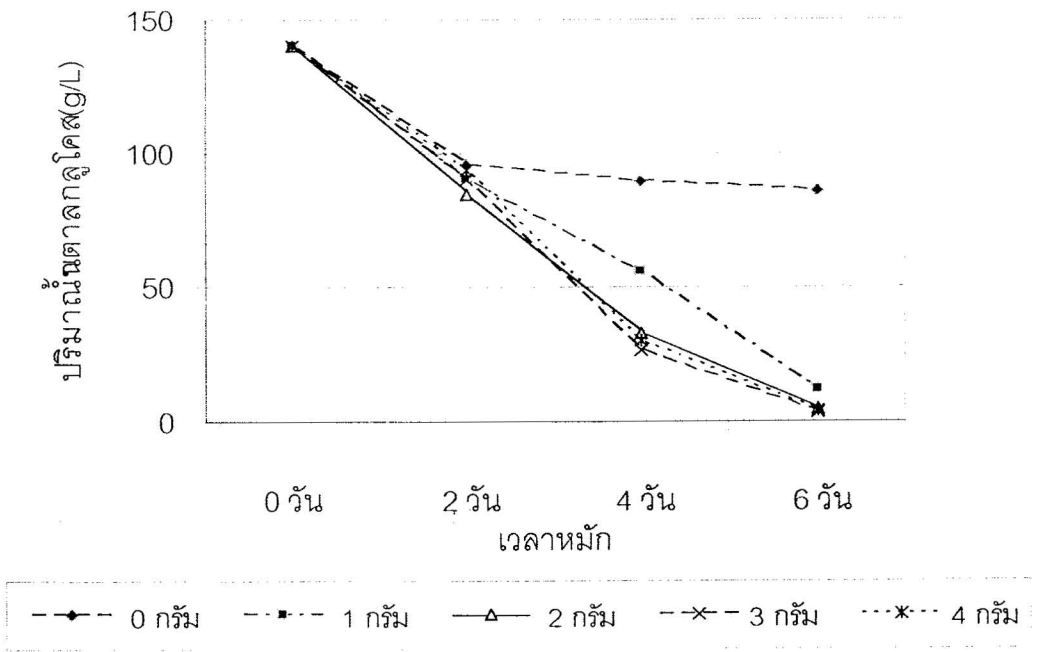
ภาพประกอบ 27 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มีผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก) เป็นตัวพา

4.1.6 ผลการทดลองการใช้กาบมะพร้าว (ชิ้น) เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำกาบมะพร้าว (ชิ้น) ไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 4.0 กรัม ดังนั้นปริมาณของกาบมะพร้าว (ชิ้น) ที่ใช้ในการหมัก คือ 1.0 กรัม 2.0 กรัม 3.0 กรัม และ 4.0 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 31.19 g/L (%Yield =22.28) จากการใช้กาบมะพร้าว (ชิ้น) 3.0 กรัม ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 28 และ ภาพประกอบ 29



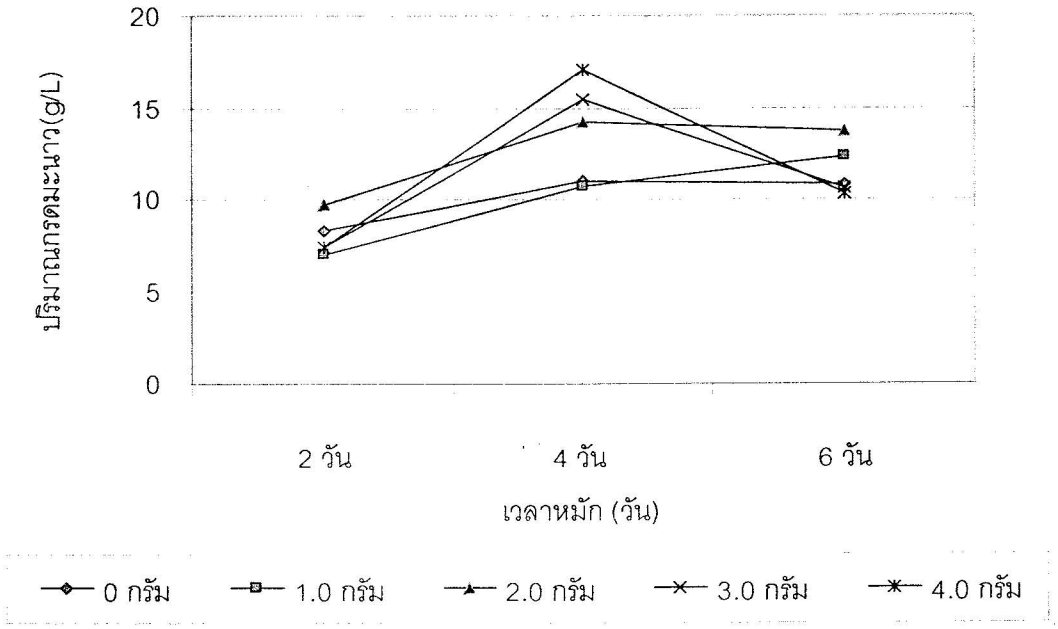
ภาพประกอบ 28 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีกาบมะพร้าว (ชิ้น) เป็นตัวพา



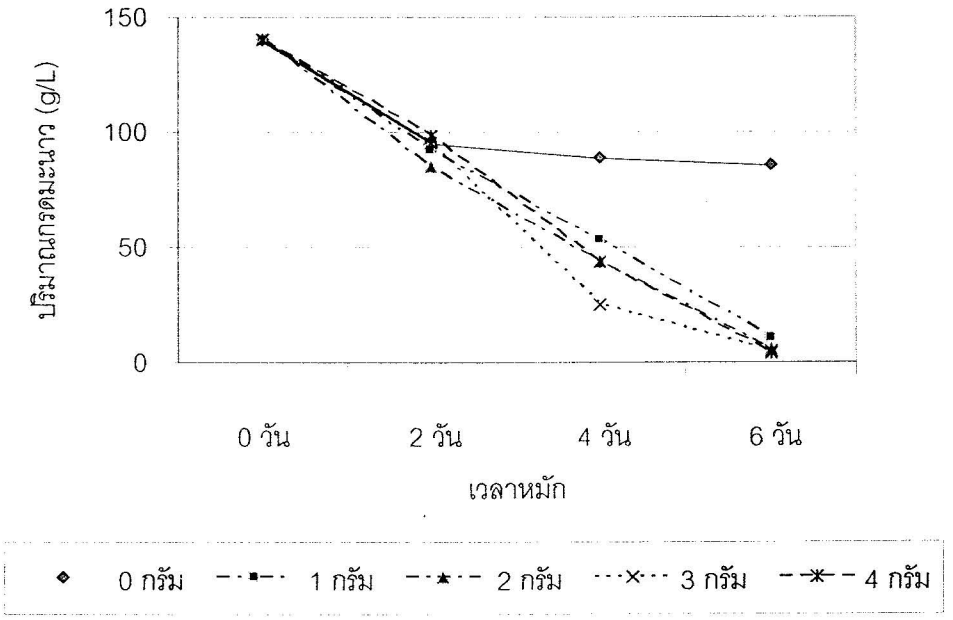
ภาพประกอบ 29 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มี กาบมะพร้าว (ชิ้น) เป็นตัวพา

4.1.7 ผลการทดลองการใช้กาบมะพร้าว (ผง) เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำกาบมะพร้าว (ผง) ไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 4.0 กรัม ดังนั้นปริมาณของกาบมะพร้าว (ผง) ที่ใช้ในการหมัก คือ 1.0 กรัม 2.0 กรัม 3.0 กรัม และ 4.0 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 17.09 g/L (%Yield =12.21) จากการใช้กาบมะพร้าว (ผง) 4.0 กรัม ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 30 และ ภาพประกอบ 31



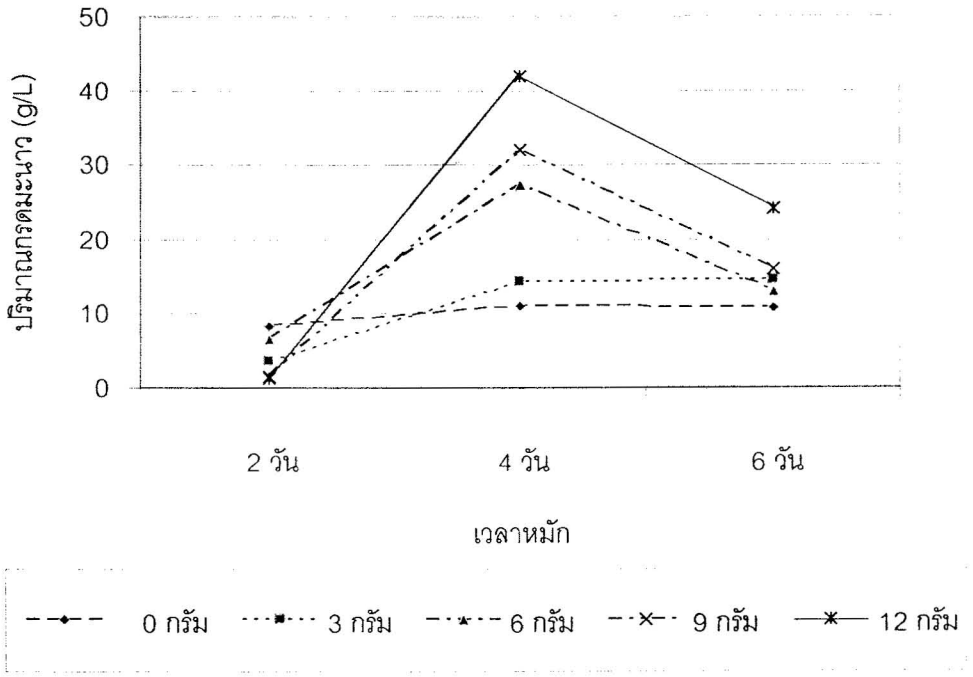
ภาพประกอบ 30 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีกาบมะพร้าว (ผง) เป็นตัวพา



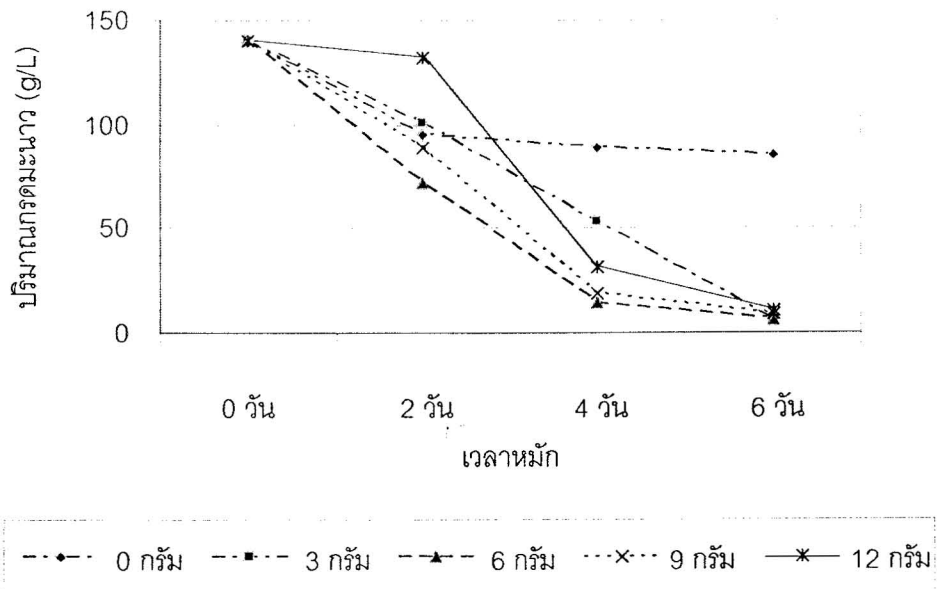
ภาพประกอบ 31 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มีกาบมะพร้าว (ผง) เป็นตัวพา

4.1.8 ผลการทดลองการใช้ซังข้าวโพด (แผ่น) เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำซังข้าวโพด (แผ่น) ไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 12.0 กรัม ดังนั้น ปริมาณของซังข้าวโพด (แผ่น) ที่ใช้ในการหมัก คือ 3.0 กรัม 6.0 กรัม 9.0 กรัม และ 12.0 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 42.16 g/L (%Yield =30.11) จากการใช้ซังข้าวโพด (แผ่น) 12.0 กรัม ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 32 และ ภาพประกอบ 33



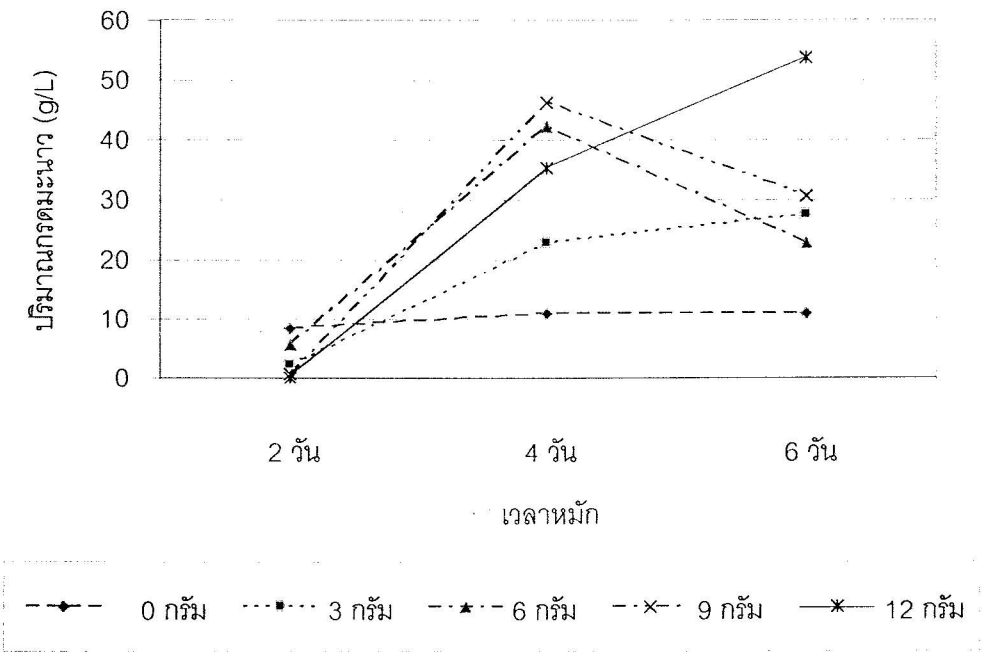
ภาพประกอบ 32 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีซังข้าวโพด (แผ่น) เป็นตัวพา



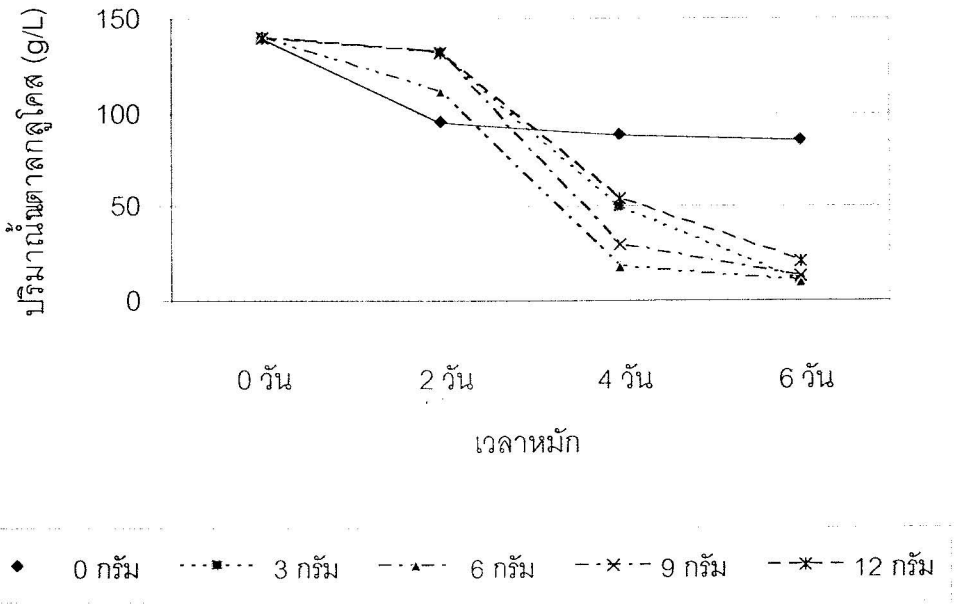
ภาพประกอบ 33 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มีซังข้าวโพด (แผ่น) เป็นตัวพา

4.1.9 ผลการทดลองการใช้ซังข้าวโพด (ชิ้น) เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำซังข้าวโพด (ชิ้น) ไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 12.0 กรัม ดังนั้นปริมาณของซังข้าวโพด (ชิ้น) ที่ใช้ในการหมัก คือ 3.0 กรัม 6.0 กรัม 9.0 กรัม และ 12.0 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 53.89 g/L (%Yield =42.06) จากการใช้ซังข้าวโพด (ชิ้น) 12.0 กรัม ในวันที่ 6 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 34 และ ภาพประกอบ 35



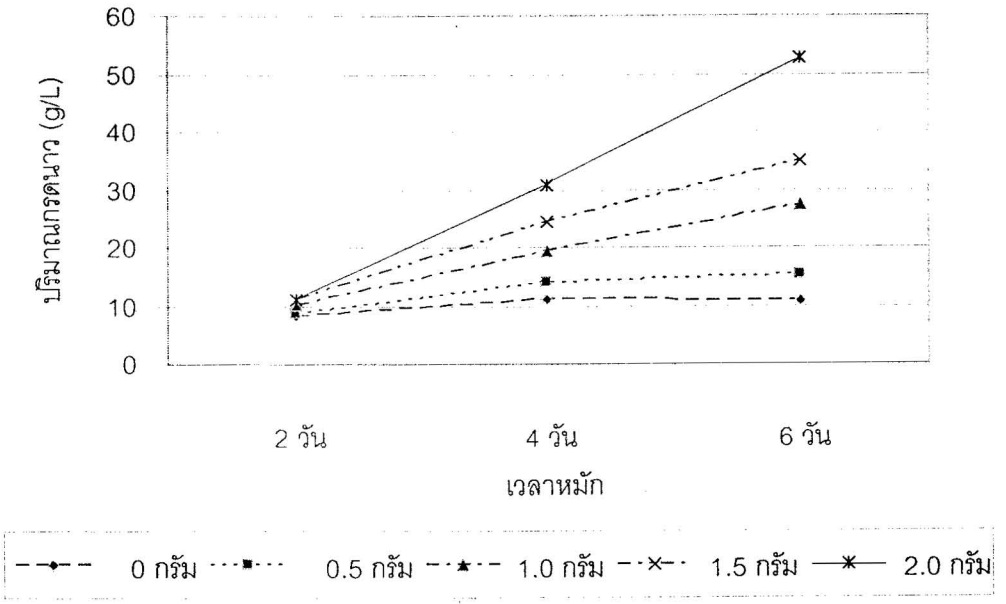
ภาพประกอบ 34 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีซังข้าวโพด (ชิ้น) เป็นตัวพา



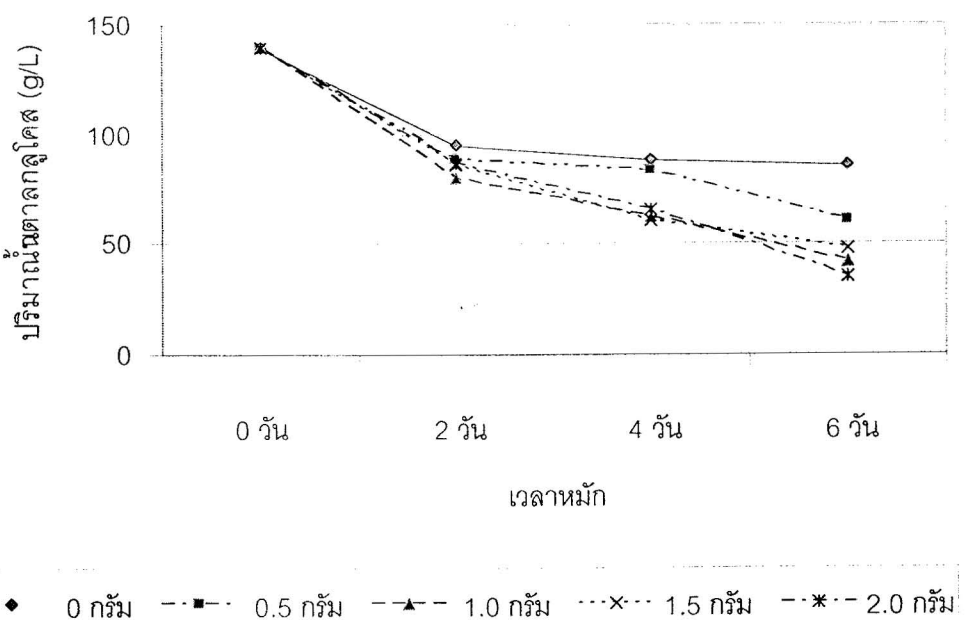
ภาพประกอบ 35 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มีซังข้าวโพด (ชิ้น) เป็น ตัวพา

4.1.10 ผลการทดลองการใช้ชานอ้อย (หยาบ) เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำชานอ้อย (หยาบ) ไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 2.0 กรัม ดังนั้นปริมาณของชานอ้อย ที่ใช้ในการหมัก คือ 0.5 กรัม 1.0 กรัม 1.5 กรัม และ 2.0 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 52.63 g/L (%Yield =37.59) จากการใช้ชานอ้อย (หยาบ) 2.0 กรัม ในวันที่ 6 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 36 และ ภาพประกอบ 37



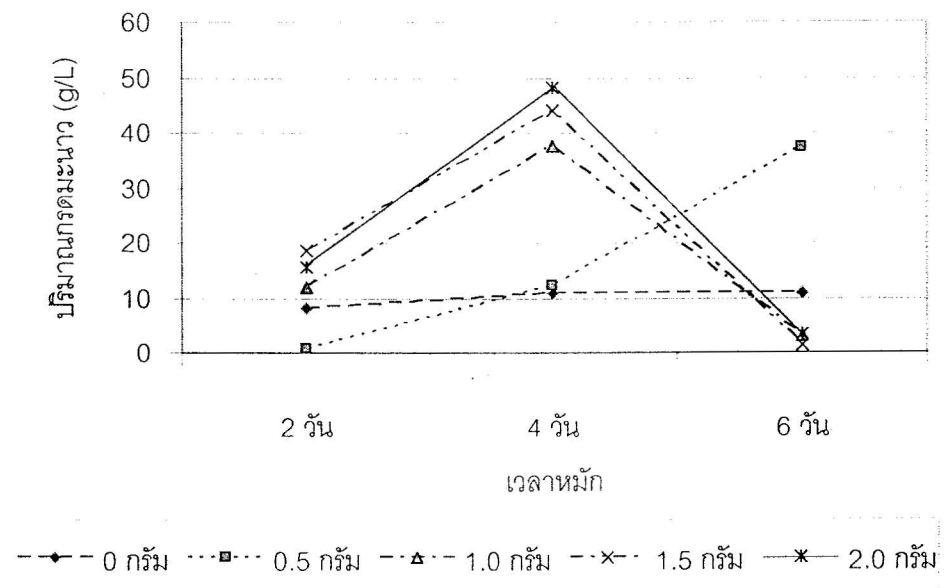
ภาพประกอบ 36 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีชานอ้อย (หยาบ) เป็นตัวพา



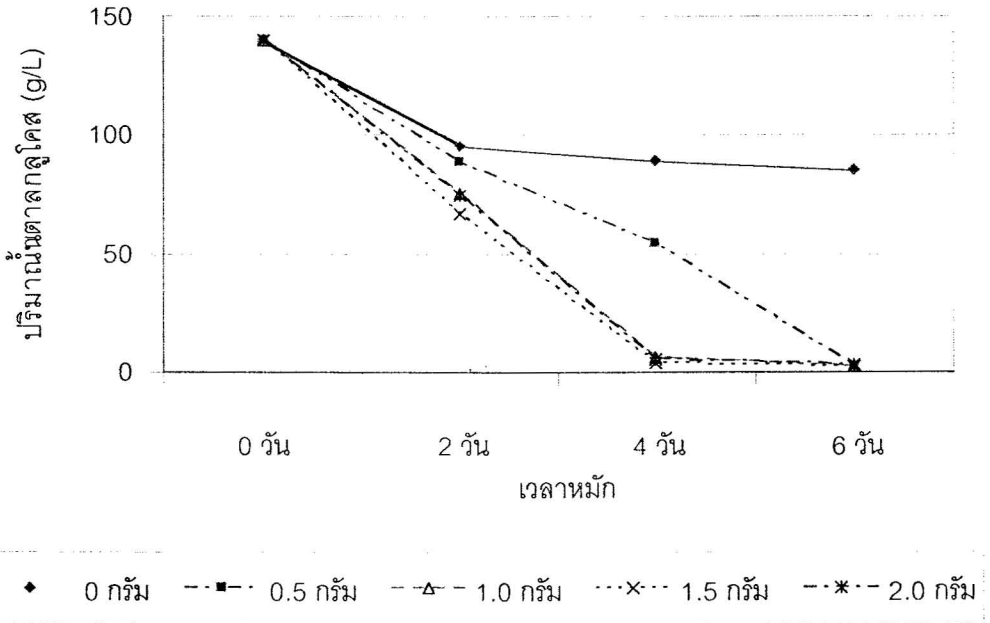
ภาพประกอบ 37 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มี ชานอ้อย (หยาบ) เป็นตัวพา

4.1.11 ผลการทดลองการใช้ชานอ้อย (ละเอียด) เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำชานอ้อย (ละเอียด) ไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 2.0 กรัม ดังนั้นปริมาณของชานอ้อย ที่ใช้ในการหมัก คือ 0.5 กรัม 1.0 กรัม 1.5 กรัม และ 2.0 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 48.01 g/L (%Yield =34.29) จากการใช้ชานอ้อย (ละเอียด) 2.0 กรัม ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 38 และ ภาพประกอบ 39



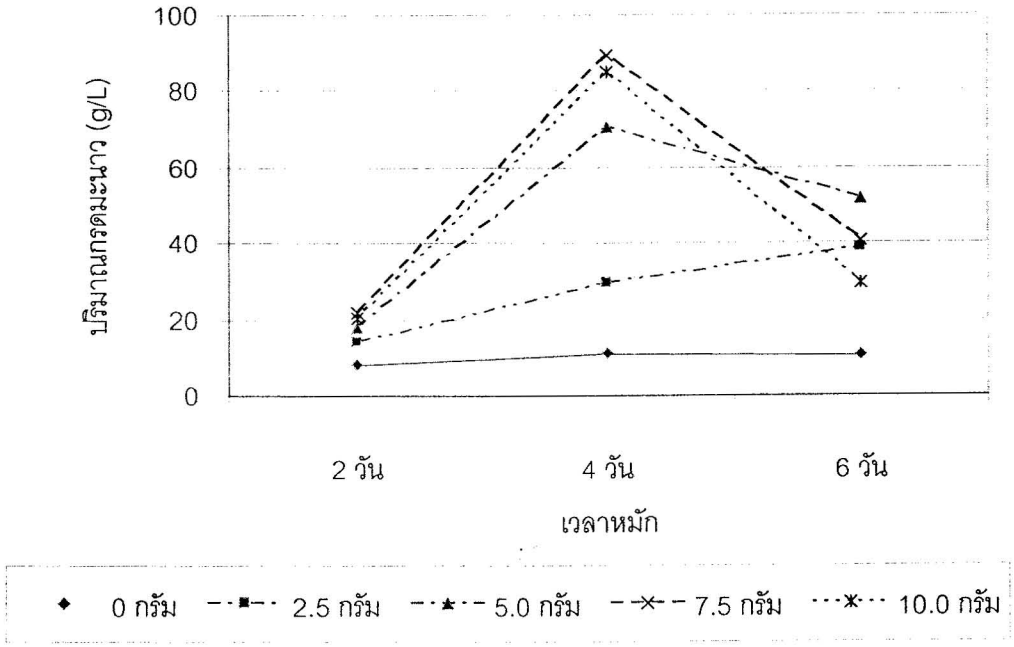
ภาพประกอบ 38 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีชานอ้อย (ละเอียด) เป็นตัวพา



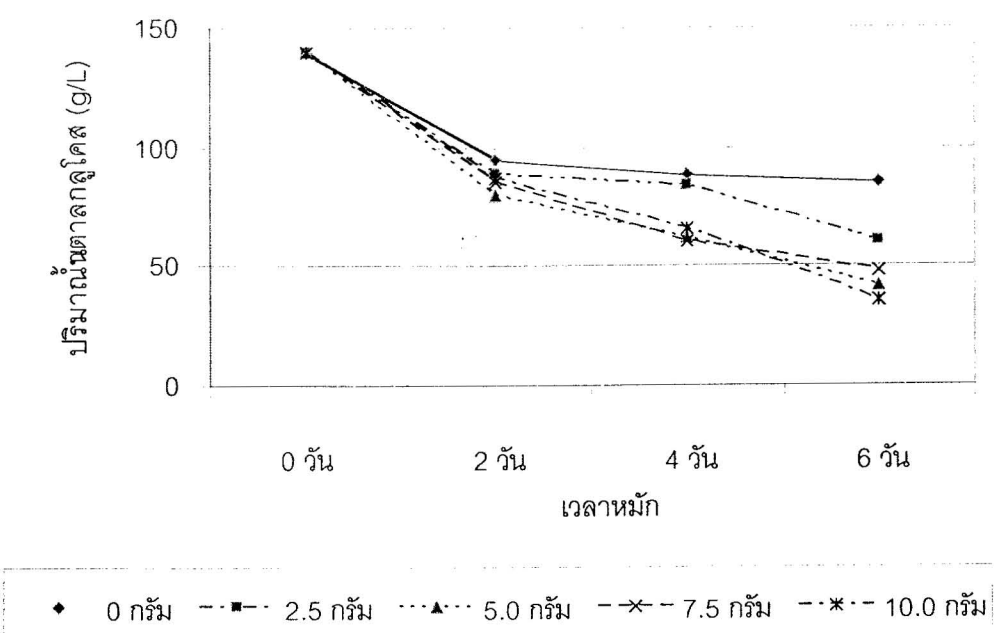
ภาพประกอบ 39 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มี ชานอ้อย (ละเอียด) เป็นตัวพา

4.1.12 ผลการทดลองการใช้ฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำฟางข้าว (ท่อนยาว) ไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 10.0 กรัม ดังนั้น ปริมาณของฟางข้าว ที่ใช้ในการหมัก คือ 2.5 กรัม 5.0 กรัม 7.5 กรัม และ 10.0 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 89.23 g/L (%Yield =63.74) จากการใช้ฟางข้าว (ท่อนยาว) 7.5 กรัม ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 40และ ภาพประกอบ 41



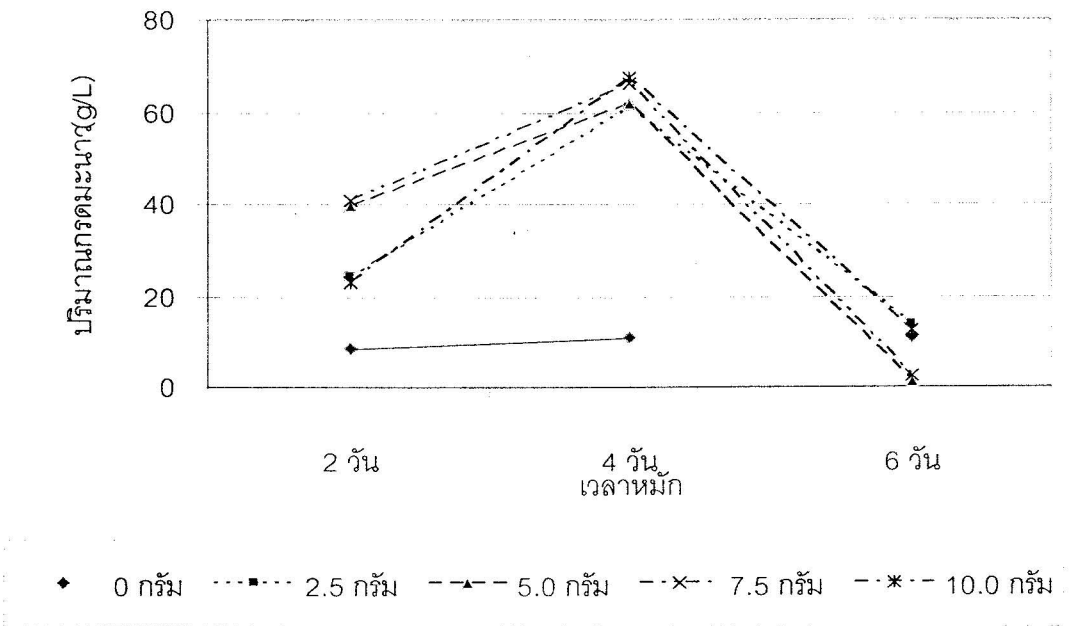
ภาพประกอบ 40 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพา



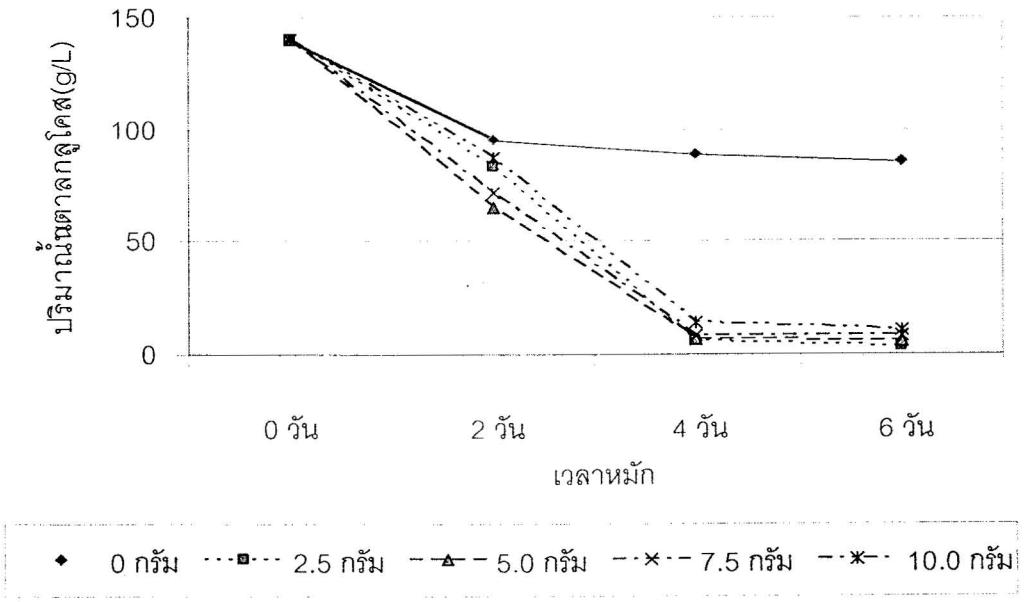
ภาพประกอบ 41 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มีฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพา

4.1.13 ผลการทดลองการใช้ฟางข้าว (ท่อนสั้น) เป็นตัวพาในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำฟางข้าว (ท่อนสั้น) ไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่สามารถใส่ได้สูงสุด คือ 10.0 กรัม ดังนั้นปริมาณของฟางข้าว ที่ใช้ในการหมัก คือ 2.5 กรัม 5.0 กรัม 7.5 กรัม และ 10.0 กรัม วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 2, 4 และ 6 ของการหมัก พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 67.28 g/L (%Yield =48.06) จากการใช้ฟางข้าว (ท่อนสั้น) 10.0 กรัม ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 42 และ ภาพประกอบ 43



ภาพประกอบ 42 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีฟางข้าว (ท่อนสั้น) เป็นตัวพา



ภาพประกอบ 43 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักที่มีฟางข้าว (ท่อนสั้น) เป็นตัวพา

จากการศึกษาการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นตัวพา ในการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง โดยมี 14% Glucose เป็นสารต้นตอคาร์บอน พบว่า เมื่อใช้ ฟางข้าวท่อนยาว ปริมาณ 7.5 กรัม เป็นตัวพา *Aspergillus niger* Yang no.2 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด โดยจะให้กรดมะนาวเท่ากับ 89.23 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 สรุปปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดของ ตัวพา แต่ละชนิด

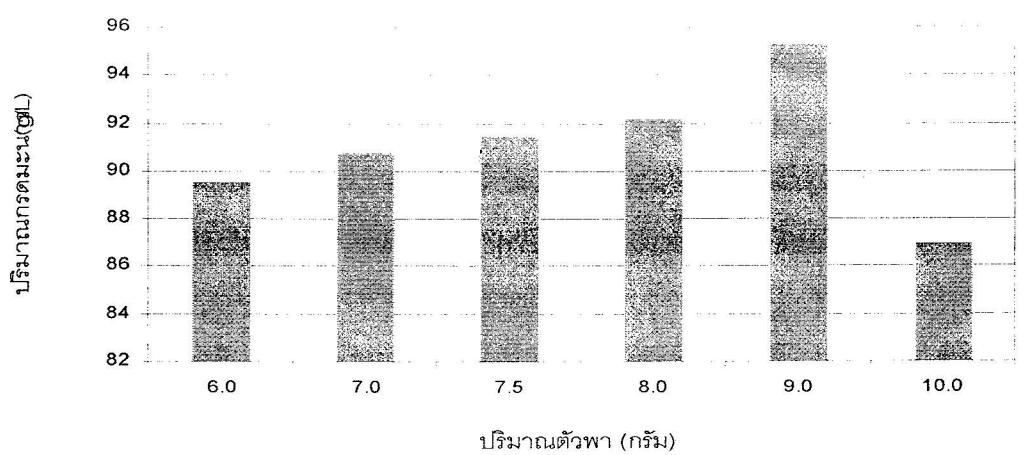
	ชนิดของ ตัวพา	Citric acid (g/L)	%Yield	ปริมาณที่เหมาะสม (g)	วันที่ผลิตได้สูงสุด
1	ไม่มี ตัวพา	10.99	7.85	0	4
2	แกลบ	53.21	38.01	8.0	4
3	ผักตบชวา (รูปวงแหวน)	67.47	48.19	1.5	4
4	ผักตบชวา (รูปลิ่ม)	59.91	42.79	2.5	4
5	ผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมใหญ่)	44.34	31.67	1.5	6
6	ผักตบชวา (รูปทรงสี่เหลี่ยมเล็ก)	44.70	31.93	2.5	4
7	กากมะพร้าว (ชิ้น)	31.19	22.28	3.0	4
8	กากมะพร้าว (ผง)	17.09	12.21	4.0	4
9	ซังข้าวโพด (แผ่น)	42.16	30.11	12.0	4
10	ซังข้าวโพด (ชิ้น)	53.89	42.06	12.0	4
11	ชานอ้อย (หยาบ)	52.63	37.59	2.0	6
12	ชานอ้อย (ละเอียด)	48.01	34.29	2.0	4
13	**ฟางข้าว (ท่อนยาว)**	**89.23**	**63.74**	**7.5**	**4**
14	ฟางข้าว (ท่อนสั้น)	67.28	48.06	10.0	4

4.2 ผลการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมที่สุดของฟางข้าว (ท่อนยาว)

แม้ว่าจะพบแล้วว่าฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพาที่ให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดจากตัวพาที่นำมาทำการทดลองทั้งหมด แต่เมื่อศึกษาตารางที่ 3 พบว่า ปริมาณของตัวพาสูงสุดมิได้ให้ปริมาณกรดมะนาวมากที่สุด จึงทำการศึกษาหา ปริมาณที่เหมาะสม ของฟางข้าวท่อนยาวที่จะทำให้ได้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุด ในการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง โดยมีน้ำตาลกลูโคส 140 g/L เป็นสารต้นตอคาร์บอน พบว่า ปริมาณของฟางข้าวท่อนยาวที่เหมาะสมในการหมักด้วยสภาวะดังกล่าว คือ 9.0 กรัม คือ 95.36 กรัมต่อลิตร โดยวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงใน ตาราง 4 และ ภาพประกอบ 44

ตาราง 4 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพา

	น้ำหนักฟางข้าว (กรัม)					
	6.0	7.0	7.5	8.0	9.0	10.0
ปริมาณกรดมะนาว (g/L)	89.57	90.85	91.49	92.22	**95.36**	86.97



ภาพประกอบ 43 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยมีฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพา

4.3 ผลการศึกษาการใช้ตัวพาในการหมักกรดมะนาวโดยใช้แป้ง เป็นสารต้นตอคาร์บอน

จากการทดลองการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นตัวพา ในการหมักกรดมะนาวโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน จากในข้อ 4.1 และ 4.2 นั้น ทำให้ทราบถึงแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของตัวพากับการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 และผลผลิตกรดมะนาวที่ได้ แต่เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนที่มีราคาสูง ซึ่งไม่เหมาะสมกับการนำไปใช้จริงในอุตสาหกรรม เพราะ การผลิตในระดับอุตสาหกรรมนั้น ควรใช้สารต้นตอคาร์บอนที่มีราคาถูกเพื่อลดต้นทุนการผลิต ซึ่งสารต้นตอคาร์บอนที่มีราคาถูกกว่าในขณะที่ *Aspergillus niger* สามารถนำไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวได้ก็คือสารจำพวกแป้ง

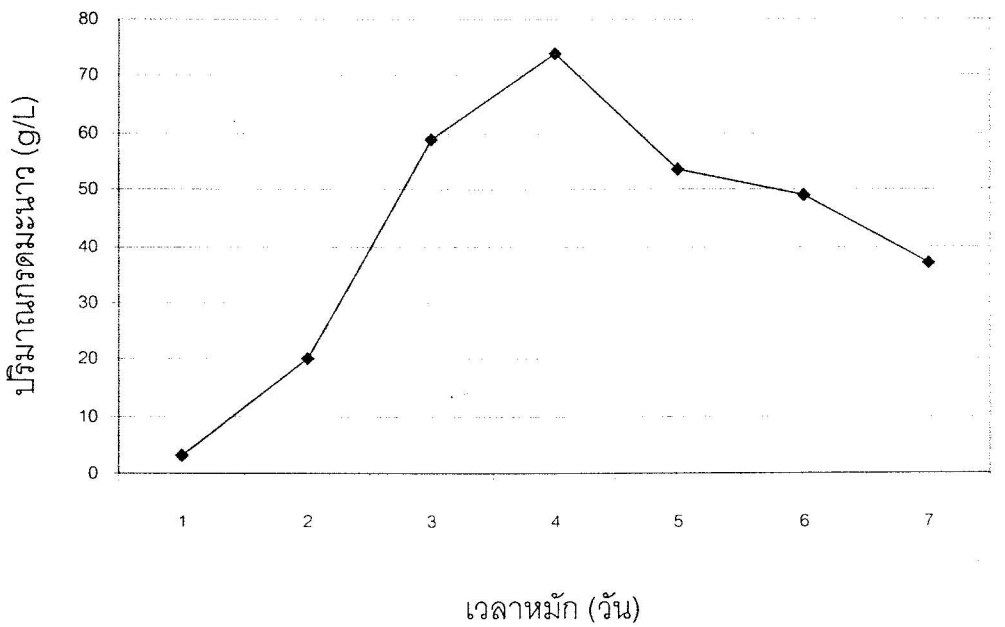
ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาการใช้ตัวพาในการหมักกรดมะนาว โดยใช้สารจำพวกแป้งเป็น สารต้นตอคาร์บอน โดยการนำตัวพาที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการหมักกรดมะนาว จากการทดลองในข้อ 4.1 และ 4.2 คือ ฟางข้าว (ท่อนยาว) ปริมาณ 9 กรัมต่อเพลท มาเป็นตัวพาในการผลิตกรดมะนาว ที่มีสารจำพวกแป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอน โดยในการทดลองจะทำการแปรเปลี่ยนแป้ง 4 ชนิด ได้แก่ Soluble starch แป้งข้าวจ้าว แป้งมันสำปะหลัง และ แป้งข้าวโพด นำแป้งแต่ละชนิด ปริมาณ 140 g/L มาเป็นสารต้นตอคาร์บอน ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง ทำการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SS medium ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการวิเคราะห์หา

- ปริมาณกรดมะนาว ที่ผลิตได้
- แอคติวิตี้ของ เอนไซม์ Glucoamylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายแป้ง ที่ใช้เป็นสารต้นตอคาร์บอนอยู่ขณะนี้ให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส
-แอคติวิตี้ของ เอนไซม์ β-Glucosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายเซโลไบโอสให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะเป็นการตรวจสอบถึงแหล่งที่มาของสารต้นตอคาร์บอน ที่ใช้ผลิตกรดมะนาว
-ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อเป็นการติดตาม ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยโดยเอนไซม์ และการนำน้ำตาลไปใช้ ในการผลิตกรดมะนาว ของ เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2

โดยจะทำการวิเคราะห์หาปริมาณตัวแปรดังกล่าว ทุกวันตลอดระยะเวลาหมัก ซึ่งจะแสดงผลการทดลองของการใช้สารต้นตอคาร์บอนแต่ละชนิดดังต่อไปนี้

4.3.1 ผลการทดลองการใช้ Soluble starch เป็นสารต้นตอคาร์บอนในการหมักกรดมะนาวที่มี ฟางข้าว (ท่อนยาว) 9 กรัม เป็นตัวพา

ผลการศึกษาหาปริมาณของกรดมะนาว, เอนไซม์ glucoamylase, เอนไซม์ β-Glucosidase และน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อใช้ Soluble starch ปริมาณ 140 g/L มาเป็นสารต้นตอคาร์บอน เมื่อทำการเจริญ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SS medium โดยมีฟางข้าว (ท่อนยาว) 9 กรัมต่อเพลทเป็นตัวพา ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ในช่วง 4 วันแรกจะมีอัตราการสะสมกรดมะนาวสูง และจะลดลงในช่วงท้ายของการหมัก โดยปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 73.93 g/L (%Yield=52.81) ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในภาพประกอบ 45



ภาพประกอบ 45 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการใช้ Soluble starch เป็นสารต้นตอคาร์บอน

เมื่อทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ glucoamylase และ β-Glucosidase ของ *Aspergillus niger* Yang no.2 ภายใต้สภาวะการหมักที่ใช้ Soluble starch เป็นสารต้นตอคาร์บอนนี้ พบว่า มีการผลิตเอนไซม์ glucoamylase ในปริมาณสูง โดยมี activity สูงสุดที่ 8.01 U/mL ในวันที่ 2 ของการหมัก ในขณะที่ เอนไซม์ β-Glucosidase มีปริมาณที่ต่ำกว่า โดยพบว่ามี activity สูงสุด ที่ 0.56 U/mL ในวันที่ 3 ของการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 5 นอกจากนั้น เมื่อศึกษาปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเป็นไปในแนวทางเดียวกับ ปริมาณของเอนไซม์ glucoamylase โดยพบปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่ 80.29 g/L ในวันแรกของการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 6

ตาราง 5 ปริมาณเอนไซม์ Glucoamylase และ β-glucosidase ที่ผลิตได้จากการใช้ Soluble starch เป็นสารต้นตอคาร์บอน

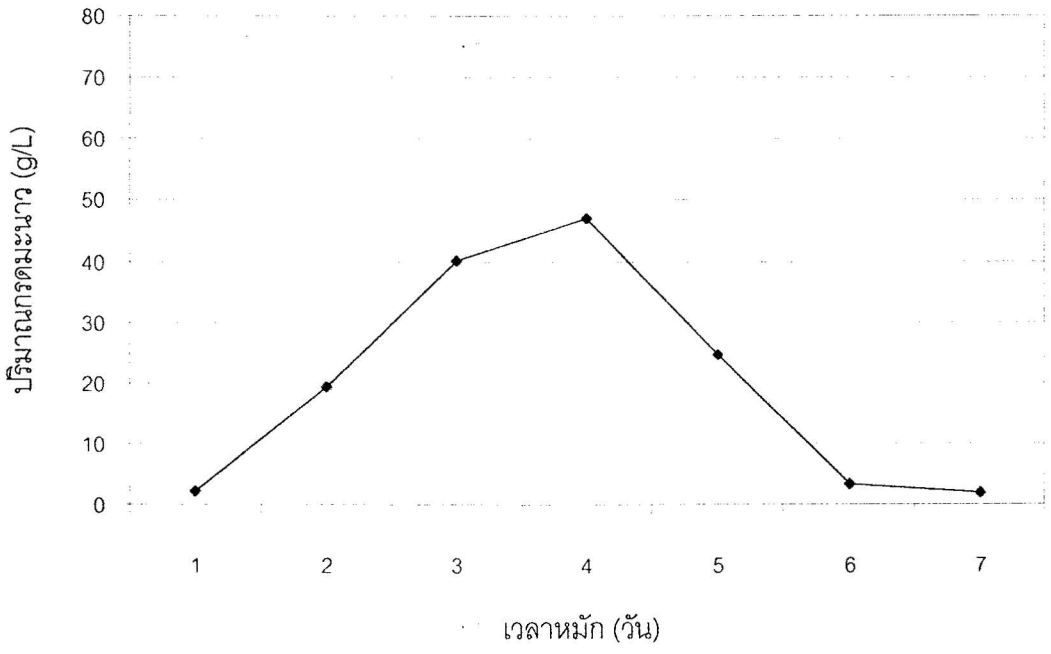
	เวลาหมัก (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Glucoamylase (U/mL)	7.08	8.01	5.85	5.64	5.16	3.51	1.86
β-glucosidase (U/mL)	0.46	0.43	0.56	0.54	0.43	0.39	0.24

ตาราง 6 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผลิตได้จากการใช้ Soluble starch เป็นสารต้นตอคาร์บอน

	เวลาหมัก (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Glucose (g/L)	80.29	67.02	45.03	22.52	20.27	15.57	16.17

4.3.2 ผลการทดลองการใช้แป้งข้าวจ้าว เป็นสารต้นตอคาร์บอนในการหมักกรดมะนาว ที่มี ฟางข้าว (ท่อนยาว) 9 กรัม เป็นตัวพา

ผลการศึกษาหาปริมาณของกรดมะนาว, เอนไซม์ glucoamylase, เอนไซม์ β-Glucosidase และน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อใช้ แป้งข้าวจ้าว ปริมาณ 140 g/L มาเป็นสารต้นตอคาร์บอน เมื่อทำการเจริญ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SS medium โดยมีฟางข้าว (ท่อนยาว) 9 กรัมต่อเพลทเป็นตัวพา ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ในช่วง 4 วันแรกจะมีอัตราการสะสมกรดมะนาวสูง และจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงท้ายของการหมัก ระหว่างการหมัก พบว่า *Aspergillus niger* Yang no.2 มีการสร้างไมซีเลียมและสปอร์เป็นจำนวนมาก มีผลทำให้ %Yield ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นกรดมะนาวต่ำ โดยปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุด คือ 47.01 g/L (%Yield=33.58) ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงผลในภาพประกอบ 46



ภาพประกอบ 46 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการใช้แป้งข้าวจ้าวเป็นสารต้นตอคาร์บอน

เมื่อทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ glucoamylase และ β-Glucosidase ของ *Aspergillus niger* Yang no.2 ภายใต้สภาวะการหมักที่ใช้แป้งข้าวจ้าวเป็นสารต้นตอคาร์บอนนี้ พบว่า มีการผลิตเอนไซม์ glucoamylase ในปริมาณสูง โดยมี activity สูงสุดที่ 9.84 U/mL ในวันที่ 2 ของการหมัก ในขณะที่ เอนไซม์ β-Glucosidase มีปริมาณที่ต่ำกว่า โดยพบว่ามี activity สูงสุด ที่ 0.49 U/mL ในวันที่ 2 ของการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 7 นอกจากนั้น เมื่อศึกษาปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเป็นไปในแนวทางเดียวกับ ปริมาณของเอนไซม์ glucoamylase โดยพบปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่ 86.34 g/L ในวันที่ 2 ของการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 8

ตาราง 7 ปริมาณเอนไซม์ Glucoamylase และ β -glucosidase ที่ผลิตได้จากการใช้ แป้งข้าวจ้าวเป็นสารต้นตอคาร์บอน

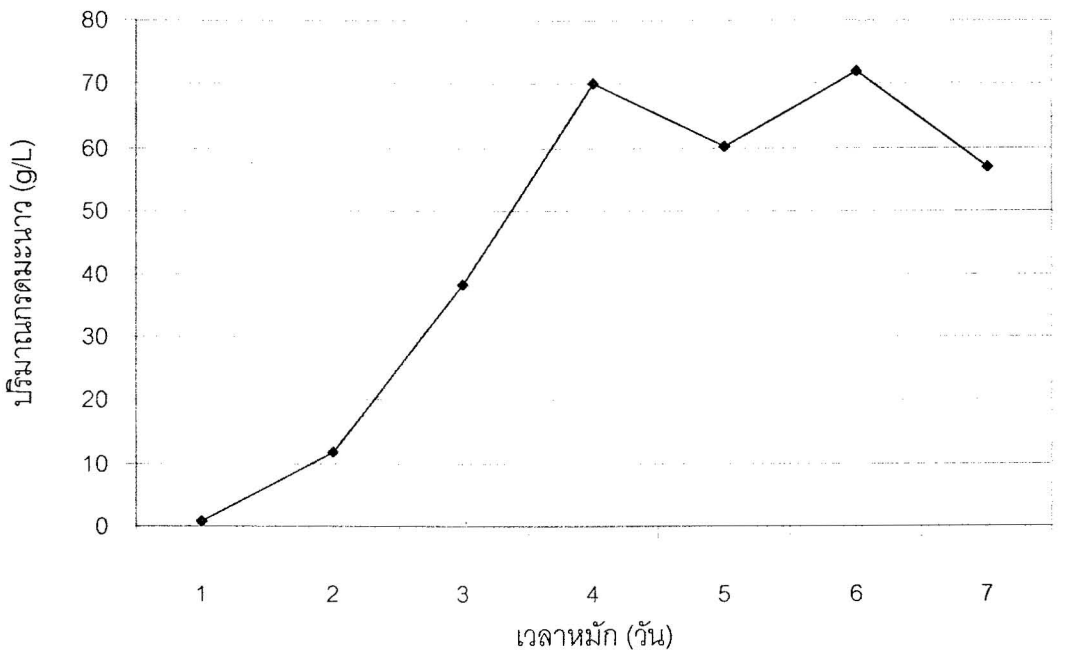
	เวลาหมัก (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Glucoamylase (U/mL)	3.27	9.84	8.88	5.52	7.74	7.68	6.72
β -glucosidase (U/mL)	0.13	0.49	0.47	0.48	0.35	0.21	0.08

ตาราง 8 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผลิตได้จากการใช้แป้งข้าวจ้าวเป็นสารต้นตอคาร์บอน

	เวลาหมัก (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Glucose (g/L)	32.76	86.34	56.27	18.36	23.68	13.21	11.29

4.3.3 ผลการทดลองการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารต้นตอคาร์บอนในการหมักกรดมะนาวที่มี ฟางข้าว (ท่อนยาว) 9 กรัม เป็นตัวพา

ผลการศึกษาหาปริมาณของกรดมะนาว, เอนไซม์ glucoamylase, เอนไซม์ β-Glucosidase และน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อใช้ แป้งมันสำปะหลัง ปริมาณ 140 g/L มาเป็นสารต้นตอคาร์บอน เมื่อทำการเจริญ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SS medium โดยมีฟางข้าว (ท่อนยาว) 9 กรัมต่อเพลทเป็นตัวพา ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุด คือ 72.04 g/L (%Yield=51.46) ในวันที่ 6 ของการหมัก ดังแสดงผลใน ภาพประกอบ 47



ภาพประกอบ 47 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการใช้ แป้งมันสำปะหลังเป็นสารต้นตอคาร์บอน

เมื่อทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ glucoamylase และ β-Glucosidase ของ *Aspergillus niger* Yang no.2 ภายใต้สภาวะการหมักที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารต้นตอคาร์บอนนี้ พบว่า มีการผลิตเอนไซม์ glucoamylase ในปริมาณสูง โดยมี activity สูงสุดที่ 8.91 U/mL ในวันที่ 3 ของการหมัก ในขณะที่ เอนไซม์ β-Glucosidase มีปริมาณที่ต่ำกว่า โดยพบว่ามี activity สูงสุด ที่ 0.43 U/mL ในวันที่ 3 ของการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 9 และเมื่อพิจารณาเอนไซม์ glucoamylase พบว่า เมื่อปริมาณกรดมะนาวสูงขึ้น activity ของเอนไซม์ glucoamylase จะลดต่ำลง นอกจากนั้น เมื่อศึกษาปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเป็นไปในแนวทางเดียวกับ ปริมาณของเอนไซม์ glucoamylase โดยพบปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่ 89.24 g/L ในวันที่ 3 ของการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 10

ตาราง 9 ปริมาณเอนไซม์ Glucoamylase และ β -glucosidase ที่ผลิตได้จากการใช้ แป้งมันสำปะหลังเป็นสารต้นตอคาร์บอน

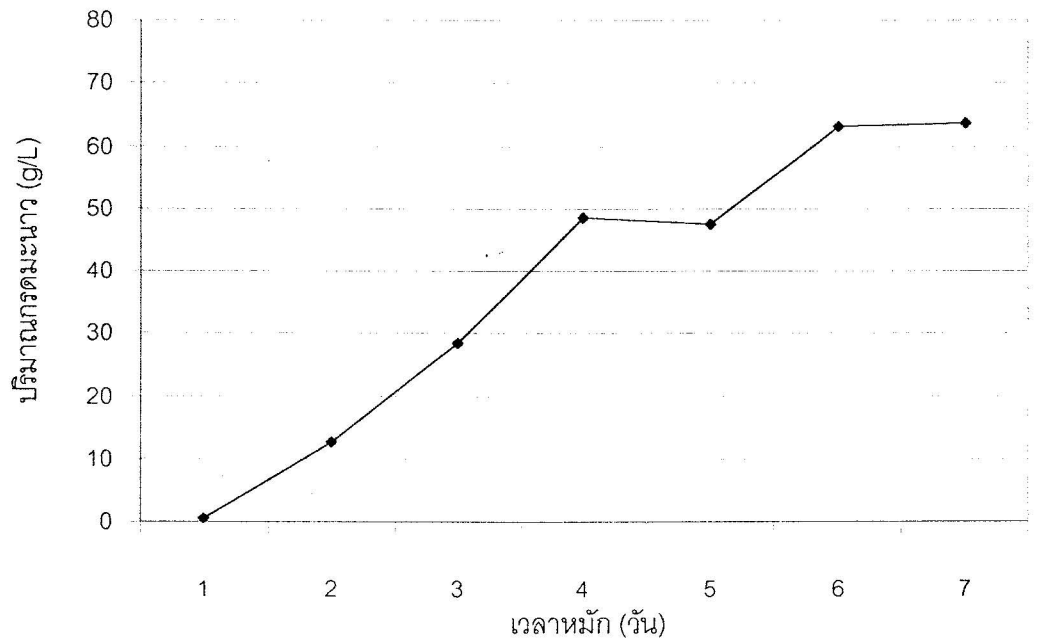
	เวลาหมัก (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Glucoamylase (U/mL)	3.00	10.32	8.91	5.76	7.83	5.58	4.89
β -glucosidase (U/mL)	0.22	0.35	0.43	0.39	0.26	0.19	0.08

ตาราง 10 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผลิตได้จากการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารต้นตอคาร์บอน

	เวลาหมัก (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Glucose (g/L)	31.79	89.24	66.37	22.68	38.83	23.61	20.59

4.3.4 ผลการทดลองการใช้แป้งข้าวโพด เป็นสารต้นตอคาร์บอนในการหมักกรดมะนาว ที่มี ฟางข้าว(ท่อนยาว) 9 กรัม เป็นตัวพา

ผลการศึกษาหาปริมาณของกรดมะนาว, เอนไซม์ glucoamylase, เอนไซม์ β-Glucosidase และน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อใช้ แป้งข้าวโพด ปริมาณ 140 g/L มาเป็นสารต้นตอคาร์บอน เมื่อทำการเจริญ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SS medium โดยมีฟางข้าว (ท่อนยาว) 9 กรัมต่อเพลทเป็นตัวพา ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า อัตราการผลิตกรดมะนาวต่ำกว่าแป้งชนิดอื่นที่นำมาทำการทดลอง โดยปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุด คือ 63.60 g/L (%Yield=45.43) ในวันที่ 7 ของการหมัก ดังแสดงผลในภาพประกอบ 48



ภาพประกอบ 48 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการใช้ แป้งข้าวโพดเป็นสารต้นตอคาร์บอน

เมื่อทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ glucoamylase และ β-Glucosidase ของ *Aspergillus niger* Yang no.2 ภายใต้สภาวะการหมักที่ใช้แป้งข้าวโพดเป็นสารต้นตอคาร์บอนนี้ พบว่า มีการผลิตเอนไซม์ glucoamylase ในปริมาณสูง โดยมี activity สูงสุดที่ 7.86 U/mL ในวันที่ 3 ของการหมัก ในขณะที่ เอนไซม์ β-Glucosidase มีปริมาณที่ต่ำกว่า โดยพบว่ามี activity สูงสุด ที่ 0.49 U/mL ในวันที่ 3 ของการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 11 และเมื่อพิจารณาเอนไซม์ glucoamylase พบว่า เมื่อปริมาณกรดมะนาวสูงขึ้น activity ของเอนไซม์ glucoamylase จะลดต่ำลง นอกจากนั้น เมื่อศึกษาปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเป็นไปในแนวทางเดียวกับ ปริมาณของเอนไซม์ glucoamylase โดยพบปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่ 59.68 g/L ในวันที่ 2 ของการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 12

ตาราง 11 ปริมาณเอนไซม์ Glucoamylase และ β-glucosidase ที่ผลิตได้จากการใช้ แป้งข้าวโพดเป็นสารต้นตอคาร์บอน

	เวลาหมัก (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Glucoamylase (U/mL)	4.92	6.36	7.86	3.75	4.59	1.92	1.35
β-glucosidase (U/mL)	0.27	0.38	0.49	0.44	0.35	0.26	0.23

ตาราง 12 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผลิตได้จากการใช้แป้งข้าวโพดเป็นสารต้นตอคาร์บอน

	เวลาหมัก (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Glucose (g/L)	49.19	59.68	58.81	26.12	29.32	16.66	12.38

จากการศึกษาการใช้สารจำพวกแป้งในปริมาณ 140 g/L เป็นสารต้นตอคาร์บอน ในการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในสภาวะการเจริญแบบกึ่งแข็ง โดยมีฟางข้าว (ท่อนยาว) 9 กรัมต่อเพลทเป็นตัวพา พบว่า เมื่อใช้ Soluble starch จะได้ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด โดยจะให้กรดมะนาวเท่ากับ 73.93 g/L ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในตาราง 13

ตาราง 13 แสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยใช้สารจำพวกแป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอน

	ชนิดของสารต้นตอคาร์บอน	Citric acid (g/L)	%Yield	วันที่ผลิตได้สูงสุด
1	Soluble starch	73.93	52.81	4
2	แป้งข้าวจ้าว	47.01	33.58	4
3	แป้งมันสำปะหลัง	72.04	51.46	6
4	แป้งข้าวโพด	63.60	45.43	7

บทที่ 5
สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 6 ชนิด คือ แกลบ ผักตบชวา กาบมะพร้าว ซังข้าวโพด ซานอ้อย และฟางข้าว ทำการแปรเปลี่ยนรูปร่างและขนาด ตามความเหมาะสมของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิด จะได้เป็นวัสดุที่มีลักษณะทางกายภาพแตกต่างกัน 13 รูปแบบ เมื่อนำวัสดุแต่ละรูปแบบ มาทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้เป็นตัวพา ในการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบ Semi–solid culture ซึ่งทำการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SS medium ที่มีกลูโคส 140 g/L เป็นสารต้นตอคาร์บอน ในอุณหภูมิห้อง พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการใช้ตัวพาแต่ละชนิด มีความแตกต่างกัน โดยการใช้ฟางข้าว (ท่อนยาว) 9 กรัมต่อเพลท จะให้ผลผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด คือ 95.36 g/L (%Yield = 68.11) ในวันที่ 4 ของการหมัก ซึ่งปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้นี้ สูงกว่าการหมักในสภาวะเดียวกันที่ไม่มีตัวพาถึง 8 เท่า แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวพาทำให้ประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวดีขึ้นมาก

เมื่อนำฟางข้าวดังกล่าวมาเป็นตัวพา ในการผลิตกรดมะนาวที่มีสารต้นตอคาร์บอนเป็นสารจำพวกแป้ง ได้แก่ Soluble starch แป้งข้าวจ้าว แป้งมันสำปะหลัง และ แป้งข้าวโพด ในปริมาณ 140 g/L พบว่า เมื่อใช้ Soluble starch จะให้ผลผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด คือ 73.93 g/L (%Yield = 52.81) ในวันที่ 4 ของการหมัก

เมื่อทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ Glucoamylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทอย่างมากในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคส ตลอดระยะเวลา 7 วันของการหมักของแป้งทั้ง 4 ชนิด พบว่า เริ่มมีการผลิตเอนไซม์ในวันที่ 1 ของการหมัก และมีปริมาณเอนไซม์สูงสุดในช่วงวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 6.0-10.0 U/mL หลังจากนั้นปริมาณของเอนไซม์จะเริ่มลดลง โดยปริมาณของเอนไซม์ Glucoamylase จะสอดคล้องกับปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ ยังพบว่าภายใต้สภาวะที่มีแป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอนนี้ เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 มีการผลิตเอนไซม์ β-Glucosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการเปลี่ยนเซโลไบโอสเป็นน้ำตาลกลูโคส ตลอดระยะเวลา 7 วันของการหมัก ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.2-0.6 U/mL

5.2 อภิปรายผลการทดลอง

จากงานวิจัยที่ผ่านมาการผลิตกรดมะนาวในการเจริญแบบ Semi–solid culture นั้นมักจะใช้ชานอ้อยเป็นตัวพา ดังเช่น K. Kirimura และคณะ (1999) ได้ใช้ชานอ้อย (ไม่ระบุขนาดและปริมาณ) เป็นตัวพา ในการผลิตกรดมะนาว ใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบ Semi–solid culture ที่มี 140 g/L ของ Xylose และ Arabinose เป็นสารต้นตอคาร์บอน พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้ คือ 72.4 g/L และ 52.6 g/L ตามลำดับ และที่สอดคล้องกับงานวิจัยชิ้นนี้ คือ ชะไมพร. (2541) ได้ทำการ ใช้ชานอ้อยที่มีขนาดสั้น 1.3 กรัม ร่วมกับ ชานอ้อยที่มีขนาดยาว 2.6 กรัม ในอัตราส่วน 1:2 เป็นตัวพา ทำการหมักกรดมะนาวโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบ Semi–solid culture ที่มีกลูโคส 140 g/L เป็นสารต้นตอคาร์บอน พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้ คือ 13.5 g/L เป็นการแสดงเห็นได้ว่า การใช้ฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพา ช่วยการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวในการเจริญแบบ Semi–solid culture เป็นอย่างมาก

เมื่อศึกษาผลที่ได้จากการทดลอง พบว่า คุณสมบัติของตัวพาหลายประการ มีผลกับการเจริญของ *Aspergillus niger* Yang no.2 เพื่อผลิตกรดมะนาว ได้แก่ ความสามารถในการซึมซับอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเหมาะสมในการให้ Mycelium ของเชื้อราได้ยึดเกาะ ความสามารถในการเก็บกักความชื้น และ องค์ประกอบทางเคมีบางอย่างที่มีอยู่ในตัวพา

ความสามารถในการซึมซับอาหารเลี้ยงเชื้อ นั้นจะเป็นการทำให้อาหารมีการกระจายตัวเมื่อเชื้อรามีการเจริญก็สามารถเข้าถึงและนำสารอาหารไปใช้ได้อย่างเต็มที่ ดังนั้น หากตัวพามีความสามารถในการซึมซับอาหารดี ก็จะทำให้การเจริญของเชื้อรารวดเร็ว และ ผลิตกรดมะนาวได้ดี ตัวพาที่มีความสามารถในการซึมซับอาหารเลี้ยงเชื้อมาก คือ ตัวพาที่เมื่อมีปริมาณมากพอสามารถซึมซับอาหารเลี้ยงเชื้อได้จนหมด จนไม่มีอาหารเป็นของเหลวเหลืออยู่ที่ด้านล่างจานเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ผักตบชวา ชานอ้อย และ ฟางข้าว ในขณะที่ตัวพาที่มีความสามารถในการซึมซับอาหารเลี้ยงเชื้อน้อย คือ ตัวพาที่แม้ว่าจะมีปริมาณมากก็ยังพบว่ามีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ด้านล่างของจานเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แกลบ กาบมะพร้าว และ ซังข้าวโพด

ในส่วนของ ความเหมาะสมในการให้ Mycelium ของเชื้อราได้ยึดเกาะ มีความสัมพันธ์กับการเจริญของ Mycelium และผลผลิตกรดมะนาวอย่างยิ่ง เนื่องจาก ตัวพา คือวัสดุที่จะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้ Mycelium ยึดเกาะ เพื่อที่จะได้สัมผัสกับ อาหาร และออกซิเจนได้มากขึ้นดังนั้น สมมติฐานก่อนการวิจัยเชื่อว่าวัสดุที่มีลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกัน เมื่อมีขนาดเล็กลง พื้นที่ผิวจะมากขึ้น การเจริญของ Mycelium จะดีกว่า และเมื่อนำไปใช้ในการผลิตกรดมะนาวจะให้ผลผลิตดีกว่า แต่เมื่อทำการทดลองจริง พบว่า ตัวพาที่มีขนาดเล็กเกินไป จะทำให้ Mycelium เจริญออกไปเกาะเกี่ยวกัน กลายเป็นแผ่นของ Mycelium ที่อยู่ระหว่างตัวพาทำให้เกิดการกีดกัน ลดพื้นที่ผิวการสัมผัสอาหาร และออกซิเจน ดังแสดงให้เห็นในผลการทดลองเปรียบเทียบ

ระหว่าง การใช้ตัวพาที่มีองค์ประกอบเหมือนกันแต่ขนาดต่างกัน ได้แก่ ผักตบชวา (รูปวงแหวน) กับผักตบชวา (รูปลิ่ม) กาบมะพร้าว (ชิ้น) กับกาบมะพร้าว (ผง) ชานอ้อย (หยาบ) กับชานอ้อย (ละเอียด) และ ฟางข้าว (ท่อนยาว) กับฟางข้าว (ท่อนสั้น) อย่างไรก็ตาม ตัวพาที่มีขนาดใหญ่เกินไปก็ลดผลผลิตกรดมะนาวที่ได้เช่นกัน ดังแสดงให้เห็นในผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่าง ซังข้าวโพด (แผ่น) กับซังข้าวโพด (ชิ้น)

ความสามารถในการเก็บกักความชื้นก็มีส่วนทำให้การเจริญของ Mycelium และผลผลิตกรดมะนาวเปลี่ยนแปลง เพราะตลอดระยะเวลาการหมัก จะมีการระเหยของน้ำออกจากอาหาร เมื่อเวลาหมักเพิ่มขึ้น หากตัวพาเก็บกักความชื้นได้น้อยหรือเพิ่มอัตราการระเหยของน้ำก็จะทำให้ตัวพานั้นแห้ง แม้ปริมาณสารต้นตอคาร์บอนยังเหลืออยู่ เชื้อราก็ไม่อาจนำไปใช้ได้อย่างเต็มที่ ถึงแม้ว่าในการหมักนั้นจะเป็นระบบปิด น้ำที่แยกตัวออกจากอาหารจะไปเกาะเป็นหยดน้ำอยู่ที่ฝาของจานเลี้ยงเชื้อ เกิดสมดุลไดนามิกส์ของความชื้น แต่นั้นก็ทำให้เกิดความไม่สม่ำเสมอของการเจริญ เพราะจะมีบางส่วนที่แห้งและมีบางส่วนที่ได้รับความชื้น ส่งผลถึงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้เช่นกัน

ในส่วนขององค์ประกอบทางเคมีที่มีในตัวพาแต่ละชนิดนั้น เป็นส่วนที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับ คุณสมบัติสามประการที่ผ่านมา แต่กระนั้น ในระหว่างการทดลอง ก็พบคุณสมบัติซึ่งแสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบทางเคมีบางอย่างที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว นั่นคือ ความสามารถในการเป็นสารต้นตอคาร์บอนของตัวพา โดยตัวพาที่มีสารต้นตอคาร์บอนที่เชื้อรานำไปใช้ได้ คือ ตัวพาที่มีการผลิตกรดมะนาวได้ในปริมาณมาก แม้ว่าไม่เติมสารต้นตอคาร์บอนอื่นลงไป (Blank) และปริมาณของกรดมะนาว แปรผันตรงกับปริมาณของตัวพา ได้แก่ ฟางข้าว และ ซังข้าวโพด ในขณะที่ตัวพาที่ไม่มีสารต้นตอคาร์บอนที่เชื้อรานำไปใช้ได้ คือ ตัวพาที่เมื่อไม่เติมสารต้นตอคาร์บอนอื่นในการหมัก จะมีการผลิตกรดมะนาวได้ในปริมาณน้อย มีค่าเกือบคงตัว และไม่ขึ้นกับปริมาณของตัวพา ได้แก่ แกลบ ผักตบชวา ชานอ้อย และกาบมะพร้าว ทั้งนี้จากการศึกษาทำให้เชื่อได้ว่าสารต้นตอคาร์บอนที่เชื้อราใช้นั้นเป็นสารจำพวกโพลิแซคคาไรด์ ซึ่งเกาะอยู่บริเวณผิวของตัวพา โดยไม่ละลายไปกับน้ำเมื่อทำการล้างแต่จะละลายออกมาหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) นั่นคือ *Aspergillus niger* Yang no.2 จะให้มีสารต้นตอคาร์บอนกระจายในทุกบริเวณที่มีตัวพา ทำให้เชื้อราเจริญได้อย่างสม่ำเสมอ

จากผลการทดลองที่สรุปว่า ฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพาที่ดีที่สุดนั้น เนื่องมาจากตัวพาชนิดนี้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมทุกประการ ซึ่งกล่าวโดยสรุปจะได้ว่า จากปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญในการเจริญของเชื้อรา คือ อาหาร ออกซิเจน และความชื้น นั้น การใช้ฟางข้าว (ท่อนยาว) เป็นตัวพา เป็นการทำให้ปัจจัยทั้งสามนี้ มีการกระจายตัว อย่างสม่ำเสมอและเหมาะสม ด้วยลักษณะที่เป็นทรงกระบอกที่ยาวและกลวง ทำให้สามารถเก็บความชื้นไว้ได้นาน สามารถดูดซับอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ภายในได้มาก และ

ในขณะเดียวกันอากาศก็สามารถแทรกผ่านได้อย่างทั่วถึง ทำให้ Mycelium ของเชื้อราเจริญได้อย่างสม่ำเสมอตลอดทั้งจานเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้ผลิตกรดมะนาวออกมาสูงสุดเมื่อเทียบกับตัวพาชนิดอื่นๆ

เมื่อพิจารณาผลของปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากตัวพาในปริมาณต่างๆกัน พบว่า ฟางข้าว (ท่อนยาว) ในปริมาณสูงสุด (10 กรัมต่อเพลท) ไม่ให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุด เกิดจากปริมาณของฟางข้าวที่มีมากเกินไป ทำให้มีบางส่วนของฟางข้าวไม่ได้ซึมซับอาหารเลี้ยงเชื้อเลย สปอร์ของเชื้อราที่ตกบริเวณนั้นไม่สามารถเจริญได้ และ เมื่อทำการหมักไปได้ระยะหนึ่ง Mycelium ของเชื้อราจะเจริญและพองตัว จนฝาของจานเลี้ยงเชื้อไม่สามารถประกบกันสนิทได้ ทำให้สูญเสียความชื้น สู่ภายนอกอย่างรวดเร็ว ฟางข้าวที่อยู่ด้านข้างจะแห้งสนิท และ ไม่พบการเจริญของเชื้อราบริเวณนั้นเลย

เมื่อนำตัวพา ฟางข้าว (ท่อนยาว) ไปประยุกต์ใช้กับการหมักที่มีสารจำพวกแป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอน พบว่า แป้งที่ถูกซึมซับโดยตัวพาได้ดี เชื้อราจะเจริญได้ดีและให้ปริมาณผลผลิตกรดมะนาวมาก ดังจะเห็นได้จาก Soluble starch ที่ให้ผลผลิตกรดมะนาวดีสุด เป็นแป้งที่ฟางข้าวซึมซับไว้ได้มากที่สุด สังเกตได้จากการที่ปริมาณของแป้งที่เหลือและไหลลงไปอยู่ด้านล่างของจานเลี้ยงเชื้อมีปริมาณน้อยกว่าแป้งชนิดอื่น

นอกจากนั้น จากการพบแอคติวิตี้ของ เอนไซม์ β-Glucosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส ในระหว่างการหมักที่มีแป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอน เป็นการแสดงให้เห็นว่า ภายใต้สภาวะการหมักนี้ มีเซลลูโลสกระจายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่มากพอที่จะเหนี่ยวนำให้ *Aspergillus niger* Yang no.2 มีการผลิตเอนไซม์ β-Glucosidase ได้ ทำให้สามารถอธิบายถึงปริมาณกรดมะนาวที่สูงขึ้น ใน Blank ของตัวพาฟางข้าว ว่าสารต้นตอคาร์บอนที่ *Aspergillus niger* Yang no.2 ใช้ส่วนหนึ่งในการผลิตกรดมะนาว คือ กลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลส

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการสังเกตระหว่างการทดลองพบว่า แป้งที่ใช้มีปริมาณมากเกินไป ตัวพาไม่สามารถซึมซับได้หมด และเมื่อตกลงไปด้านล่างของจานเลี้ยงเชื้อ เมื่ออุณหภูมิลดก็กลายเป็นวุ้นเหนียว ทำให้เชื้อราไม่สามารถนำไปใช้ได้อย่างเต็มที่ หากทำการทดลองเพิ่มเติม โดยลดความเข้มข้นหรือปริมาณของแป้งที่ใช้ คาดว่า %Yield ของกรดมะนาวที่ได้จะเพิ่มมากขึ้น

การวิจัยในครั้งนี้เป็นเป็นการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้เป็นตัวพา โดยใช้สารต้นตอคาร์บอนเติมลงไป หากสามารถใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งมีราคาถูกนี้มาใช้เป็นสารต้นตอคาร์บอนด้วยวิธีการต่างๆไม่ว่าจะเป็น การทำการปรับแต่ง (Pretreat) หรือ การใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่นำมาเจริญร่วมกัน (Co-culture) เพื่อย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรให้เป็นสารต้นตอ

คาร์บอนในการผลิตกรดมะนาว เพื่อให้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรนี้เป็นทั้งตัวพาและสารต้นตอคาร์บอน ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์มากเมื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

อย่างไรก็ตาม การวิจัยครั้งนี้ ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการใช้ตัวพาเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตแบบ Semi–solid culture ที่สามารถประยุกต์ใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสภาวะที่ใช้ในการหมัก (Optimization) และ ต้นทุนในการใช้ตัวพาและสารต้นตอคาร์บอนแต่ละชนิดต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กำเนิด สุภัณวงษ์. (2532). *จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์*. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

กล้าณรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2543). *เทคโนโลยีของแป้ง*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชะไมพร บุตรเรียง. (2541). *อิทธิพลของกระบวนการหมักต่อการผลิตกรดมะนาวโดยใช้เชื้อรา Aspergillus niger*. โครงการวิจัยปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ยุวดี วัฒนโภคาสิน. (2543). *การผลิตกรดมะนาวจากแป้งโดย Protease-negative mutant strain ของ เชื้อรา Aspergillus niger*. กรุงเทพฯ : โครงการวิจัยของภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ.

รักฤดี สารธิมา. (2540). *การผลิตกรดมะนาวจากชานอ้อยที่ผ่านการปรับแต่งแล้วโดยเชื้อรา Aspergillus niger Yang no.2*. โครงการวิจัยปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุจิมา รักษาศีล. (2540). *การผลิตกรดมะนาวจากกากมันสำปะหลังโดยวิธีการหมักแบบกึ่งแข็ง ด้วย mutants ของเชื้อ Aspergillus niger ที่ถูกคัดเลือก*. กรุงเทพฯ : โครงการวิจัยของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมใจ ศิริโภค. (2537). *เทคโนโลยีการหมัก*.กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำนักพิมพ์ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สมศักดิ์ สรั่งบิน. (2541). *การสร้างสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง Aspergillus niger WU-2223L กับ Aspergillus niger usami IAM 2185 โดยการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ เพื่อใช้ในการผลิตกรดมะนาว*. โครงการวิจัยของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

----------. (2542). *การผลิตกรดมะนาวจากวัสดุการเกษตรโดยใช้เชื้อรา Aspergillus niger*. โครงการวิจัยของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Abe, J., Bergmann, F.W., Obata, K., hizukuri, s. (1988). "Production of the raw-starch digesting amylase of *Aspergillus* sp". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21,447

Currie,J.N. (1972). "The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*" . *Biol.chem*.31.15-67

Das, A. (1972). "Strain selection in citric acid fermentation". *Current Sci.* 41,593-596.

Hockenhull, C.J.D. (1960). "process in industrial microbiology".*Intersecene*.2, 169-179

Hossion, M., Brooks, J.D. and Maddox, I.S. (1983). "Production of citric acid from whey peament by fermentation using *Aspergillus* niger". Newzealand *J. Dairy Sci. Technol.* 19,161-168.

Hossian, M., Brooks,J.D. and Maddox, I.S. (1984, March). "The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus* niger". *Appl. Microbiol. Biotechnol. 19, 393-394*

Kirimura, K.,Sarangbin, S.,Rugsaseel, S., Usami, S. (1992, November). "Citric acid production by 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Aspergillus* niger". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,36,573-577.

Kirimura, K., Watanabe, T., Sunsgawa, T., Usami, S. (1999, October). "Citric acid production from xylan and xylan hydrolysate by semi-solid culture of *Aspergillus niger*". *Boisci. Biotechnol. Biochem.*,63(1),226-228.

Miall, L M.(1978*). Organic acid in economic microbiology.* Academic Press, London. 2, 47-119

Prescott, S.C. and Dumm, C.G. (1959) *Industrial Microbiology.* 3rd .ed McGraw-hill Book Comp. Inc., N.Y.,Toronto, London. 533-577.

Rohr, M., Stadler, P.J.,Salzbrunn, W.D.J. and Kubicek, C.P. (1979). "An improved method for characterrization of citrate production by conidia of *Aspergillus niger*". *Biotecnol.* Lett .1.281-286

Rugsaseel, S.,Morikawa, S.,Kirimura, K.,Usami, S. (1995, December). "Stimulation of citric acid production in *Aspergillus niger* by addition of viscous substance in shake culture". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,42,839-843.

Sarangbin, S.,Kirimura, K.,Usami, S. (1994, October). "Citric acid production from cellobiose by 2-deoxyglucose-resistant mutant strain of *Aspergillus niger* in semi-solid culture". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 206-210.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อรา (media)

Czapek-Dox medium

เป็นอาหารสูตรปรับต่ำ (basal minimum medium) สำหรับการเพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อ ปรับ pH ให้เป็น 6.0 ก่อนเติมผงวุ้น (Bacto agar) 20 g/L ลงไปในอาหารก่อนทำการ sterilize

ตาราง 14 แสดงองค์ประกอบของ Czapek-Dox minimum medium (solution)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (g/L)
Glucose	30
$NaNO_3$	2
K_2HPO_4	1
KCl	0.5
$MgSO_4.\ 7H_2O$	0.5
$FeSO_4.7H_2O$	0.01

Synthetic medium for citric acid production in semi-solid culture (SS medium)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการหมักเพื่อให้เกิดกรดมะนาว จะเป็นอาหารสูตรควบคุม กล่าวคือ มีแร่ธาตุบางชนิดในปริมาณที่จำกัด เพื่อทำให้เกิดการผลิดกรดมะนาวได้สูงสุด โดยต้องปรับ pH ของ SS medium ให้เป็น 4.25 ก่อนนำไป sterilize

ตาราง 15 แสดงองค์ประกอบของ SS medium (solution)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (g/L)
C –source (Glucose or Starch)	140
KH_2PO_4	10
NH_4NO_3	2
$MgSO_4.\ 7H_2O$	0.25
$FeCl_3.6H_2O$	0.02

การเตรียมสารละลาย

สารละลายกรด 3,5–ไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS reagent)

กรด 3,5- ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5–Dinitrosalicylic acid)	10	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	16	กรัม
โปแตสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Potassium sodium tartrate)	300	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบข้างต้นเทรวมกันใน refluxtion flask แล้วทำการ reflux เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น เก็บสารละลายที่เตรียมได้ไว้ในขวดสีชา

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 **โมลาร์**

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จะใช้สำหรับไตรเตรทหาความ เข้มข้นของกรดมะนาวใน culture filtrate ซึ่งหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์หาได้โดยการไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน KHP (Potassium hydrogen ptatalate) โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ชั่งกลูโคส 25 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร จะได้กลูโคสที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กราฟมาตรฐานใช้ความเข้มข้นของกลูโคส ในช่วง 100-600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทำกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายกลูโคสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที แล้วนำมาแช่น้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายมนัส สุวามิน
วันเดือนปีเกิด	วันที่ 19 เมษายน 2522
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลรามาธิบดี กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 62 หมู่ 9 ซ.ประชาสำราญ3 ถ.ประชาสำราญ แขวงหนองจอก เขตหนองจอก กรุงเทพฯ 10530

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2539	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนมัธยมวัดหนองจอก
พ.ศ. 2543	การศึกษาบัณฑิต เอกเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2546	การศึกษามหาบัณฑิต เอกเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ