

การศึกษาลักษณะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อผลิตกรดมะนาวด้วย
เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2

ปริญญานิพนธ์
ของ
มาลีณี พูลพิพัฒน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
พฤษภาคม 2548
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

547.033
ม 551ก
ร. 9

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อผลิตกรดมะนาวด้วย
เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2

27 ก.ค. 2548

บทคัดย่อ
ของ
มาลีณี พูลพิพัฒน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
พฤษภาคม 2548

h 219836

มาลีณี พูลพิพัฒน์. (2548). การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 . ปริญญาโท
ก.ม (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร. ธารัตน์คุศิริ, รองศาสตราจารย์
ดร. สมศักดิ์ สรรังสิน, รองศาสตราจารย์ ดร. ยุวดี วัฒนโกศลสิน

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 4 ชนิด คือ แกลบ ฟางข้าว ต้นข้าวโพด และเปลือกสับปะรด ถูกนำมาปรับสภาพ ทั้งทางกายภาพ และทางเคมี โดยกรดและเบส 6 ชนิดได้แก่ Acetic acid, Hydrochloric acid, Phosphoric acid, Sulfuric acid, Sodium hydroxide, Potassium hydroxide เป็นเวลา 1 7 14 21 และ 28 วัน ที่ความเข้มข้น 2 M เพื่อให้เหมาะสมต่อการเป็นสารตั้งต้นคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 โดยการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SS medium ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เปลือกสับปะรด ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด Acetic acid เป็นเวลา 7 วัน จะถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณมากกว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดอื่นๆ คือได้น้ำตาลรีดิวซ์ 77.5 g/L ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่ได้จากการทดลอง สำหรับ แกลบ ฟางข้าว และต้นข้าวโพด จะได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเมื่อผ่านการปรับสภาพด้วยกรดหรือเบสในช่วงเวลา 1-14 วัน

จากการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-เบสตามระยะเวลา ที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด มาหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้องพบว่า เปลือกสับปะรด (5 g) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วย Sodium hydroxide เป็นเวลา 7 วัน ให้กรดมะนาวสูงสุดคือ 17.67 g/L ทั้งนี้ ประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพจะมีค่ามากกว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีค่าสูงสุดในวันที่ 1 ของการหมักและมีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไป

STUDY OF OPTIMUM CONDITION FOR PRETREATMENT OF AGRICULTURAL CROP
RESIDUE FOR CITRIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus niger* Yang No.2

AN ABSTRACT
BY
KASINEE POOLPIPAT

Presented in partial of the requirements
for the Master of Education degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University
May 2005

Kasinee Poolpipat. (2005). *Study of optimum condition for pretreatment of agricultural crop residue for citric acid production by Aspergillus niger Yang no.2*. 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 (Rice straw, Bagasse, Corn and Pineapple shell) were pretreated with 2 M acid or base (Acetic acid, Hydrochloric acid, Phosphoric acid, Sulfuric acid, Sodium hydroxide and Potassium hydroxide) for 1, 7, 14, 21 and 28 days at room temperature to determine the optimized conditions for carbon source pretreatment for citric acid production by *Aspergillus niger* Yang no.2 upon culturing in SS medium. It was found that pineapple shell pretreated with acetic acid for 7 days provided the highest reducing sugar at 77.5 g/L as compared to other produced agriculture crops. The reducing sugar released from rice straw, bagasse and corn were between 8.8 – 76.2 g/L, at the period of 1-14 days depended on the type of the crops.

Upon fermentation each kind of the pretreated agriculture crop that gave the highest amount of reducing sugar with *Aspergillus niger* Yang no.2 for 7 days at room temperature, the result showed that pineapple shell (5 g) pretreated with sodium hydroxide for 7 days gave the highest amount of citric acid at 17.67 g/L. The efficiency of citric acid production by *Aspergillus niger* Yang no.2 using pretreated agriculture crop was higher than those obtained from the non - treated ones. The highest amount of reducing sugar in the culture filtrate was found on the first day of the fermentation and gradually decreased as the time went by.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาลักษณะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อผลิตกรดมะนาวด้วย
เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2

ของ

นางสาวมาลีณี พูลพิพัฒน์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศิริ จีระเดชากุล)

วันที่ ๔๐ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2548

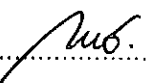
คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน

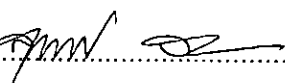
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธารวรัตน์ ศุภศิริ)

.....กรรมการ

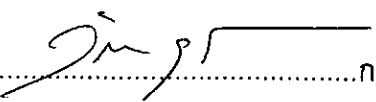
(รองศาสตราจารย์ ดร. ยุวดี วัฒนโกศาสิน)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ สว่างสิน)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนະกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(อาจารย์ ดร. วลัยยา อุทัยสง)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความเมตตากรุณา การให้ช่วยเหลือ ให้ความรู้ คำปรึกษาและคำแนะนำอย่างดียิ่ง จากอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ทั้ง 3 ท่าน คือ รศ.ดร.ธารวรัตน์ ศุภศิริ รศ.ดร.ยุวดี วัฒนโกศาติน และรศ.ดร.สมศักดิ์ สว่างบิน ซึ่งข้าพเจ้า ลำนึกในพระคุณของท่านเป็นอย่างยิ่ง ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ได้ช่วย สั่งสอนให้ความรู้ ความเมตตา และเอื้อเฟื้อในด้านต่างๆ เป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุนันท์ ชัยนะกุล และดร.วัลยา อุทัยสง ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบให้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่อำนวยความสะดวกในการ ใช้ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และสารเคมีระหว่างทำวิจัย

ขอบคุณเพื่อนร่วมรุ่น มนัส สุวามิน ประนิดฎา พิมพ์สี สมณรัตน์ จันทรขาว ที่เป็น กำลังใจ คอยให้คำปรึกษา และ ช่วยเหลือกันตลอดมา ขอขอบคุณคุณวุฒิดี วรศิลป์ชัย ที่ให้ ความกรุณาด้านคอมพิวเตอร์ อีกทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ภาควิชาเคมี ทุกคน สำหรับน้ำใจไมตรี และ ความปรารถนาดีที่มีให้

ผู้ให้ความกรุณาสันับสนุนเกี่ยวกับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทั้ง แกลบ ฟางข้าว ต้น ข้าวโพด และเปลือกสับปะรด แม้ว่าเป็นสิ่งเล็กน้อย แต่มีความสำคัญอย่างยิ่งในงานวิจัยชิ้นนี้

ท้ายสุดนี้ ข้าพเจ้าขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดามารดา ซึ่งให้มาซึ่งความรัก ความเข้าใจ ความเอาใจใส่ ความอบอุ่น และทุนการศึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจอันยิ่งใหญ่ของข้าพเจ้ามา โดยตลอด

มาลีณี พูลพิพัฒน์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
ความสำคัญของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ส่วนประกอบหลักของพืช	4
กระบวนการผลิตกรดมะนาว	6
การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment).....	7
การย่อยหรือการทำไฮโดรไลซิส (Hydrolysis).....	8
การหมัก (Fermentation)	10
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว.....	11
การคัดเลือกพันธุ์.....	11
สัญญาณวิทยาของเชื้อรา.....	12
หลักทั่วไปในการเก็บรักษาและเตรียมเชื้อจุลินทรีย์.....	14
ลักษณะของเชื้อราสายพันธุ์ <i>Aspergillus niger</i>	15
ชีวเคมีการผลิตกรดมะนาว	17
ปัจจัยที่ควบคุมอัตราการหมัก	18
แหล่งคาร์บอน (Carbon sources).....	21
การเก็บเกี่ยวผลผลิต	21
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22

สารบัญ(ต่อ)

บทที่		หน้า
3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
	วัสดุอุปกรณ์.....	24
	สารเคมี.....	24
	ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	25
	การเตรียมและเก็บรักษาหัวเชื้อ.....	26
	กระบวนการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร.....	26
	การเตรียมเซลล์ลูไลโซโดรไลสด้วยวิธี Enzymatic hydrolysis.....	28
	การหมักกรดมะนาวด้วยสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งแข็ง	
	โดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพ.....	29
	การหาปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลรีดิวซ์.....	29
4	ผลการวิจัย.....	31
	วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพ.....	31
	ผลการหาค่าน้ำตาลรีดิวซ์ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร.....	36
	ผลการทดลองการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในการหมักกรดมะนาว.....	43
	ผลการวัดค่าน้ำตาลรีดิวซ์ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	
	ที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i> Yang no. 2.....	47
5	สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	51
	สรุปผลการทดลอง.....	51
	อภิปรายผลการทดลอง.....	52
	ข้อเสนอแนะ.....	54
	บรรณานุกรม.....	55
	ภาคผนวก.....	59

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	69

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงสุดจากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพ	51
2 Czapek-Dox medium	60
3 SS Medium (Solution).....	60
4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวัสดุปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริก.....	62
5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวัสดุปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก.....	62
6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวัสดุปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก.....	62
7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวัสดุปรับสภาพด้วยกรดอะซิติก.....	63
8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวัสดุปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์.....	63
9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวัสดุปรับสภาพด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์.....	63
10 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการหมักแกลบ (g/L).....	64
11 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการหมักฟางข้าว (g/L).....	64
12 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการหมักต้นข้าวโพด (g/L).....	65
13 ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการหมักเปลือกสับปะรด (g/L).....	65
14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้แกลบเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน.....	66
15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน.....	66
16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้ต้นข้าวโพดเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน.....	67
17 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้เปลือกสับปะรดเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน.....	67

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว (Citric acid).....	1
2 แผนภาพเส้นใยธรรมชาติ.....	4
3 โครงสร้างของเซลลูโลส.....	5
4 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส.....	5
5 โครงสร้างมอนอเมอร์ของลิกนิน.....	6
6 ลักษณะโครงสร้างของลิกนิน.....	6
7 ลำดับการเข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส	10
8 ลักษณะของยีสต์.....	13
9 ราสายมีผนังกัน.....	14
10 Colony ของ <i>Aspergillus niger</i>	16
11 สปอร์ ของ <i>Aspergillus niger</i>	16
12 Tricarboxylic acid cycle.....	18
13 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	25
14 แกลบ.....	26
15 ฟางข้าว.....	27
16 ต้นข้าวโพดสด.....	27
17 เปลือกสับปะรดสด.....	28
18 แกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด และผ่านการอบแห้ง.....	31
19 แกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส และผ่านการอบแห้ง.....	32
20 ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด และผ่านการอบแห้ง.....	32
21 ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส และผ่านการอบแห้ง.....	33
22 ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด และผ่านการอบแห้ง.....	33
23 ต้นข้าวโพดที่ป่มด้วยเบส.....	34
24 ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส และผ่านการอบแห้ง.....	34
25 เปลือกสับปะรดที่ป่มด้วยกรด.....	35
26 เปลือกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด และผ่านการอบแห้ง.....	35
27 เปลือกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส และผ่านการอบแห้ง.....	36

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

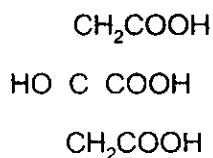
ภาพประกอบ	หน้า
28 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยกรดไฮโดรคลอริก.....	37
29 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยกรดซัลฟูริก.....	38
30 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยกรดฟอสฟอริก.....	39
31 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยกรดอะซิติก.....	40
32 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์.....	41
33 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์.....	42
34 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตโดยมีแกลบเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน.....	43
35 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตโดยมีฟางข้าวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน.....	44
36 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตโดยมีต้นข้าวโพดเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน.....	45
37 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตโดยมีเปลือกสับปะรด เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน.....	46
38 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อใช้แกลบในการหมัก.....	47
39 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อใช้ฟางข้าวในการหมัก.....	48
40 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อใช้ต้นข้าวโพดในการหมัก.....	49
41 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อใช้เปลือกสับปะรดในการหมัก.....	50
42 กราฟกลูโคสมาตรฐาน.....	68

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ภูมิหลัง

กรดมะนาว (Citric acid) มีชื่อทางเคมีว่า β -hydroxy tricarboxylic acid หรือ 2-hydroxy-1,2,3-propane tricarboxylic acid มีสูตรเคมีเป็น $C_6H_8O_7$ ดังแสดงในภาพประกอบ 1 กรดมะนาวในรูป Anhydrous จะมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ $153^\circ C$ ส่วน Monohydrate จะมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ $100^\circ C$



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว (Citric acid)

กรดมะนาวเป็นสารที่มีรสเปรี้ยว กลิ่นหอม และมีความเป็นพิษต่ำ จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อุตสาหกรรมอาหารและยา ซึ่งมีประโยชน์หลายประการ ดังต่อไปนี้

- ใช้ในการปรับปรุงสภาพความเป็นกรดของอาหาร เช่น ในน้ำผลไม้ ลูกอม และอาหารที่ต้องการรสเปรี้ยวอื่นๆ

- กรดมะนาวสามารถป้องกันการเน่าเสียของอาหารและยาประเภทน้ำเชื่อมเข้มข้น

- ป้องกันการขึ้นเนื่องจากการตกตะกอนของไวน์

- ใช้เป็นสารกันหืนในผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ

- ใช้ผสมในตัวยาบางชนิด เพื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่าง

ด้วยประโยชน์มากมายดังกล่าว ทำให้กรดมะนาวที่ได้จากกระบวนการสกัดจากผลไม้รสเปรี้ยวไม่เพียงพอต่อความต้องการ เพื่อตอบสนองความต้องการในการใช้กรดมะนาว จึงมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อหากระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาว ให้การผลิตมีประสิทธิภาพสูง

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่า การผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม ด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีได้ผลไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรีย จากการศึกษาการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า เชื้อรา *Aspergillus niger* เป็นราที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม

(กำเนิด สุภักธวงศ์. 2532 : 69) เพราะการปฏิบัติงานในกระบวนการผลิตสามารถทำได้ง่าย ใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก ผลผลิตที่ได้มีความคงตัวและมีปริมาณสูง

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม จึงมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (Agricultural crop residue) มาก หากสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ จะเพิ่มค่าให้วัสดุเหลือใช้ เพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร และยังสามารถลดปัญหามลภาวะหรือขยะจากการเกษตร เนื่องด้วยวัสดุทางการเกษตร มีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส ซึ่งมีหน่วยย่อยเป็นกลูโคส และจากงานวิจัยหลายฉบับทำให้พบว่า มีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นสารต้นตอของคาร์บอนในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ วัสดุเหลือใช้เหล่านั้นเมื่อนำมาปรับสภาพเพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยกระบวนการต่างๆ เช่น การปรับสภาพด้วยกรด เบส ไอ้ น้ำ หรือเอนไซม์ เพื่อให้วัสดุเหล่านั้นถูกย่อยให้เป็นสารที่มีโครงสร้างที่เหมาะสมเป็นสารต้นตอในการผลิตกรดมะนาว จะทำให้ต้นทุนการผลิตกรดมะนาวต่ำลง

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการที่จะหาสภาวะของการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยกรดและเบส เพื่อนำไปใช้เป็นสารต้นตอคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no. 2 ในการเลี้ยงแบบ Semi-solid culture เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม

1.2 ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้ Acetic acid, Hydrochloric acid, Phosphoric acid, Sulfuric acid, Sodium hydroxide, Potassium hydroxide เพื่อปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

1.2.2 ศึกษาผลของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยเซลลูโลสที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยกรด และเบส

1.2.3 ศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ที่ได้จากข้อ 1.2.1 และ 1.2.2 โดยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบ Semi-solid culture

1.3 ความสำคัญของงานวิจัย

1.3.1 ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวให้สูงขึ้น ทั้งยังสามารถลดต้นทุนการผลิตได้

1.3.2 ผลที่ได้เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม

1.3.3 ลดจำนวนกรดมะนาวนำเข้าจากต่างประเทศ

1.3.4 ลดปริมาณขยะจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 เตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ แกลบ ต้นข้าวโพด ฟางข้าว และเปลือกสับปะรด เพื่อใช้ในการผลิตกรดมะนาว โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2

1.4.2 การปรับสภาพ (Pretreatment) วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ทำโดยวิธีทางกายภาพ ร่วมกับการใช้เทคนิค Acid treatment และ Alkali treatment

1.4.3 ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการไฮโดรไลส์วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ปรับสภาพแล้ว

1.4.4 ผลิตกรดมะนาวจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ปรับสภาพ โดยกระบวนการหมักแบบ Semi-solid culture ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

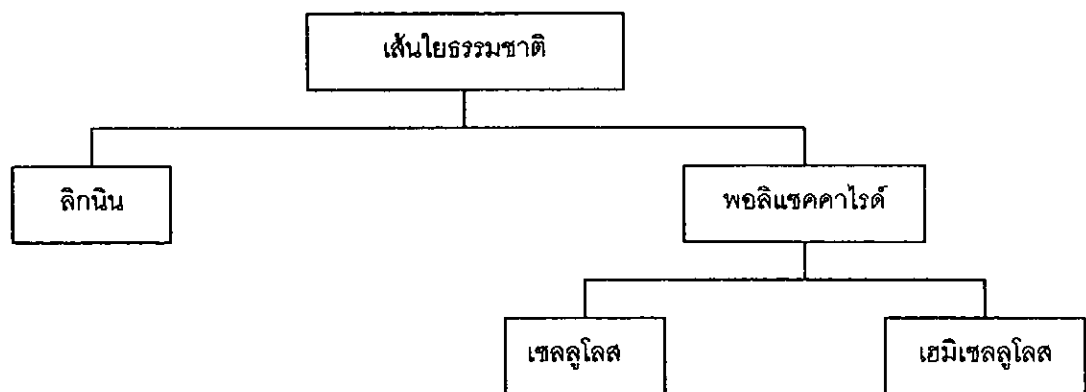
การปรับสภาพ (Pretreatment) หมายถึง การทำให้วัสดุมี ขนาด รูปแบบ และโครงสร้างที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการขั้นตอนต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ส่วนประกอบหลักของพืช

สารต้นตอของกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาว ส่วนใหญ่จะได้จากเซลลูโลส ซึ่งเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักอย่างหนึ่งของพืช รวมเรียกองค์ประกอบเหล่านี้ว่า เส้นใยธรรมชาติ (Natural fiber) (ภาพประกอบ 2)

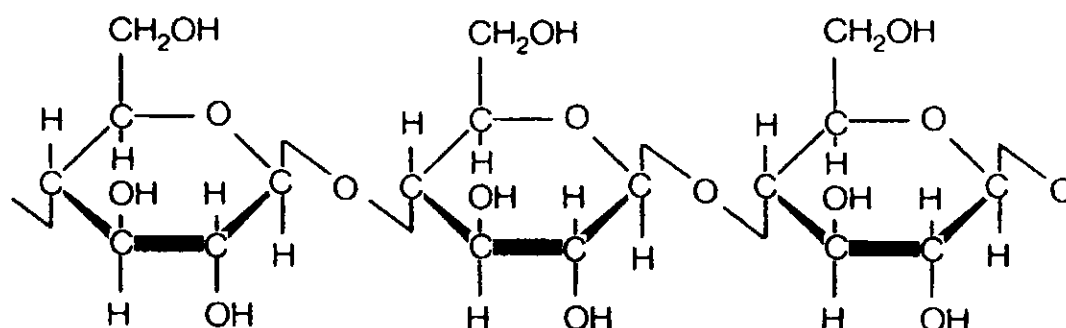


ภาพประกอบ 2 แผนภาพเส้นใยธรรมชาติ

เส้นใยธรรมชาติ เป็นอินทรีย์วัสดุที่สำคัญ หาได้ง่ายจากธรรมชาติ มีปริมาณมาก สามารถเกิดขึ้นได้ใหม่เรื่อยๆ และมีราคาถูกกว่าเส้นใยสังเคราะห์ จากการศึกษาพบว่า เส้นใยธรรมชาติจากพืชมีโครงสร้างโดยทั่วไปประกอบด้วยเซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin)

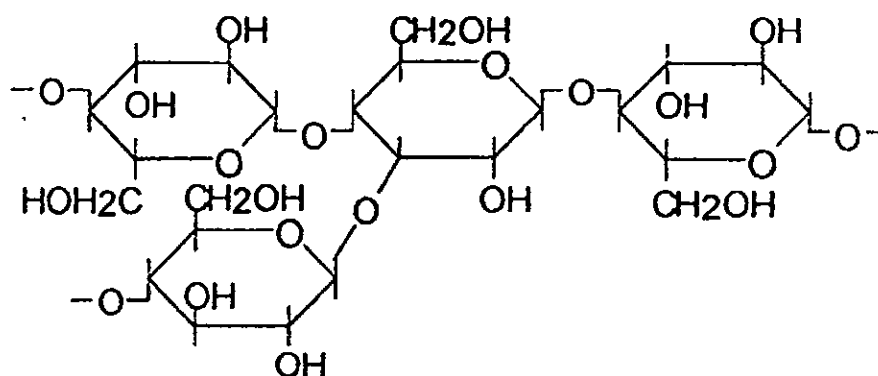
2.1.1 เซลลูโลส เป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides) เชิงเส้นประกอบด้วยโมเลกุลที่ต่อกันเป็นโซ่ยาวของกลูโคสซึ่งจะต่อกันด้วยพันธะ β -(1, 4) ไกลโคซิดิก (ภาพประกอบ 3) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ $(C_6H_{12}O_6)_n$ เป็นโครงสร้างในเนื้อเยื่อพืช โดยพบรวมกับลิกนิน

เซลลูโลสมีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ จึงสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสจึงมีมาก และโครงสร้างของเซลลูโลสยังจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ มักจะเกิดการสลายตัวก่อนถึงอุณหภูมิหลอมตัว และมีความสามารถในการละลายต่ำ เซลลูโลสธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่างกัน



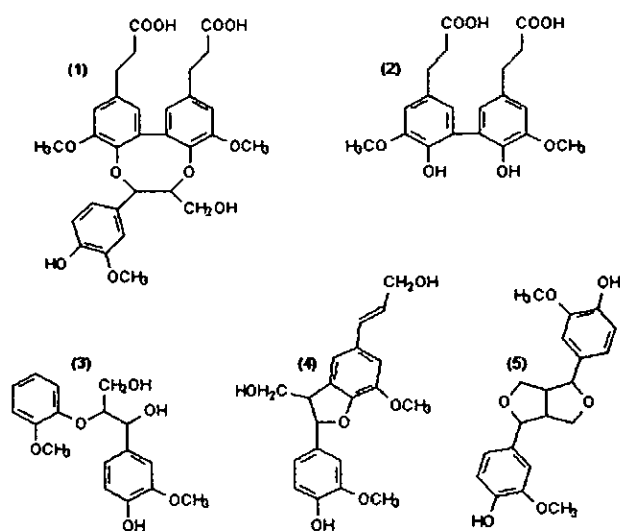
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของเซลลูโลส

2.1.2 **เฮมิเซลลูโลส** เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งซึ่งคล้ายเซลลูโลส แต่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด เช่น กลูโคส กาแลกโตส ต่อกันด้วยพันธะ β -(1, 6) ไกลโคซิดิก (ภาพประกอบ 4) เฮมิเซลลูโลสพบในเนื้อเยื่อของพืชโดยรวมอยู่กับสารอื่นๆ เช่น ลิกนิน และเซลลูโลส เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ พบมากในแกลบ ชังข้าวโพด สูตรทางเคมีของเฮมิเซลลูโลสคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$

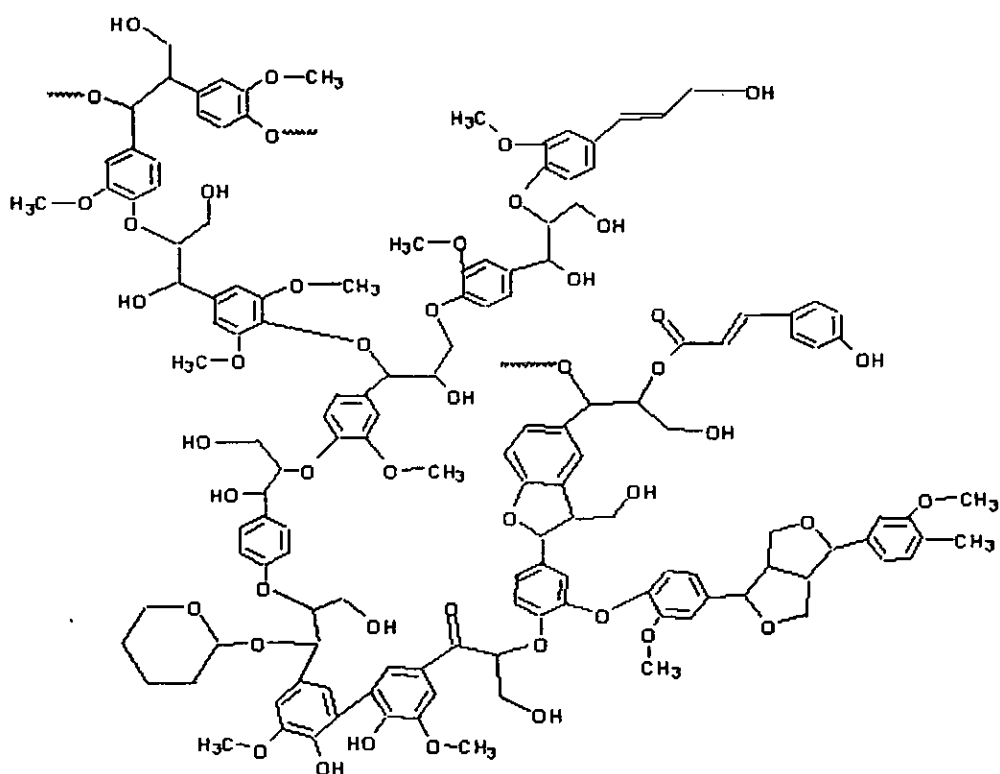


ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

2.1.3 **ลิกนิน** เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่ร่วมกับเซลลูโลส ลิกนินเป็นสารที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอะโรมาติก ลิกนินไม่ละลายน้ำ ไม่มีสมบัติของการยืดหยุ่น เพราะฉะนั้นจึงทำให้พืชที่มีลิกนินในปริมาณมาก มีความแข็งแรงทนทานมากเช่นกัน (ภาพประกอบ 5, 6)



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างมอนอเมอร์ของลิกนิน



ภาพประกอบ 6 ลักษณะโครงสร้างของลิกนิน

2.2 กระบวนการผลิตกรดมะนาว

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มักจะประกอบด้วย 3 ส่วนใหญ่ๆ คือ คาร์โบไฮเดรต ทั้งในรูปที่ย่อยสลายง่าย และย่อยสลายยาก ลิกนิน และสารประกอบไนโตรเจน

โดยน้ำตาล แป้ง กรดอะมิโน โปรตีน และสารอินทรีย์ในโตรเจน เป็นองค์ประกอบที่ถูกย่อยสลายได้ง่าย ส่วนเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส จะถูกย่อยสลายอันดับต่อมา สำหรับลิกนินนั้นจะทนทานต่อการย่อยสลาย แต่สามารถแยกลิกนินออกจากเส้นใยธรรมชาติได้ด้วยกระบวนการปรับสภาพ จึงต้องทำการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรก่อน เพื่อกำจัดลิกนินออกจากผิวของวัสดุเหล่านั้น การเข้าทำงานของเอนไซม์จึงจะเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กระบวนการผลิตกรดมะนาวจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร จึงมีกระบวนการสำคัญดังต่อไปนี้

- 2.2.1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)
- 2.2.2 การย่อยสลาย (Hydrolysis)
- 2.2.3 การผลิตกรดมะนาว (Citric acid production)
- 2.2.4 การวิเคราะห์ผลการทดลอง (Analysis)

2.3 การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

วัตถุดิบที่จะนำมาเป็นสารตั้งต้นของกระบวนการหมัก เพื่อผลิตกรดมะนาวคือเซลลูโลส ซึ่งสามารถหาได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น แกลบ ต้นข้าวโพดสด ฟางข้าว และเปลือกสับปะรด ซึ่งในธรรมชาติ การเสื่อมสภาพของเซลลูโลสเกิดได้ช้า เนื่องจากมีสิ่งกีดขวาง คือเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส จึงต้องแยกลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อน

การแยกลิกนินออกไป จะทำให้เอนไซม์เซลลูเลส สามารถย่อยเซลลูโลสออกจากวัสดุเหล่านั้นให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ง่ายขึ้น น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น จะเป็นสารตั้งต้นคาร์บอนที่สำคัญของกระบวนการหมักต่อไป การมีลิกนินจำนวนมากจะทำให้การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเป็นไปอย่างไม่มีประสิทธิภาพ และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมักอีกด้วย

วิธีปรับสภาพวัตถุดิบมี 4 วิธีคือ

2.3.1 วิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment) เป็นการปรับสภาพ โดยการลดขนาดของวัตถุดิบ เพื่อให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออก ทำให้พื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เช่น การหั่น การบด และการให้ความร้อน

บราวเนลล์ และแซดเลอร์ (Brownell ;& Saddler. 1987 : 228-235) ได้ศึกษาการปรับสภาพไม้เนื้อแข็ง โดยใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 175–250°C ในช่วงเวลา 30-60 วินาที แล้วลดความดันลงอย่างรวดเร็ว วัตถุดิบจะแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ วิธีนี้สามารถแยกเซลลูโลสออกจากเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้ถึง 90% เรียกว่า Steam pretreatment หรือ Steam explosion

2.3.2 วิธีทางเคมี (Chemical pretreatment) เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบ โดยใช้สารละลายกรด เบส ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารออกซิแดนท์ ในกรณีการใช้สารละลายกรดจะเพิ่มความ

สามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลส โดยเฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยได้ดีกว่าเซลลูโลส ส่วนสารละลายเบส จะทำให้เฮมิเซลลูโลสและลิกนินเกิดการบวม (Swelling)

ฮามิลตัน ;และคณะ (Hamilton ;and other. 1984 : 781-787) ทดลองนำเอาวัสดุเหลือใช้ จากอุตสาหกรรมข้าวโพด ที่กำจัดเฮมิเซลลูโลสออกแล้ว มาปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.5 M ร่วมกับสารประกอบเชิงซ้อนเฟอร์ริกโซเดียมทาร์เทรต (Ferric sodium tartrate complex) แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าปริมาณการย่อยเพิ่มขึ้น 2-3 เท่า เทียบกับวัตถุดิบที่ยังไม่ได้ปรับสภาพ และสามารถย่อยได้ถึง 90 % ในเวลา 24 ชั่วโมง

โดเนเฟอร์ เอเดเลเฟ และโจนส์ (Doneffer, Adelefe & Jones. 1996 : 328-342) ศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในการปรับสภาพอยู่ในช่วง 8-10 % โดยจะทำให้ฟางข้าวถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีขึ้น และประสิทธิภาพของการย่อยจะลดลงเมื่อความเข้มข้นต่ำกว่าระดับนี้

2.3.3 **วิธีทางเคมีฟิสิกส์ (Physico-chemical pretreatment)** เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบ โดยใช้วิธีทางกายภาพรวมกับการใช้สารเคมี ซึ่ง ฮาน ;และคาลิฮาน (Han ;& Callihan. 1974 : 159-165) ศึกษาการปรับสภาพฟางข้าว โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กับความร้อนภายใต้ความดันสูง พบว่าประสิทธิภาพการย่อยฟางข้าวโดยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อน แต่เมื่อใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูงเพียงอย่างเดียวพบว่าประสิทธิภาพของการย่อยลดลง

2.3.4 **วิธีทางชีวภาพ (Biological pretreatment)** เป็นการใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของวัสดุทางการเกษตร ให้เหลือแต่เซลลูโลสในรูปโซ่ตรง ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เหมาะสมจะนำไปเป็นสารตั้งต้นต่อการหมักต่อไป แต่วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากมีค่าใช้จ่ายที่สูง และมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร เพราะโครงสร้างผิวนอกของพืชจะเคลือบด้วยลิกนิน ซึ่งยากต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

2.4 การย่อยหรือการทำไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

การย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ จะทำให้สามารถตรวจวัดได้ว่ามีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ในการผลิตกรดมะนาวหรือไม่ การย่อยเซลลูโลสทำได้ 2 วิธี คือ

2.4.1 **การย่อยด้วยสารเคมี (Chemical hydrolysis)** เป็นการย่อยด้วยสารละลายกรดหรือสารละลายเบส ซึ่งจะเกิดการทำลายพันธะไกลโคซิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจน ถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคส การย่อยด้วยสารเคมีแบ่งตามวิธีของ พาควอต ;และคณะ (Paquat ;and other. 1984 : 442-450) ได้ 2 วิธีคือ

2.4.1.1 การย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis) กระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่นกรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟิวริก จะได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่มีข้อเสียคือ การแยกกรดที่ใช้ออกจากน้ำตาลนั้นทำได้ยาก และเกิดการผุกร่อนของเครื่องมือ ส่วนกระบวนการที่ใช้กรดอ่อนกว่าจะต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่า 180°C ซึ่งเซลลูโลสที่ได้ จะยังคงมีโครงสร้างเป็นเส้นใยอยู่

2.4.1.2 การย่อยด้วยเบส (Alkaline hydrolysis) จะทำให้สายของโพลีแซคคาไรด์สั้นลง โดยปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิสูงประมาณ $160-180^{\circ}\text{C}$ และต้องใช้ออกซิเจนเข้าร่วมในปฏิกิริยาการย่อย

2.4.2 การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzyme hydrolysis) เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาหนึ่งๆ เท่านั้น เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) เป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่นรา และแบคทีเรีย ผลจากการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จะได้น้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้น
วิธีทางชีวภาพนี้เป็นวิธีที่นิยม เพราะมีความจำเพาะสูง

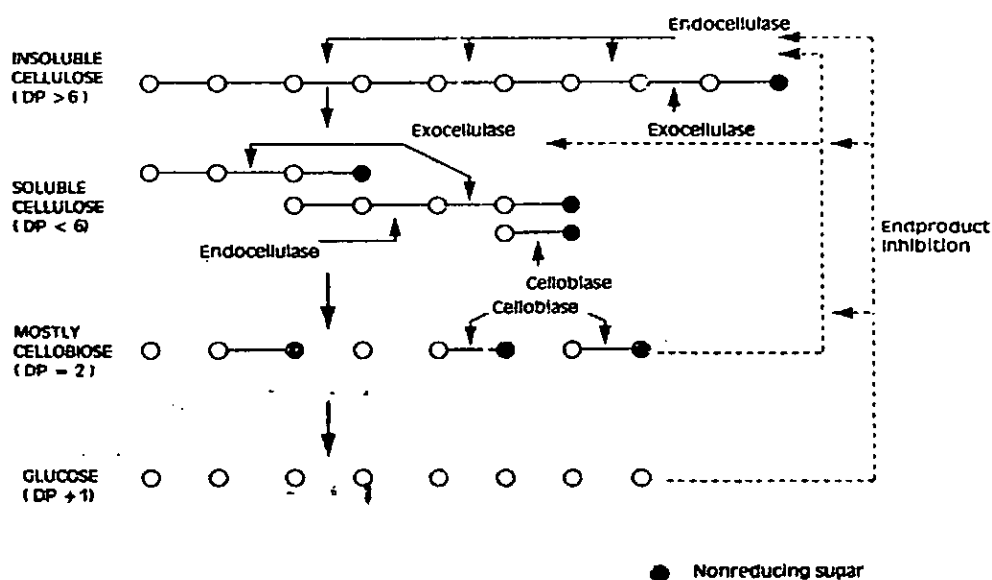
เอนไซม์ที่ใช้ย่อยเซลลูโลสได้แก่เอนไซม์เซลลูเลส กระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสในธรรมชาติเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อเซลลูโลส โดยจะย่อยพันธะ β -(1, 4) ไกลโคซิดิก ของเซลลูโลส โดยใช้ระบบเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน

จากการศึกษาโดยการแยกและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาระบบเอนไซม์พบว่า เซลลูเลสเป็น Multicomponent enzyme มีระบบเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดมาทำงานร่วมกัน (ภาพประกอบ 7)

2.4.2.1 Endo-cellulase [$1,4\text{-}\beta\text{-D-Glucan 4-glucanohydrolase}$ (EC 3.2.1.4)] การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ จะทำหน้าที่ตัดพันธะ β -(1, 4) Glycosidic แบบสุ่มจากด้านใน (Endo-splitting enzyme) สายเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ กลูโคส และเซลโลไบโอส โดยจะได้เซลโลไบโอสเป็นหลัก

2.4.2.2 Exo-cellulase [$1,4\text{-}\beta\text{-D-Glucan cellobiohydrolase}$ (EC 3.2.1.91)] การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ จะทำหน้าที่ตัดพันธะ β -(1, 4) Glucosidic ของเซลลูโลสจากด้านนอก (Exo-splitting enzyme) โดยจะย่อยด้านที่เป็นปลายนอนรีดิวซิง (Non-reducing end) ของสายเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ กลูโคส และเซลโลไบโอส

2.4.2.3 β -Glucosidase [$\beta\text{-D-Glucosidase glucanohydrolase}$ (EC 3.2.1.21)] พบได้ในพืชและจุลินทรีย์หลายชนิด ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยพันธะ β -(1, 4) Glucosidic ของเซลโลไบโอส ได้ D-Glucose โดยกลูโคสที่ได้จากการย่อยโดยเอนไซม์ β -Glucosidase จะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นต่อการผลิตกรดมะนาวต่อไป



ภาพประกอบ 7 ลำดับการเข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส

2.5 การหมัก (Fermentation)

เป็นการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่นกรดอะมิโน น้ำส้มสายชู เอทานอล และกรดมะนาว โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมกรดมะนาวได้ดีมีหลายชนิดทั้งรา และ ยีสต์ จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณสูงและนิยมใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมคือ *Aspergillus niger*

2.5.1 ลักษณะอาหารที่ใช้ในการหมักมี 3 ชนิด ได้แก่

2.5.1.1 การหมักในสภาพอาหารแข็ง (Solid-state culture condition) อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อลักษณะเป็นของแข็ง

2.5.1.2 การหมักในสภาพอาหารเหลว (Submerged culture condition) อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อลักษณะเป็นของเหลว

2.5.1.3 การหมักในสภาพอาหารกึ่งแข็ง (Semi-solid culture condition) อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อลักษณะเป็นทั้งของแข็งและของเหลวผสมกัน

การเลือกใช้สภาพอาหารที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ วัสดุที่นำมาใช้ในการหมัก และราคาต้นทุน

2.5.2 การหมักในอุตสาหกรรมโดยเชื้อจุลินทรีย์ นิยมทำ 3 รูปแบบ คือ

2.5.2.1 Surface fermentation เป็นวิธีแรกของการหมักระดับอุตสาหกรรม โดยจะปรับสภาพกากน้ำตาลให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และใส่สารเคมีที่ช่วยในการหมัก จากนั้นนำเชื้อแล้วนำมาใส่ถาดอลูมิเนียมหรือสแตนเลส และทำการพ่นเชื้อ *Aspergillus niger*

2.5.2.2 Submerged fermentation วิธีนี้พัฒนามาจากวิธีแรกคือ จะทำการหมักในถังหมัก (Fermentors) ขนาดใหญ่แทนการหมักโดยการใส่ถาด จะผ่านเชื้อ *Aspergillus niger* เข้าไปผสมในถังหมัก ซึ่งมีการกวนตลอดเวลา ต้องควบคุมการหมักโดยการป้อนอากาศที่ฆ่าเชื้อแล้ว และปรับอุณหภูมิให้เหมาะสม การหมักวิธีนี้ส่วนใหญ่จะให้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ แต่ปัจจุบันเริ่มมีการพัฒนาการหมักโดยตรงจากแป้ง

2.5.2.3 Solid fermentation การหมักวิธีนี้มักใช้วัตถุดิบเป็นกากมัน ในปริมาณที่จะให้ผลผลิตที่คุ้มค่า การควบคุมการหมักจะลำบากกว่าสองวิธีแรก แต่มีผลดีคือ สามารถนำวัตถุดิบที่เหลือใช้จากการแปรรูปอุตสาหกรรมต่างๆ มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดมะนาว ซึ่งวิธีนี้จะเป็นวิธีที่ช่วยลดต้นทุนในการผลิตที่มีคุณภาพที่สุด

2.6 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้ในการผลิตกรดมะนาวได้ เช่น เชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรีย ในปี 1917 ได้มีการ ผลิตกรดมะนาวเป็นครั้งแรกโดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง โดยทำการวิจัยและพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* ควบคู่ไปกับการพัฒนาวิธีการผลิตกรดมะนาว

ในสหรัฐอเมริกา ก่อนปี 1923 กรดมะนาวส่วนใหญ่ต้องสั่งซื้อมาจากอิตาลี ซึ่งเป็นกรดมะนาวที่สกัดมาจากผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว ซึ่งได้ผลผลิตต่ำและราคาสูง ต่อมาสหรัฐอเมริกาได้ตั้งโรงงานผลิตกรดมะนาว จากการหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* จนในปัจจุบันสามารถผลิตได้ปีละมากกว่า 20 ล้านปอนด์ และใช้อย่างกว้างขวางในวงการผลิตกรดมะนาว ทำให้มีการใช้เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* จนกระทั่งปัจจุบัน

2.7 การคัดเลือกพันธุ์

การวิจัยที่ดำเนินการทางด้านนี้ ส่วนใหญ่จะเน้นถึงจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารประกอบจำพวกเซลลูโลส ทั้งนี้เพราะว่าเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักที่มีอยู่ในพืชถึง 30-60% (โดยน้ำหนัก) และยังเป็นสารประกอบที่ค่อนข้างย่อยสลายได้ยาก เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อน และมีจุลินทรีย์น้อยชนิดที่สามารถจะผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยสลายเซลลูโลสดังกล่าว (Alexander, 1977:467) การย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการ

เกษตร เกิดขึ้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์หลายชนิด เชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus niger* และเมื่อเกิดกระบวนการย่อยสลายปริมาณของเชื้อราเหล่านี้ จะเพิ่มขึ้นจาก 10^5 เป็น 10^6 - 10^9 โคโลนีต่อวัสดุ 1 g เชื้อราที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37°C และการเติมสารประกอบไนโตรเจน ในวัสดุประเภทเซลลูโลส จะทำให้เชื้อราเหล่านี้เพิ่มอัตราการย่อยสลายมากขึ้นด้วย (พิทยากร ลิ้มทอง. 2004)

การคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลส มีความสำคัญต่อการหมัก *Aspergillus niger* ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักในปัจจุบันเป็นเชื้อราที่ถูกทำให้กลายพันธุ์โดยใช้กรรมวิธีและสารเคมีต่างๆ เพื่อให้สามารถสร้างกรดอะมิโนออกมาได้มากขึ้น แต่การรักษาประสิทธิภาพในการผลิตกรดของเชื้อให้คงที่นั้นเป็นเรื่องลำบาก จึงมักพบเสมอว่า เชื้อราที่เพาะจากสปอร์ที่เก็บไว้นานเกินไปนั้นจะผลิตกรดอะมิโนออกมาได้น้อย ซึ่งเหตุผลของเรื่องนี้ยังไม่แน่ชัด วิธีแก้อย่างหนึ่งคือทำการถ่ายเชื้ออย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ รอห์ ;และคณะ (Rohr ;and other. 1976) ได้เสนอแนะวิธีคัดเลือกพันธุ์ *Aspergillus niger* ที่ให้ผลผลิตสูงโดยทำการเพาะสปอร์เดี่ยวๆ ของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 115 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจหาปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้น โดยพ่นด้วยสารละลายของ *p*-Dimethylaminobenzaldehyde ที่มีความเข้มข้น 4% ซึ่งละลายอยู่ใน Acetic acid anhydride ให้ความร้อนที่ 140°C เป็นเวลา 1 นาที ถ้ามีกรดอะมิโนอยู่จะเกิดสีม่วงขึ้น (สามารถตรวจพบกรดอะมิโนที่ปริมาณ 1 ไมโครกรัมได้) และปฏิกริยานี้จำเพาะต่อกรดอะมิโนเท่านั้น โดยกรดแอมโมหรือกรดอินทรีย์อื่นๆ ที่ผลิตได้จากเชื้อราจะไม่ทำปฏิกริยากับสารตรวจสอบแต่ประการใด ประสิทธิภาพในการสร้างกรดของโคโลนีมีหน่วยวัดเรียกว่า แอซิดยูนิตเทจ (Acidunitage) (AU-value) ซึ่งมีค่าเท่ากับอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางของวงแหวนสีม่วงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ถ้าโคโลนีสร้างกรดออกมามาก ค่า AU-value ก็สูงตามด้วย

2.8 สัญญาณวิทยาของเชื้อรา

เชื้อรา คือจุลชีพที่มีเซลล์ชนิดสมบูรณ์แบบ ซึ่งประกอบด้วย นิวเคลียส ไซโตพลาสซึม และผนังเซลล์

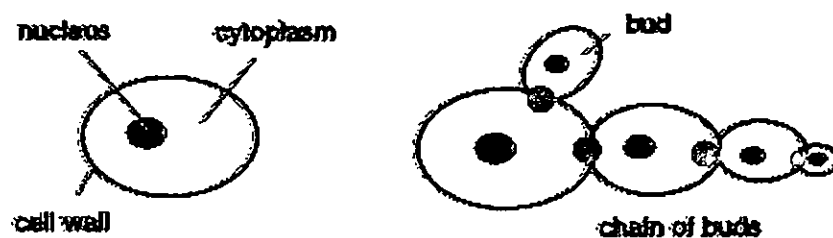
สัญญาณวิทยาของเชื้อรา แบ่งได้เป็น 2 แบบคือ ยีสต์ (Yeast) (ภาพประกอบ 8) ซึ่งเป็นเซลล์เดี่ยว และที่เป็นหลายเซลล์เรียงเป็นเส้นใย (Hypha) เรียกว่าราสาย (Moid ,mouid) (ภาพประกอบ 9) กลุ่มของเส้นใยของราสาย เรียกว่าไมซีเลียม (Mycelium) เส้นใยทั่วไปมีความกว้าง 5-10 ไมโครเมตร และมีความยาวมาก เยื่อหุ้มเป็นเยื่อ 2 ชั้น ผนังเซลล์ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) หรือไคติน ในราชั้นต่ำ ผนังเซลล์จะประกอบด้วยเซลลูโลส การเจริญของเส้นใยเกิดทางด้านใกล้ปลาย โดยมีการยึดตัวบริเวณนั้น เส้นใยจะมีการแบ่งตัวเข้าเข้ามาในเซลล์ (Centripetal invagination) และเกิด

ผนังกัน โดยเยื่อหุ้มเซลล์คอดเข้ามาเกิดเป็นผนังที่ไม่สมบูรณ์ เพราะมีรูตรงกลางผนัง เพื่อให้โปรโตพลาสซึมไหลเวียนถึงกันได้ แม้แต่นิวเคลียสก็เคลื่อนที่จากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่งได้

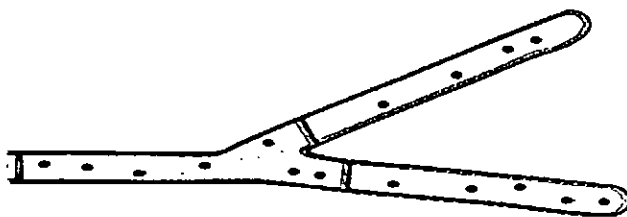
จากลักษณะการเจริญของเชื้อรา จะทำให้รูปร่างของเส้นใยแตกต่างกัน คือ ถ้าเจริญในดินหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง จะมีรูปร่างเป็นเส้นใย แต่ถ้าเจริญที่อุณหภูมิ 37°C หรือในร่างกายโฮสต์ จะมีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยวแบบยีสต์

เชื้อราเป็นเส้นใยจะมีการเจริญออกไปได้สองทิศทาง คือ ทางขวางจะเจริญไปเต็มที่แล้วจึงหยุด ส่วนการเจริญทางด้านยาวนั้น เส้นใยของเชื้อราจะงอกยาวออกไปและแตกแขนงอย่างไม่จำกัดที่สภาพแวดล้อมยังเหมาะสม

การเติบโตของเชื้อราจะเติบโตบริเวณปลายไฮฟา (Hypha tip) และมักมีการแตกแขนงไปอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ได้ใช้ แต่การเจริญเติบโตจะหยุดลงเมื่อ ไมซีเลียม ใช้อาหารรอบๆ บริเวณนั้นหมดไป และการเติบโตลักษณะนี้ทำให้มีโคโลนีลักษณะเป็นวงกลมในอาหารแข็ง เส้นใยของเชื้อราบนอาหารแข็งบางส่วน หยั่งลึกลงไปในการอาหารเพื่อดูดอาหารส่งไปให้ส่วนที่ไม่ได้สัมผัสอาหาร โคโลนีของราจะมีความแตกต่างกัน ทั้งสี และลักษณะโดยทั่วไป เช่น มีลักษณะฟู สีเส้นใยอาจมีสีดำ เหลือง ส่วนสปอร์ที่เห็นอาจมีสีเขียว น้ำตาลแกมเขียว ส้ม เป็นต้น เชื้อราบางชนิด เส้นใยจะรวมตัวกันเป็นกระจุก ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ เรียกว่า Pellet ภายใน Pellet โดยเฉพาะบริเวณตรงกลางของ Pellet จนกระทั่งอาจไม่ได้รับสารอาหารเลย นอกจากนั้นแล้วผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นก็ไม่สามารถนำออกจาก Pellet ได้ ซึ่งบางครั้งจะทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์ได้ (Product inhibition) ซึ่งเป็นรูปแบบการเจริญที่มีผลต่อการเจริญและการเกิดผลิตภัณฑ์



ภาพประกอบ 8 ลักษณะของยีสต์



ภาพประกอบ 9 ราชายมีผนังกัน

2.9 หลักทั่วไปในการเก็บรักษาและเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อที่จะใช้ในการหมักควรผ่านการคัดพันธุ์มาก่อน โดยเชื้อที่คัดเลือกไว้จะต้องไม่กลายพันธุ์ง่าย และมีความสามารถในการให้ผลผลิตที่ต้องการ เชื้อเหล่านี้อาจได้มาจากการปรับปรุงพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ หรืออาจได้มาจากการทดสอบสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อ แล้วคัดเลือกพันธุ์ที่ดีเอาไว้ ความคงที่ของเชื้อเป็นลักษณะที่มีความสำคัญมากอย่างหนึ่ง เพราะจะทำให้อัตราการทำงานและผลผลิตที่ได้สม่ำเสมอและคงตัว

2.9.1 การรักษากิจกรรมของเชื้อ

เชื้อที่เก็บรักษาไว้จะต้องเป็นเชื้อบริสุทธิ์และต้องอยู่ในสภาพที่ว่องไวอยู่เสมอ จุดประสงค์นี้สามารถบรรลุได้ โดยทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารที่เหมาะสมเป็นระยะๆ และจะต้องบ่มเชื้อจนเชื้อถึงระยะ Maximal stationary phase แล้วจึงนำไปเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิที่ต่ำพอ จะ ป้องกันการเจริญของเชื้อได้ การถ่ายเชื้อไม่สม่ำเสมอและบ่อยเกินไป อาจทำให้ลักษณะบางอย่างของเชื้อเปลี่ยนแปลงได้

2.9.2 เชื้อที่ต้องการเก็บไว้เป็นสต็อก (Stock cultures)

สต็อกควรเตรียมให้อยู่ในรูปที่เก็บรักษาไว้ได้นานๆ โดยไม่ต้องทำการถ่ายเชื้อเพื่อที่เชื้อจะได้ไม่กลายพันธุ์และจะได้ใช้เป็นแหล่งของเชื้อต่อไปได้ ปัจจุบันมักจะเก็บสต็อกเชื้อไว้โดยวิธีการไลโอไฟไลซ์ (Lyophilization) และการเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว แม้ว่าในบางแห่งยังคงใช้พาราฟินเหลวเทปิดทับเชื้อที่เลี้ยงไว้ในอาหารวุ้นธรรมดา เราอาจเก็บเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิห้องไว้ได้นานหลายเดือนเมื่อเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรีนเคโอลโรด ประกอบอยู่ร้อยละ 1 ดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วอาจใช้เป็นทีเก็บสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่แห้งได้นานพอสมควร

2.9.3 การรักษาสภาพความบริสุทธิ์ของเชื้อ

เพื่อให้เกิดความแน่ใจในความบริสุทธิ์ของเชื้อ จึงควรนำเชื้อมาจากห้องปฏิบัติการที่มีการถ่ายเชื้ออย่างสม่ำเสมอ หรือทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์อยู่เสมอ การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทำได้หลายวิธี แล้วแต่ชนิดของเชื้อที่ต้องการทดสอบ การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะตรวจได้ต่อเมื่อสิ่งเจือปนนั้นแตกต่างจากเชื้อที่เรามีอยู่ และต้องมีจำนวนมากพอ อีกวิธีหนึ่งก็คือ การเพาะเชื้อในจาน

ที่มีอาหารเหมาะสมต่อการเจริญของสิ่งปนเปื้อน แต่ไม่เหมาะสมกับเชื้อที่ต้องการเก็บรักษา อีกวิธีหนึ่งก็คือการตรวจหาสารบางชนิดที่เชื้อไม่สามารถผลิตได้

2.9.4 การเตรียมเชื้อ

ควรเตรียมเชื้อตั้งต้นขึ้นใหม่เสมอ จากแม่เชื้อเดิมหรือสต็อกเชื้อเดิม นำแม่เชื้อเหล่านั้นไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณมาก เพื่อให้เชื้อเพิ่มจำนวนให้มากพอที่จะนำไปใช้ในกระบวนการหมักได้ การเพิ่มจำนวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เชื่อนั้นเจริญเป็นเชื้อที่ต้องการเท่านั้น เชื้อที่ได้ต้องมีความว่องไวในการให้ผลผลิตที่ต้องการ และสามารถต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้พอสมควรในกรณีที่จำเป็น การเตรียมเชื้อแต่ละครั้งนั้น จะต้องพยายามให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกันหมด ไม่ว่าจะเป็นด้านการเตรียมอาหารเลี้ยง การเพาะเชื้อ การบ่มเชื้อเป็นต้น การที่จะเก็บเชื้อในระยะใดของการเจริญนั้นขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ที่ต้องการ เช่นถ้าต้องการให้เชื้อเจริญทันทีและรวดเร็ว ก็เก็บเกี่ยวเชื้อที่อยู่ในระยะที่เรียกว่า Logarithmic phase of growth แต่ถ้าต้องการให้เชื้อสามารถทนต่อความร้อนหรือสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้มากขึ้น ก็ควรเก็บเกี่ยวเชื้อที่อยู่ในระยะต้นของ Maximal stationary phase อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อมักจะใช้อุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิเหมาะสมของเชื้อ เมื่อเชื้ออยู่ในระยะที่ต้องการแล้วจะต้องลดอุณหภูมิลงเพื่อให้มีการเจริญเติบโตต่อไปได้อีก

2.10 ลักษณะของเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger*

Aspergillus niger เป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการผลิตกรดมะนาว ด้วยกรรมวิธีการหมัก โดยทั่วไปเชื้อราตัวนี้มีสีดำ แต่เมื่อเชื้อรานี้ถูกทำให้กลายพันธุ์ ก็อาจเปลี่ยนสีเป็นน้ำตาลเขียวออกเหลือง เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus niger* สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิห้อง ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 °C ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อราสายพันธุ์นี้คือ

2.10.1 เส้นใยของเชื้อรามีผนังกันเป็นห้องๆ

2.10.2 จัดเป็นเชื้อราชนิดมีผนังกัน (Septate hypha) ชนิดสายราไม่มีสี

2.10.3 โคลนிட้านหน้าเริ่มขึ้นมีสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ดำ ด้านหลังไม่มีสีหรือมีสีเหลือง ผิวหน้าเป็นเม็ดเล็กๆ (Granular) (ภาพประกอบ 10)

2.10.4 มีก้านชู (Conidiophore) ออกจากตรงสายรา ตำแหน่งที่ก้านชูงอกออกจากสายราเรียกว่า Food cell ซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าสายรา และมีขอบเขตที่ชัดเจน ปลายของก้านชูจะพองออกเป็นกระเปาะ

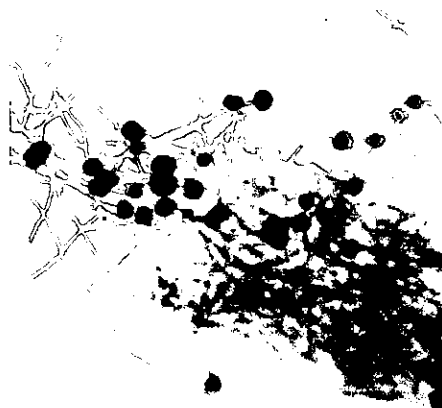
2.10.5 กระเปาะรูปกลมขนาด 20-50 ไมโครเมตร บางครั้งอาจถึง 100 ไมโครเมตร

2.10.6 บนกระเปาะมีตั้ง (Phialide) เกาะโดยรอบ แรกเริ่มมีชั้นเดียว (Uniseriate) ต่อมา มีสองชั้น (Biseriate) (ภาพประกอบ 11)

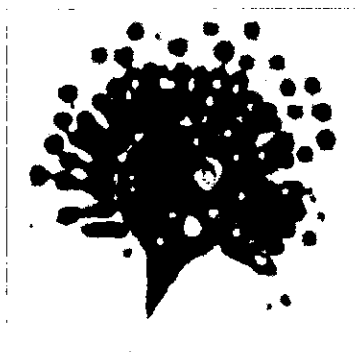
2.10.7 อับสปอร์จะมีรูปร่างต่างๆกัน เช่น กลม รี บนอับสปอร์จะมีหนาม (Sterigma) อยู่โดยรอบหรือเพียงบางส่วน ในบางครั้งจะสร้างหนามสองชั้น

2.10.8 สปอร์นี้อาจจะเกิดจากการยืดตัวของหนาม แล้วสร้างผนังกัน บางครั้งสปอร์จะติดกันเป็นสาย โดยสปอร์ที่อยู่นอกสุดของสายจะเป็นสปอร์ที่แก่ที่สุด

2.10.9 ถัดจากหนามจะเป็นที่ตั้งของสปอร์ (Conidia) ซึ่งเกิดจากตัง รูปกลม สีน้ำตาลหรือดำ ผนังหนาและขรุขระ



ภาพประกอบ 10 Colony ของ *Aspergillus niger*



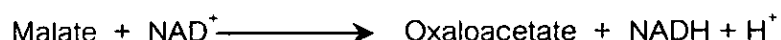
ภาพประกอบ 11 สปอร์ ของ *Aspergillus niger*

2.11 ชีวิตเคมีการผลิตกรดมะนาว

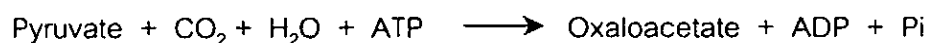
Citric acid cycle (Tricarboxylic acid cycle : TCA cycle) (ภาพประกอบ 12) เป็นแนวทางในการผลิตกรดมะนาวโดยอาศัยการหมักด้วยเชื้อรา โดยเฉพาะในกลุ่ม *Aspergillus niger* ทั้งนี้กรดมะนาวที่ได้จะเกิดการสะสมในปริมาณสูง เนื่องจากความผิดพลาดในการทำงานของ TCA cycle เป็นสำคัญ สำหรับเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดมะนาว ได้แก่ Aconitase, Isocitrate dehydrogenase และ Citric synthase โดยในช่วงของการสะสมกรดมะนาว เอนไซม์สองชนิดแรกจะมีกิจกรรมในระดับต่ำ ในขณะที่เอนไซม์ Citric synthase มีกิจกรรมในระดับสูง จึงทำให้เกิดการรวมตัวของ Acetyl CoA กับ Oxaloacetate เกิดเป็นกรดมะนาวขึ้น

สาร Oxaloacetate ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดมะนาว ถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยแนวทางในการสร้างหลายรูปแบบดังนี้

ปฏิกิริยา Dehydrogenation ของ Malate โดยอาศัยเอนไซม์ Malate dehydrogenase ดังสมการ

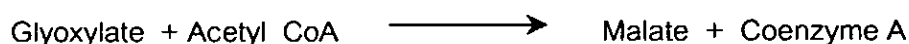


ปฏิกิริยา Carboxylation ของ Pyruvate โดยอาศัยการรวมตัวของ Pyruvate กับคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งถูกเร่งด้วยเอนไซม์ Pyruvate carboxylase ดังสมการ



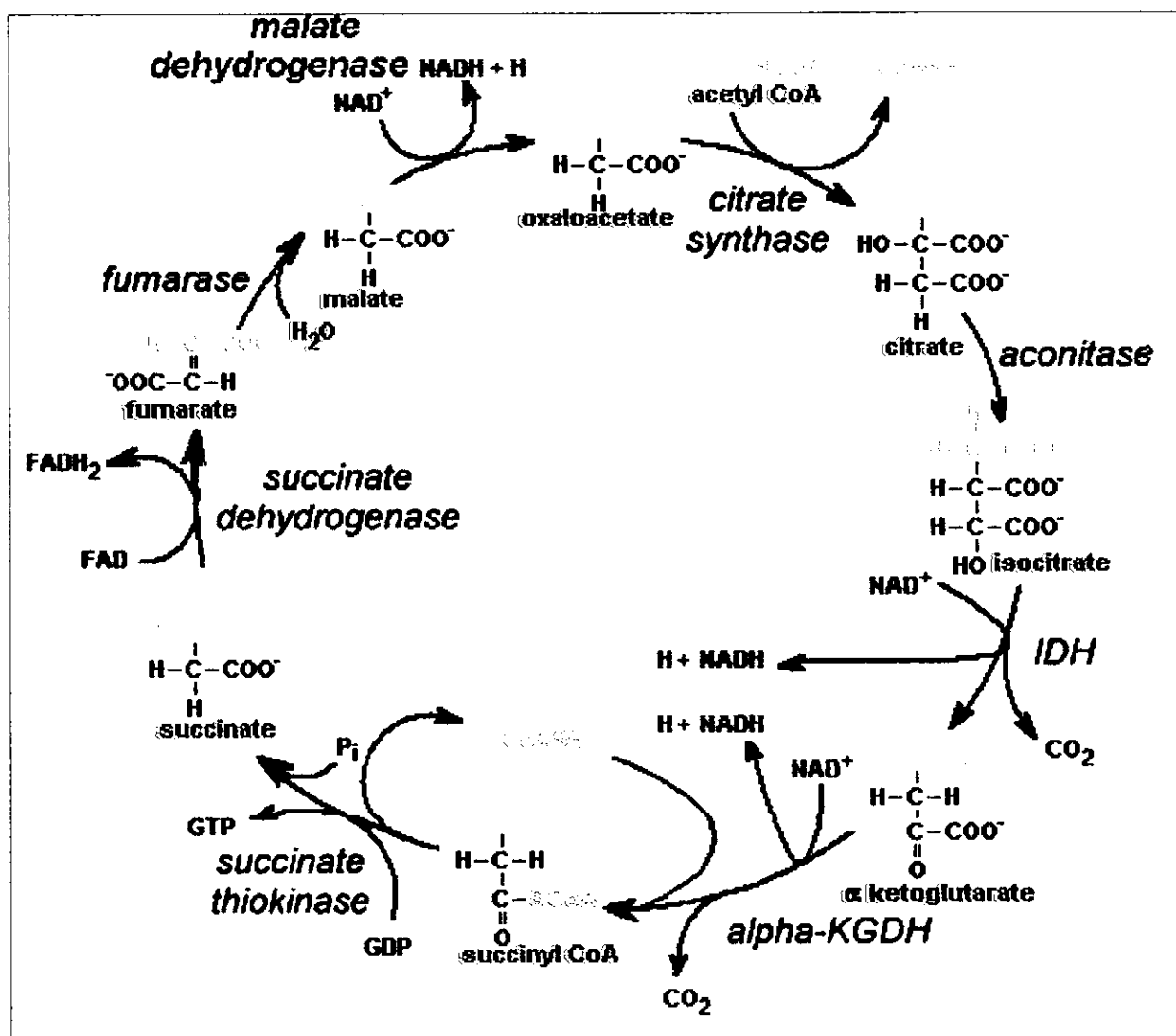
ปฏิกิริยา Carboxylation ของ Phosphoenolpyruvate โดยอาศัยหลัก Phosphoenolpyruvate carboxylase system (พบในยีสต์) ทั้งนี้จะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวของ Phosphoenolpyruvate กับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยไม่ต้องอาศัยพลังงาน หรือ ATP

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



สำหรับ Glyoxylate ที่ใช้นี้ สามารถสังเคราะห์ได้โดยอาศัยเอนไซม์ ดังนี้





ภาพประกอบ 12 Tricarboxylic acid cycle

2.12 ปัจจัยที่ควบคุมอัตราการหมัก

ปัจจัยสำคัญที่ควบคุมอัตราการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร นอกจากจะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ ความแตกต่างทางสมบัติเคมี รวมถึงชนิดและกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดแล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยของสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง รวมทั้งสมบัติทางเคมีและกายภาพของวัสดุแต่ละชนิด ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลง ชนิด กิจกรรม รวมถึงปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลาย สำหรับปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายสามารถแบ่งออกได้ดังนี้

2.12.1 ปริมาณออกซิเจน (Oxygen content)

กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ จัดเป็นปฏิกิริยาประเภท Biological oxidation เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ จะใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในระบบการหายใจในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นก๊าซออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยสำคัญ หากออกซิเจนไม่เพียงพอกระบวนการย่อยสลายก็จะ เป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์ ดังนั้นการระบายอากาศในกระบวนการหมัก จึงเป็นสิ่งสำคัญเพราะนอกจากจะเป็นการเพิ่มออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์แล้ว ยังเป็นการช่วยระบายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และความร้อนอีกด้วย ปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอต่อการดำเนินกิจกรรมการย่อยสลายจะต้องไม่ต่ำกว่า 18 % (Bertoldi ;and other. 1982:157-176)

2.12.2 ระดับอุณหภูมิ (Temperature level)

อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในกระบวนการย่อยสลาย อุณหภูมิที่สูงเกินไปจะมีผลชะงักการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้การย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ลดลง สำหรับเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37°C หากอุณหภูมิสูงติดต่อกันเป็นเวลานานเกินไป จะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลาย (Poincelot. 1975:1-17) ที่อุณหภูมิ 60°C เชื้อราส่วนใหญ่จะหยุดการเจริญและกิจกรรมต่างๆ การควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม จะทำให้สามารถลดอัตราการเจริญของเชื้อราชนิดอื่นๆ ที่ไม่ต้องการได้

2.12.3 ระดับความชื้น (Moisture content)

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดจำเป็นต้องอาศัยน้ำในการดำรงชีวิต รวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ด้วย เนื่องจากน้ำจะเป็นตัวกลางในการส่งผ่านอาหารและก๊าซออกซิเจนจากวัสดุและอากาศไปยังเซลล์ของจุลินทรีย์ และยังเป็นตัวกลางในการส่งผ่านเอนไซม์เข้าย่อยสลายวัสดุด้วย (Tengerdy. 1985:96-99) นอกจากนี้ความชื้นยังเป็นตัวกำหนดปริมาณก๊าซในวัสดุหมัก ถ้าความชื้นมากขึ้นปริมาณก๊าซจะลดลง ซึ่งการส่งผ่านออกซิเจนลดลงทำให้เกิดสภาพไม่มีอากาศ (Anaerobic)

ความชื้นที่เหมาะสมต่อกระบวนการย่อยสลายควรอยู่ระหว่าง 50-60 % ที่ความชื้นต่ำกว่า 30 % กิจกรรมทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายจะเกิดช้าลง อย่างไรก็ตามความชื้นที่พอเหมาะจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพและขนาดวัสดุด้วย เช่น การย่อยสลายวัสดุที่มีเส้นใย และมีความหนาแน่นต่ำ ควรจะรักษาระดับความชื้นให้อยู่ในช่วง 80-85 % ในสภาพที่มีการระบายอากาศ

2.12.4 อัตราส่วนของสารประกอบคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio)

อัตราการย่อยสลาย มักจะพิจารณาถึงค่าอัตราส่วนของสารประกอบคาร์บอนต่อไนโตรเจนของเศษวัสดุที่ใช้ทำปุ๋ยหมัก เพราะโครงสร้างของพืชส่วนมากจะไม่ค่อยแตกต่างกันมากนัก แต่จุดที่สำคัญคือองค์ประกอบของไนโตรเจนซึ่งจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมและเป็นตัวกำหนดอัตราการย่อยสลายและการเจริญ ตลอดจนการผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ (Bertoldi ;and other. 1983:45-50) สารประกอบคาร์บอนและไนโตรเจน เป็นสารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยที่จุลินทรีย์จะ

ย่อยสลายสารอินทรีย์คาร์บอน เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและเป็นแหล่งของคาร์บอนในการเจริญเพื่อสร้างเซลล์ใหม่ ขณะเดียวกันจุลินทรีย์ก็ใช้สารประกอบไนโตรเจน เพื่อนำไปสังเคราะห์สารพวกโปรตีน และกรดนิวคลีอิก ถ้าวัสดุมีค่าอัตราส่วนสารประกอบคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงมากๆ กิจกรรมการย่อยสลายจะเกิดช้า แต่ถ้าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำเกินไปจะทำให้เกิดการสูญเสียไนโตรเจนในระหว่างการย่อยสลาย

สารประกอบคาร์บอนและไนโตรเจน เป็นสารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งจะย่อยสลายสารอินทรีย์จนกระทั่งได้โมเลกุลเล็ก และนำเข้าไปในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งของพลังงาน และสร้างส่วนประกอบของเซลล์ สำหรับสารประกอบไนโตรเจนจะถูกย่อยสลายเช่นกัน เซลล์จุลินทรีย์จะนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อสร้างส่วนประกอบของเซลล์ เช่น สารโปรตีน และ กรดนิวคลีอิก เป็นต้น

การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ที่มีค่าอัตราส่วนของสารประกอบคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ อาจไม่จำเป็นต้องเติมสารไนโตรเจน หรือเติมในปริมาณที่น้อยกว่าที่ใช้กับเศษวัสดุที่มีค่าอัตราส่วนของสารประกอบคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง

2.12.5 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความเป็นกรด-ด่างของวัสดุ จะไม่มีผลกระทบต่อกระบวนการย่อยสลายมากนัก เชื้อราสามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาพที่ค่อนข้างเป็นกรดได้ ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* สามารถเจริญได้ดีที่ pH 2-4 ดังนั้นในระหว่างกระบวนการย่อยสลาย พบว่าในช่วงแรก pH จะลดลง ซึ่งจะย่อยสลายสารประกอบคาร์บอนทำให้เกิดกรดอินทรีย์ มีผลทำให้ pH ค่อนข้างเป็นกรดประมาณ 4.5-5.0

2.12.6 ขนาดของวัสดุ (size of material)

อัตราความเร็วในการเกิดการออกซิเดชันทางชีววิทยา เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณของพื้นที่ผิวที่ให้เชื้อจุลินทรีย์เข้ายึดเกาะ ถ้าพื้นที่ผิวในการสัมผัสมาก จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์และเอนไซม์เข้ายึดเกาะได้ดี และทำให้การย่อยสลายเร็วขึ้น วัสดุในการหมักควรมีขนาดเล็ก แต่ต้องมีช่องว่างเพียงพอในการระบายอากาศ ถ้าวัสดุมีขนาดเล็กเกินไปจะทำให้อัตราการระบายอากาศของก๊าซออกซิเจน และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Crawford, 1983:14-18) ลดลง แต่ถ้าวัสดุมีขนาดใหญ่เกินไป พื้นที่ผิวในการย่อยสลายจะลดลง จะทำให้กระบวนการย่อยสลายช้าลงด้วย

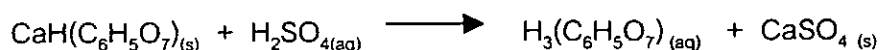
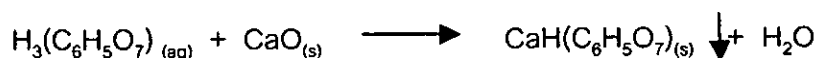
ขนาดของเศษวัสดุ หากเป็นวัสดุที่มีขนาดเล็ก เช่น แกลบ การผสมคลุกเคล้าทำได้ทั่วถึง พื้นที่ผิวสัมผัสมีมาก ดังนั้นโอกาสที่จะถูกย่อยสลายจึงมีมากกว่า สำหรับวัสดุที่มีขนาดใหญ่ เช่น เปลือกสับปะรด ต้นข้าวโพด หรือฟางข้าว การผสมคลุกเคล้าจะทำได้ไม่ทั่วถึงนัก และปฏิบัติค่อนข้างลำบาก จึงควรหดยอดสารละลายสปอร์ของเชื้อราให้ทั่วถึงมากที่สุด

2.13 แหล่งคาร์บอน (Carbon sources)

มีการวิจัยหาแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพ Prescott (1949) พบว่าเมื่อใช้ซูโครสเข้มข้น 140 g/L จะให้ผลผลิต กรดมะนาวสูงสุดเมื่อดำเนินการหมักไปได้ 9-12 วัน และยังพบอีกว่าถ้าใช้น้ำตาลเกิน 150 g/L จะเหลือน้ำตาลภายหลังจากการหมักสูงกว่าปกติ เมื่อทดแทนซูโครสด้วยฟรุกโตสหรือกลูโคส 10-50 g/L (จากจำนวนทั้งหมด 140 g/L) ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จะลดลงเมื่อเทียบกับการหมักที่ใช้ซูโครสเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ซูโครสที่ถูกย่อยไปบางส่วนในระหว่างการนึ่งมาเชื้อ จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลิตลดลงได้ ทำให้พบว่า น้ำตาลที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2-7 และ 12 คาร์บอน สามารถเปลี่ยนเป็นกรดมะนาวได้ จึงมีการศึกษาหาแหล่งต้นตอคาร์บอนจากพืชชนิดต่างๆ โดยอาจใช้น้ำตาลจากอ้อยหรือหัวผักกาดหวานก็ได้ โดยปริมาณของน้ำตาลที่ใช้ทั่วไปจะอยู่ในช่วง 140 – 200 g/L (Prescott ;& Dunn. 1959) เคอร์รี่ (Currie. 1972 : 15-67) ใช้ซูโครสที่มีความเข้มข้น 125-150 g/L ในการผลิตกรดมะนาว ในขณะที่ เมียล (Miall. 1978 : 47-119) ประสบผลสำเร็จจากการใช้กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้ง แต่น้ำตาลที่ดีที่สุดในการผลิตกรดมะนาวโดย *Aspergillus niger* ก็คือซูโครส ถัดไปคือ กลูโคสและฟรุกโตส ตามลำดับ (Hossain ;and other. 1983 : 161-168) ขณะที่กาแลคโตสไม่ใหกรดมะนาวออกมาเลย แต่เชื้อเจริญได้ดีพอๆ กับเลี้ยงในซูโครส (Hossain ;and other. 1984 : 393-394)

2.14 การเก็บเกี่ยวผลผลิต

เมื่อกรดมะนาวมีปริมาณมากพอแล้ว จะกรองแยกของเหลวออกจากเชื้อ นำของเหลวที่ได้ไปต้มให้ร้อน ทำการคนตลอดเวลาแล้วเติมปูนขาวลงไป เพื่อตกตะกอนกรดมะนาวออกมาในรูปของเกลือแคลเซียม เติม กรดกำมะถันเพื่อเปลี่ยนตะกอนของเกลือแคลเซียมซิเตรต ให้เป็นกรดมะนาวที่ละลายได้ในสารละลาย จากนั้นกรองแยกสารละลายกรดมะนาวออกจากตะกอนเกลือแคลเซียมซิลเฟต ดังสมการ



สารละลายกรดมะนาวที่กรองได้ นำไปฟอกสีด้วยผงถ่าน กรองสารละลายไม่มีสีของกรดมะนาว นำไประเหยในหม้อสูญญากาศจนเข้มข้น สามารถใช้ในรูปแบบของกรดมะนาวเข้มข้น หรืออาจนำไปตกผลึกออกมาในรูปของแข็งสีขาวก็ได้

2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระบวนการหมักกรดมะนาวจะได้กรดออกซาลิก และกรดไอโซซิทริกด้วยเสมอ ซึ่งพบได้ทั้งการหมักที่ใช้เชื้อราและยีสต์ ดังนั้นจึงต้องมีการคัดเลือกเชื้อ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ให้กรดมะนาวสูง การแยกกรดทำได้ง่าย นอกจากนี้ยังต้องปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น พรืสก็อต และ ดูน (Prescott ;& Dunn. 1949 : 346-348) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้สาร Mutagent ต่าง ๆ รวมทั้งใช้รังสีเหินม่วง

การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นของคาร์บอน สามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดมะนาวได้ (Prescott ;& Dunn. 1959 : 533-577) แต่น้ำตาลที่ดีที่สุดในการผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* คือ ซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส ตามลำดับ นอกจากน้ำตาลแล้วการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวยังต้องการแร่ธาตุอื่นๆ เช่น โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แอมโมเนียส เหล็ก และสังกะสี ในการเจริญอีกด้วย

การควบคุม pH ของวัตถุดิบอย่างพอเหมาะ นอกจากทำให้เชื้อผลิตกรดมะนาวได้ดีแล้ว ยังสามารถลดการเกิดกรดออกซาลิกได้อีกด้วย โดยเมื่อใช้ pH ต่ำๆ เช่น pH 1.6-2.2 จะเป็นผลดีต่อการหมักโดยจะให้กรดมะนาวสูง ภาชนะที่ใช้ในการหมักมักใช้ภาชนะปากกว้างและตื้น ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์มีโอกาสสัมผัสอากาศได้มาก ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะอื่นๆในการหมัก ซึ่งโดยทั่วไปใช้ประมาณ 25-35°C

สารกระตุ้นที่ใช้เพื่อการปรับปรุงผลผลิตของกรดมะนาวที่ได้จากการหมักด้วยรา *Aspergillus niger* มีหลายชนิด เช่น เมทานอล เอทานอล และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น โดยเมทานอลเป็นสารกระตุ้นที่ทำให้ผลผลิตของกรดมะนาวจากเชื้อ *Aspergillus niger* สูงมากกว่าสารชนิดอื่น ๆ

ชัตฮารี และคณะ (Chaudhary ;and other. 1978 : 544) พบว่าเมทานอลความเข้มข้น 3-4 % จะช่วยให้การเจริญเติบโตและการเกิดสปอร์ดีขึ้น และส่งผลให้สร้างกรดมะนาวได้มากขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากเมทานอลไม่ทำให้เมทาบอลิซึมของราเปลี่ยนแปลง ส่วนระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของราและสภาวะของการหมัก ในกรณีของ *Aspergillus niger* ถ้าทำการหมักโดยเลี้ยงเชื้อที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Surface culture) ใช้เวลาในการบ่มประมาณ 7-10 วัน ในขณะที่การหมักในสภาพอาหารเหลวจะใช้เวลาสั้นกว่า โดยใช้เพียง 4-5 วันเท่านั้น ส่วนการหมักในสภาพอาหารแข็งใช้ระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมเท่ากับ 6-7 วัน

Aspergillus niger สามารถใช้ในโตรเจนในรูปของเกลือ เช่น เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท และยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) ชนิดของแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อราอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือถ้าใช้แอมโมเนียมซัลเฟต จะทำให้ระยะการเจริญของรากินเวลานาน ในขณะที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรท จะทำให้ระยะ

เวลาดังกล่าวสั้นลง อย่างไรก็ตามเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.25 % จะทำให้เกิดการสะสมของกรดออกซาลิกขึ้น (Gupta, Hedding and Jangensen. 1976 : 63) ดังนั้นถ้าใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะทำให้ระยะเวลาในการเจริญและขั้นตอนการผลิตกรดมะนาวจะเกิดช้าขึ้น

การใช้วัตถุดิบ (Raw material) ในกระบวนการหมัก ต้องพิจารณาถึงประโยชน์และราคาที่คุ้มกับการลงทุน ตลอดจนวิธีการเตรียมให้ได้มาซึ่งคาร์โบไฮเดรตเหล่านั้น การประหยัดในแง่ วัสดุอาหารจะเป็นการจำกัดแหล่งคาร์โบไฮเดรต วัตถุดิบที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดมะนาวส่วนใหญ่ได้แก่ กากน้ำตาลจากอ้อย กากน้ำตาลจากหัวบีท และแป้ง อย่างไรก็ตาม ได้มีความพยายามที่จะใช้แหล่งวัตถุดิบอื่น ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตรวมทั้งเป็นการลดต้นทุนในการผลิตอีกด้วย ดังงานวิจัยของ ฮอสเซ็น บรูค และแมดดอกซ์ (Hossain, Brooks and Maddox. 1984 : 161-168) ซึ่งประสบผลสำเร็จจากการใช้กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้ง และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากมันฝรั่งชนิดหวาน ชั่งข้าวโพด กากมันสำปะหลัง วัตถุดิบดังกล่าวมีราคาถูกและมีปริมาณน้ำตาลเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ

เซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่พบมากในธรรมชาติ การย่อยสลายเซลลูโลสต้องอาศัยกรดและเอนไซม์เซลลูเลส กระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นที่นิยมมาก เนื่องจากสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวได้โดยตรง

ฮาน และ คาลิฮาน (Han ;& Callihan. 1974 : 159-165) ศึกษาการปรับสภาพฟางข้าว โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กับความร้อนภายใต้ความดันสูง แล้วนำเซลลูโลสที่ได้ไปทำการหมัก พบว่าได้กลูโคสสูงถึง 95%

สมศักดิ์ สรรังสิน (สมศักดิ์ สรรังสิน. 2540 : 36) การศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากกากมันสำปะหลังโดยวิธีการหมักแบบกึ่งแข็ง ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้ทำการปรับปรุงด้วยการทำให้เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* กลายพันธุ์ด้วยแสง Ultraviolet หรือสาร N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) พบว่าเชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดมะนาวได้เพิ่มขึ้นกว่าเดิมถึง 2.75 เท่า ในปีเดียวกัน รักฤดี สารธิมา (รักฤดี สารธิมา. 2540 : 22-36) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2 โดยใช้ขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิและความดันสูง พบว่าประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวยังไม่ดีพอ เนื่องจากสูญเสียปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และเซลลูโลสไประหว่างขั้นตอนการล้างของแข็งและล้างโซเดียมไฮดรอกไซด์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ-อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
3. เครื่องชั่ง (Analytical balance)
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
5. เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)
6. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm.
7. ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette)
8. ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
9. หลอดทดลองฝาเกลียวและแบบไม่มีฝา
10. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)

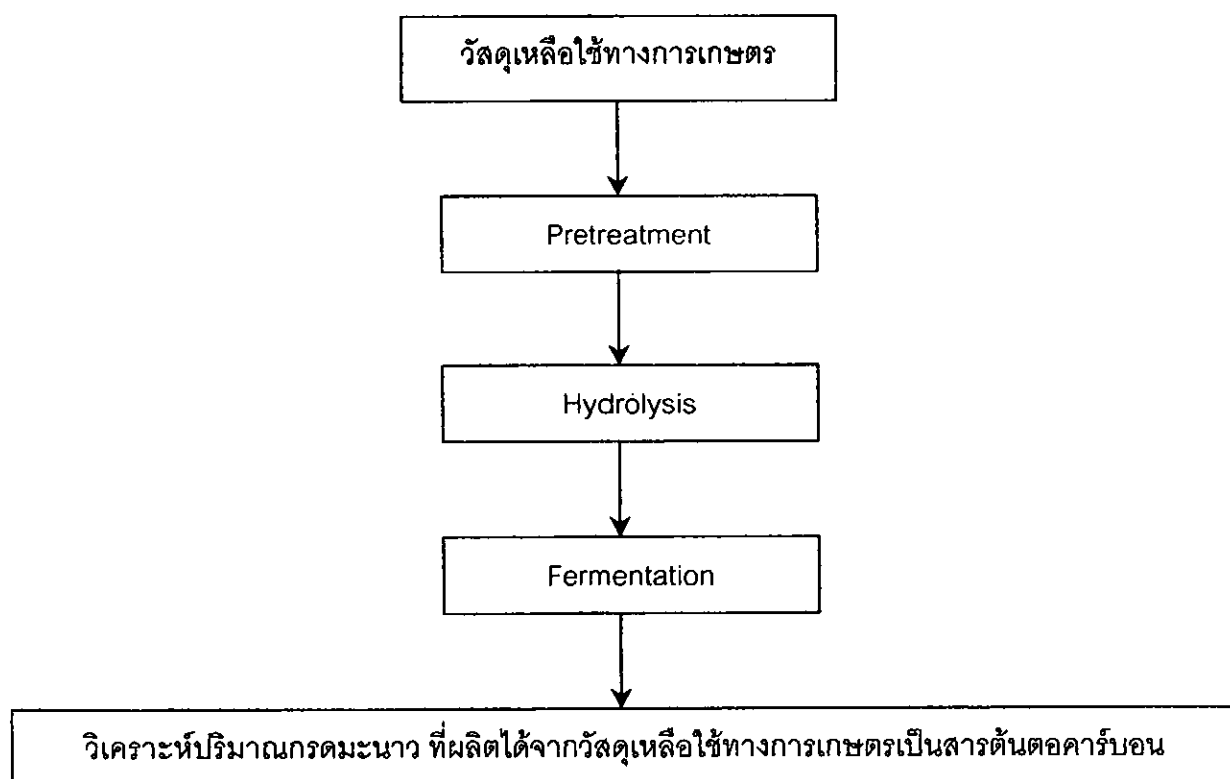
3.2 สารเคมี

1. กรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid)
2. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Potassium sodium tartrate)
3. กรดอะซิติก (Acetic acid)
4. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
5. กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid)
6. กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid)
7. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide)
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
9. ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein)
10. กลูโคส (Glucose)
11. เอทิลอัลกอฮอล์ (Absolute ethyl alcohol)

12. กรดมะนาว (Citric acid)
13. เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase enzyme)
14. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ (Czapek-Dox medium)
15. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรควบคุม (SS medium)

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

การทดลองประกอบด้วยการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้แก่ แกลบ ฟางข้าว ต้นข้าวโพดสด เปลือกสับปะรด มาปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ และวิธีทางเคมีในระยะเวลาต่างๆ จากนั้น ทำการไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แล้วนำไปหมักด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no. 2 เพื่อให้ได้กรดมะนาว ดังภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 13 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4 การเตรียมและการเก็บรักษาหัวเชื้อ

แยกเชื้อสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 มาละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) เผาไฟให้ร้อนแดงทิ้งไว้สักครู่ จุ่มลงในสารละลายสปอร์แล้วเขี่ยเบาๆ ลงบนอาหารสูตรปรับต่ำของ Czapek-Dox ป่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ปิดผนึกจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม เก็บรักษาหัวเชื้อที่ได้ในตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ 4°C

3.5 กระบวนการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

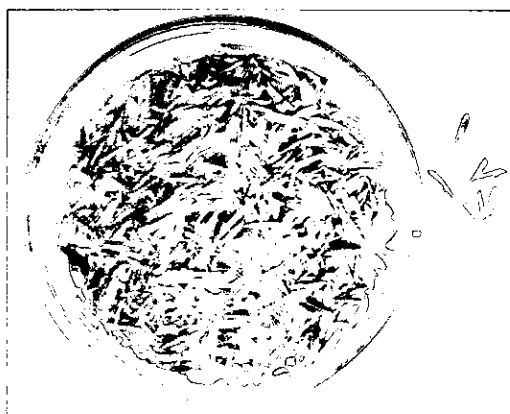
3.5.1 วิธีทางกายภาพ

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่จะนำมาทดลองมี 4 ชนิด ได้แก่

3.5.1.1 แกลบ

3.5.1.1.1 การแปรรูป ใช้รูปทรงเดิมที่ได้จากโรงสี นำไปแช่น้ำ คัดเฉพาะส่วนที่จมน้ำ ล้างให้สะอาด แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80°C

3.5.1.1.2 ลักษณะที่ได้ เป็นรูปทรงเดิมของแกลบ ความยาว 0.9-1.1 cm. ดังภาพประกอบ 14

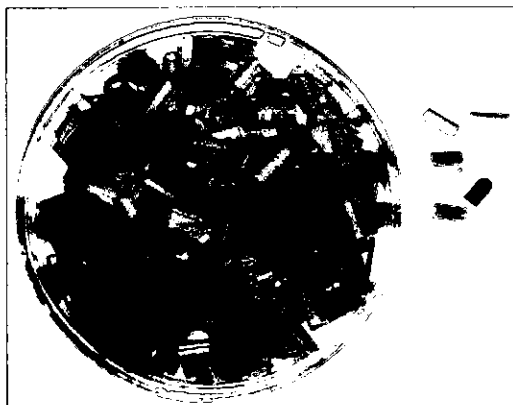


ภาพประกอบ 14 แกลบ

3.5.1.2 ฟางข้าว

3.5.1.2.1 การแปรรูป นำฟางข้าวมาตัดเป็นท่อน แล้วนำมาล้างให้สะอาด จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80°C จนน้ำหนัคงที่

3.5.1.2.2 ลักษณะที่ได้ ฟางข้าวที่มีลักษณะเป็นท่อน มีความยาว 1 cm. ดังภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 ฟางข้าว

3.5.1.3 ต้นข้าวโพดสด

3.5.1.3.1 การแปรรูป นำต้นข้าวโพดสดมาตัดใบทิ้ง แล้วล้างให้สะอาด ตัดเป็น
ท่อน

3.5.1.3.2 ลักษณะที่ได้ ต้นข้าวโพดสดความยาว 1 cm. ดังภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 ต้นข้าวโพดสด

3.5.1.4 เปลือกสับปะรด

3.5.1.4.1 การแปรรูป นำเปลือกสับปะรดมาล้างให้สะอาด ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ

3.5.1.4.2 ลักษณะที่ได้ เปลือกสับปะรดสดรูปลูกบาศก์ ขนาด 1X1 cm. ดังภาพ
ประกอบ 17



ภาพประกอบ 17 เปลือกสับปะรดสด

3.5.2 วิธีทางเคมี

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหนัก 8 g มาปรับสภาพ โดยแช่ใน กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก กรดอะซิติก โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่มีความเข้มข้น 2 M ปริมาตร 100 mL ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 7 14 21 และ 28 วัน

นำวัสดุที่ปรับสภาพแล้วมากรองด้วยกระดาษกรอง ล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งน้ำที่ล้างมี pH เป็นกลาง โดยวัดด้วย pH meter จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80-100°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่ง แล้วนำไปทำการย่อยสลายต่อไป

3.6 การเตรียมเซลลูโลสไฮโดรไลสด้วยวิธี Enzymatic hydrolysis

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพ มาไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) โดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่อของเหลวในอัตราส่วน 1:10 (W:V) ใน 50 mM Citrate buffer, pH 4.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 45°C แล้วนำวัสดุที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 500 rpm เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใส (Supernatant) ไว้ นำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3.7 การหมักกรดมะนาวด้วยสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งแข็ง โดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพ

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด (จากข้อ 3.5.2) มา 5 g ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm. จำนวน 7 ชุด ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ SS Medium ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จานละ 15 mL ทิ้งไว้สักครู่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อซึมเข้าไปในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) เป็นเวลา 15 นาที ใช้ห้วงถ่ายเชื้อเชื้อสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในปริมาณที่เหมาะสม เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารละลายสปอร์ 1 mL ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ คลุกเคล้าสารละลายสปอร์กับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรให้ทั่ว ปิดผนึก ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยทำการวัดหาปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลรีดิวซ์ทุกวัน

3.8 การหาปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลรีดิวซ์

3.8.1 การเตรียม Culture filtrate

นำจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบ่มมาทำการสกัดกรดมะนาวออก โดยเขี่ยลงในบีกเกอร์ขนาด 500 mL ทำให้วัสดุเหล่านั้นแตกหักออกเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย เติมน้ำกลั่นอุณหภูมิ 60°C ปริมาตร 200 mL คนด้วยเครื่อง Magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง สารละลายที่ได้คือ Culture filtrate ที่จะนำไปหาปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป

3.8.2 การวัดปริมาณกรดมะนาวใน Culture filtrate

นำ Culture Filtrate ปริมาตร 5 mL เติมฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 N จนถึงจุดยุติ บันทึกปริมาตรสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เพื่อนำมาคำนวณหา % Yield ที่ได้จากการหมักจากสูตร

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

$$\text{Citric acid (g/L)} = \frac{\text{g/L(C-Source)} \times \% \text{ Yield}}{100}$$

100

เมื่อกำหนดให้

F = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

V = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ใช้ในการไทเทรต Sample

B = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ใช้ในการไทเทรต Blank

% C-Source = %ของสารต้นตอคาร์บอนที่ใช้

g/L (C-Source) = ปริมาณของสารต้นตอคาร์บอนที่ใช้ หน่วยเป็น g/L

3.8.3 การวัดน้ำตาลรีดิวซ์

นำ Culture filtrate ปริมาตร 1 mL มาทำปฏิกิริยากับสารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS reagent) ปริมาตร 1 mL เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที แล้วเติมน้ำกลั่นที่เย็น ปริมาตร 10 mL เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายที่ได้มีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

คำนวณหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่โดยเทียบกับกราฟกลูโคสมาตรฐาน

บทที่ 4

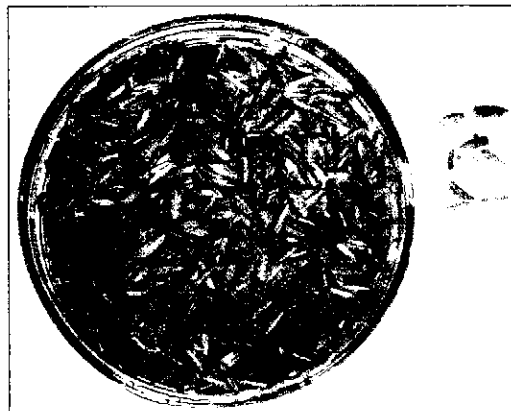
ผลการวิจัย

4.1 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพ

การทดลองจะใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 4 ชนิด ได้แก่ แกลบ ฟางข้าว ต้นข้าวโพดสด และเปลือกสับปะรด นำไปปรับสภาพทั้งทางกายภาพ และทางเคมี ได้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแบ่งได้เป็น 2 พวกใหญ่คือ วัสดุที่ปรับสภาพโดยกรด ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก กรดอะซิติก และโดยเบส ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

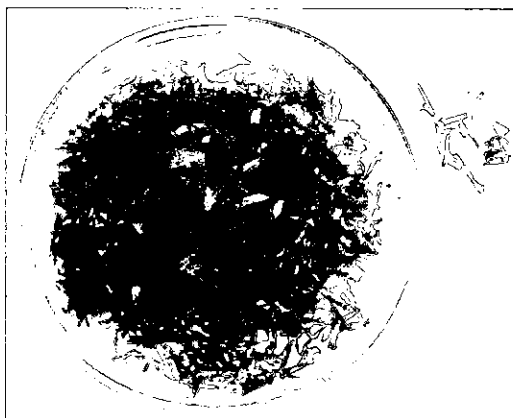
4.1.1 แกลบ

4.1.1.1 เมื่อปรับสภาพด้วยกรด แกลบที่ได้จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับแกลบก่อนที่จะนำมาปรับสภาพ แต่สีของแกลบจะอ่อนลง และแกลบแตกเป็นชิ้นเล็กลง ดังภาพประกอบ 18



ภาพประกอบ 18 แกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด และผ่านการอบแห้ง

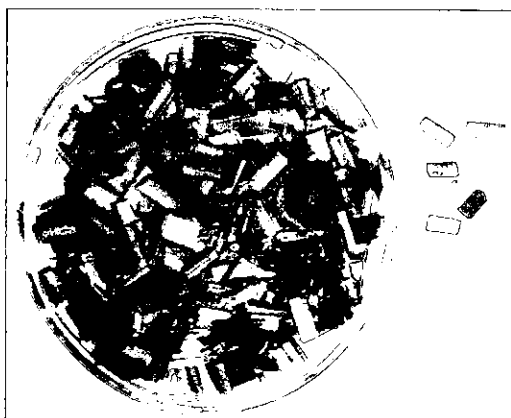
4.1.1.2 เมื่อปรับสภาพด้วยเบส แกลบที่ได้จะมีลักษณะบิดเป็นเกลียว และมีสีเข้มกว่าแกลบที่ไม่ปรับสภาพหรือแกลบที่ปรับสภาพด้วยกรด แกลบแตกเป็นชิ้นเล็กลง ดังภาพประกอบ 19



ภาพประกอบ 19 แกลบลที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส และผ่านการอบแห้ง

4.1.2 ฟางข้าว

4.1.2.1 เมื่อปรับสภาพด้วยกรด ฟางข้าวที่ได้จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับฟางข้าวก่อนที่จะนำมาปรับสภาพ แต่มีบางส่วนที่ฟางข้าวแตกเป็นเส้นเล็กลง และสีของฟางข้าวจะอ่อนลง ดังภาพประกอบ 20



ภาพประกอบ 20 ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด และผ่านการอบแห้ง

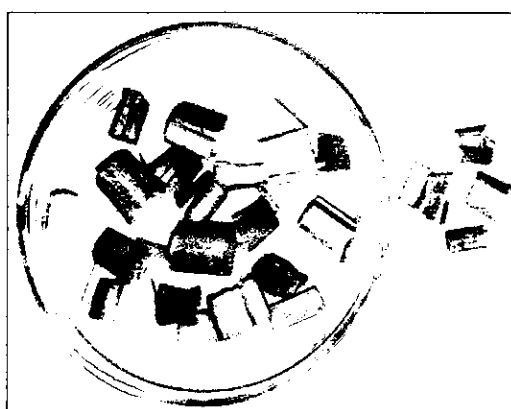
4.1.1.2 เมื่อปรับสภาพด้วยเบส ฟางข้าวแตกเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย ดังภาพประกอบ 21 และเป็นฝอย สีของฟางที่ได้จะมีลักษณะอ่อนกว่าฟางไม่ปรับสภาพหรือฟางที่ปรับสภาพด้วยกรด



ภาพประกอบ 21 ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส และผ่านการอบแห้ง

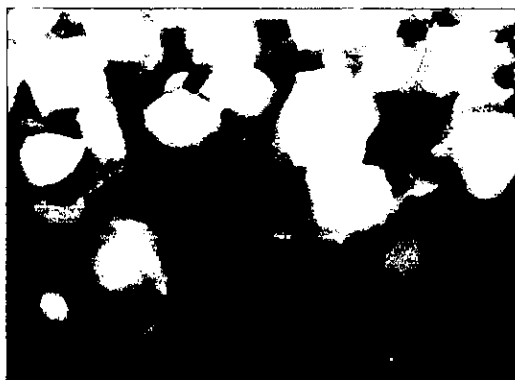
4.1.3 ต้นข้าวโพดสด

4.1.3.1 เมื่อปรับสภาพด้วยกรด ต้นข้าวโพดที่ได้จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับต้นข้าวโพด ก่อนที่จะนำมาปรับสภาพ แต่มีหลายชิ้นที่แตกเป็นชิ้นเล็กลง และสีของต้นข้าวโพดที่อบแล้วจะมีสีอ่อนกว่าต้นข้าวโพดอบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ดังภาพประกอบ 22



ภาพประกอบ 22 ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด และผ่านการอบแห้ง

4.1.3.2 เมื่อปรับสภาพด้วยเบส ต้นข้าวโพดที่บ่มด้วยเบสจะมีลักษณะใส ดังภาพประกอบ 23 เมื่อนำมาล้างและอบต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสจะแตกเป็นชิ้นเล็ก และมีสีเหลืองมากกว่าต้นข้าวโพดอบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ดังภาพประกอบ 24



ภาพประกอบ 23 ต้นข้าวโพดที่บ่มด้วยเบส



ภาพประกอบ 24 ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส และผ่านการอบแห้ง

4.1.4 เปลือกสับปะรด

4.1.4.1 เมื่อปรับสภาพด้วยกรด เปลือกสับปะรดที่บ่มด้วยกรดจะมีลักษณะเปื่อยยุ่ย ดังภาพประกอบ 25 และเมื่อนำเปลือกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพมาล้างและอบ มีหลายชิ้นที่แตกเป็นชิ้นเล็กลง ส่วนสีของเปลือกสับปะรดที่อบแล้วจะมีสีอ่อนกว่าเปลือกสับปะรดอบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ดังภาพประกอบ 26

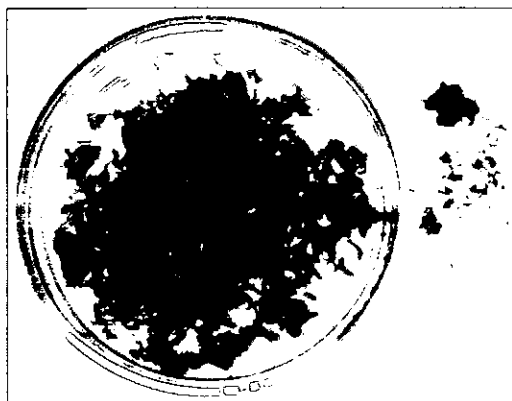


ภาพประกอบ 25 เปลือกสับปะรดที่บ่มด้วยกรด



ภาพประกอบ 26 เปลือกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด และผ่านการอบแห้ง

4.1.4.2 เมื่อปรับสภาพด้วยเบส เปลือกสับปะรดที่บ่มส่วนมากจะมีลักษณะเปื่อยยุ่ยมากกว่าเปลือกสับปะรดที่ปรับสภาพด้วยกรด และมีหลายชิ้นที่แตกเป็นขุย เมื่อนำมาอบจะพบว่าเปลือกสับปะรดกรอบ และแตกออกเป็นผง ส่วนสีของเปลือกสับปะรดที่อบแล้วจะมีสีอ่อนกว่าเปลือกสับปะรดที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ดังภาพประกอบ 27



ภาพประกอบ 27 เปลือกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส และผ่านการอบแห้ง

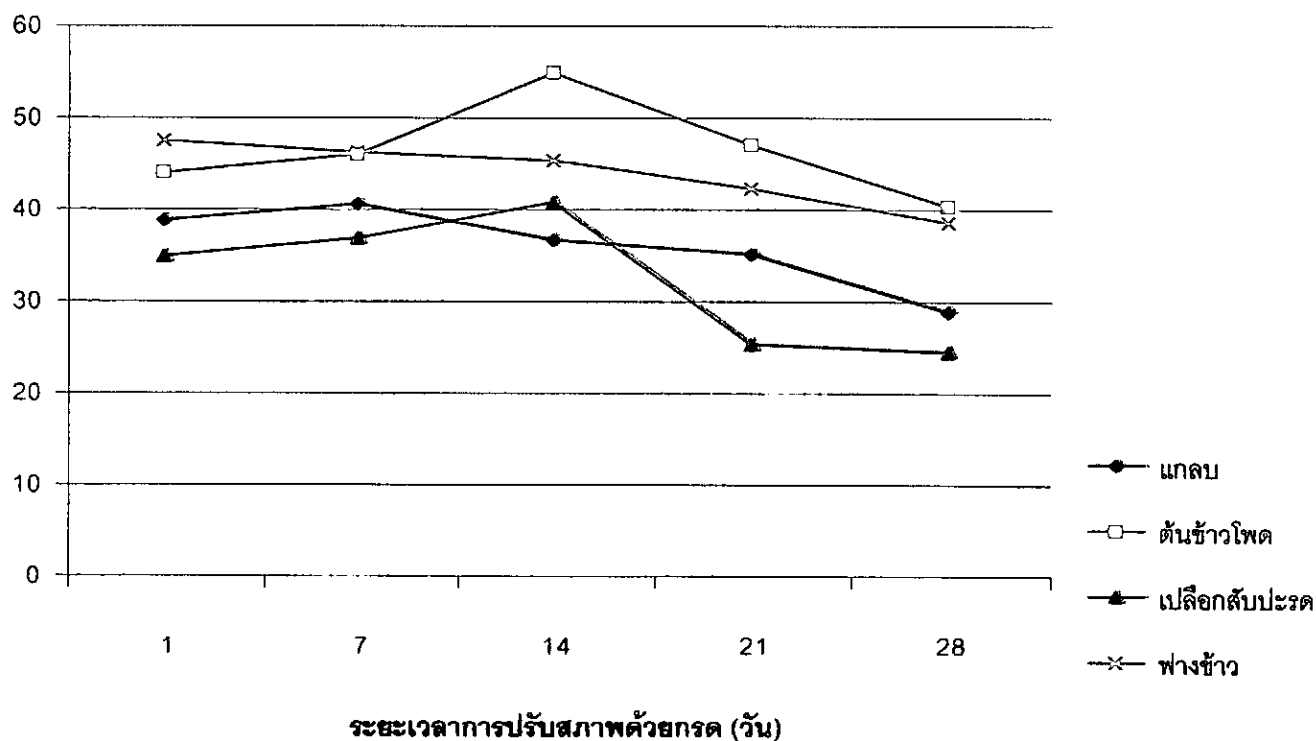
วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่นำมาปรับสภาพ จะมีน้ำหนักลดลง 25-88% โดย แกลบ จะมีน้ำหนักลดลง 25% ต้นข้าวโพด น้ำหนักลดลง 35% ฟางข้าว น้ำหนักลดลง 50% และ เปลือกสับปะรด น้ำหนักลดลง 88%

4.2 ผลการหาค่าน้ำตาลรีดิวซ์ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

นำวัสดุทั้ง 4 ชนิด ที่ปรับสภาพด้วย กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก กรดอะซิติก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลา 1 7 14 21 และ 28 วัน ไปทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ของเชื้อรา *Aspergillus niger* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 45°C นำวัสดุที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 500 rpm เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใส (Supernatant) นำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ได้ผลดังนี้

4.2.1 วัสดุปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริก

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)



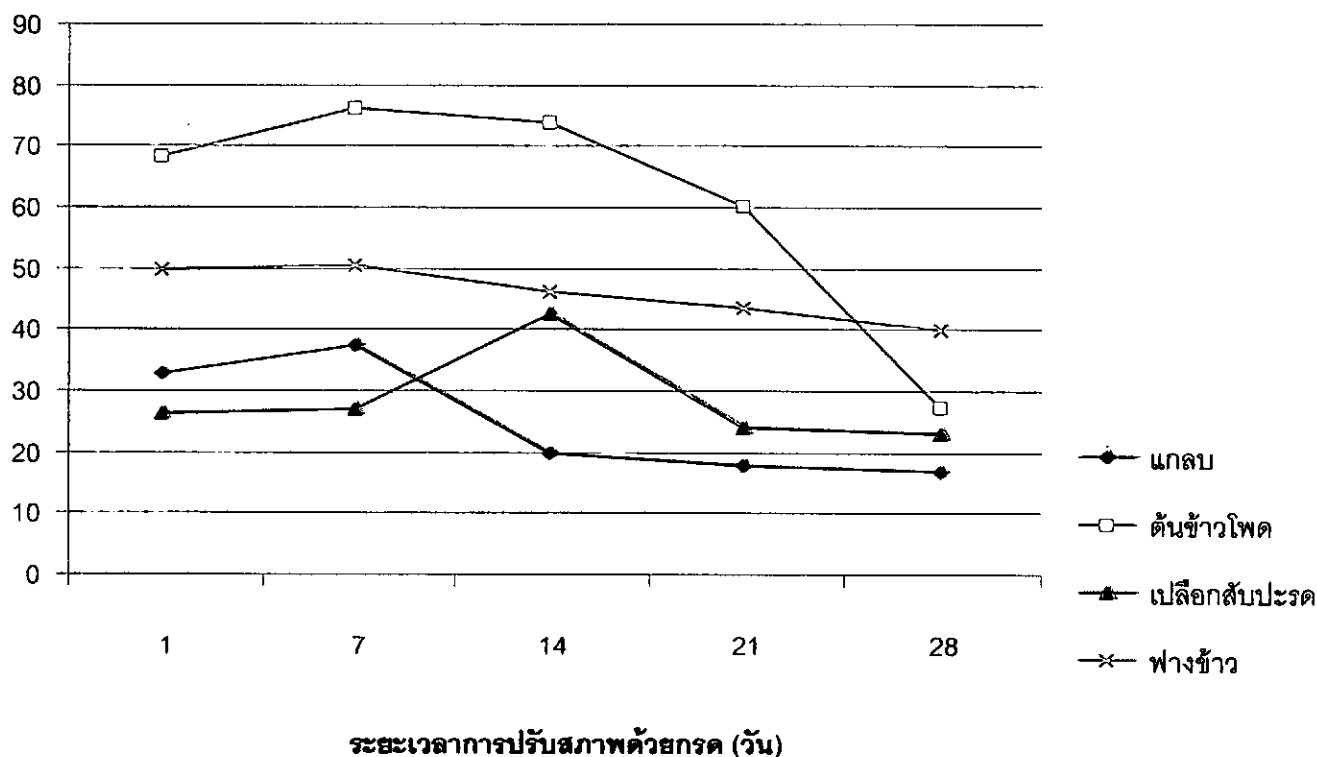
ภาพประกอบ 28 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริก

จากการทดลองพบว่า วัสดุแต่ละชนิดที่ปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริก จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกัน (ภาพประกอบ 28)

- แกลบ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 7 วัน เท่ากับ 40.6 g/L
- ต้นข้าวโพด จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 14 วัน เท่ากับ 55.1 g/L
- เปลือกสับปะรด จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 14 วัน เท่ากับ 40.8 g/L
- ฟางข้าว จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 1 วัน เท่ากับ 47.7 g/L

4.2.2 วัสดุปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)



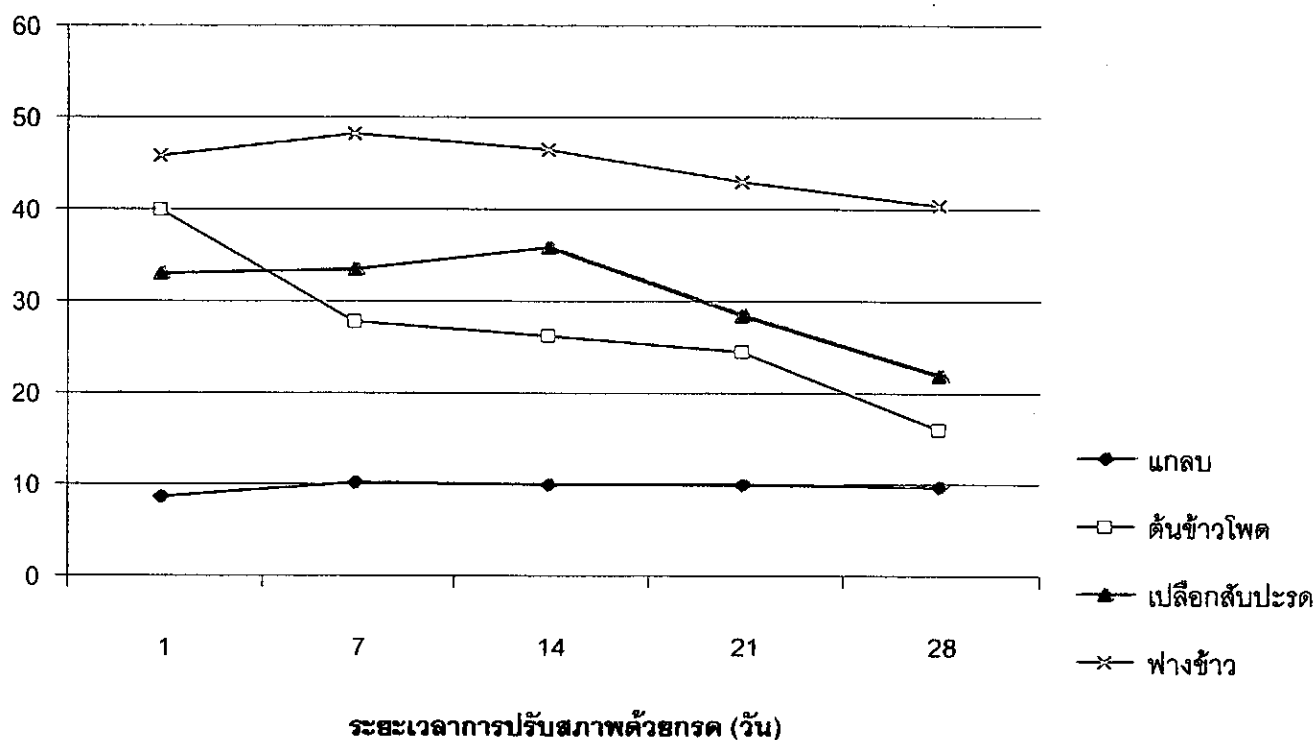
ภาพประกอบ 29 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก

จากการทดลองพบว่า วัสดุแต่ละชนิดที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกัน (ภาพประกอบ 29)

- แกลบ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 7 วัน เท่ากับ 37.5 g/L
- ต้นข้าวโพด จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 7 วัน เท่ากับ 76.2 g/L
- เปลือกสับปะรด จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 14 วัน เท่ากับ 42.7 g/L
- ฟางข้าว จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 7 วัน เท่ากับ 50.5 g/L

4.2.3 วัสดุปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)



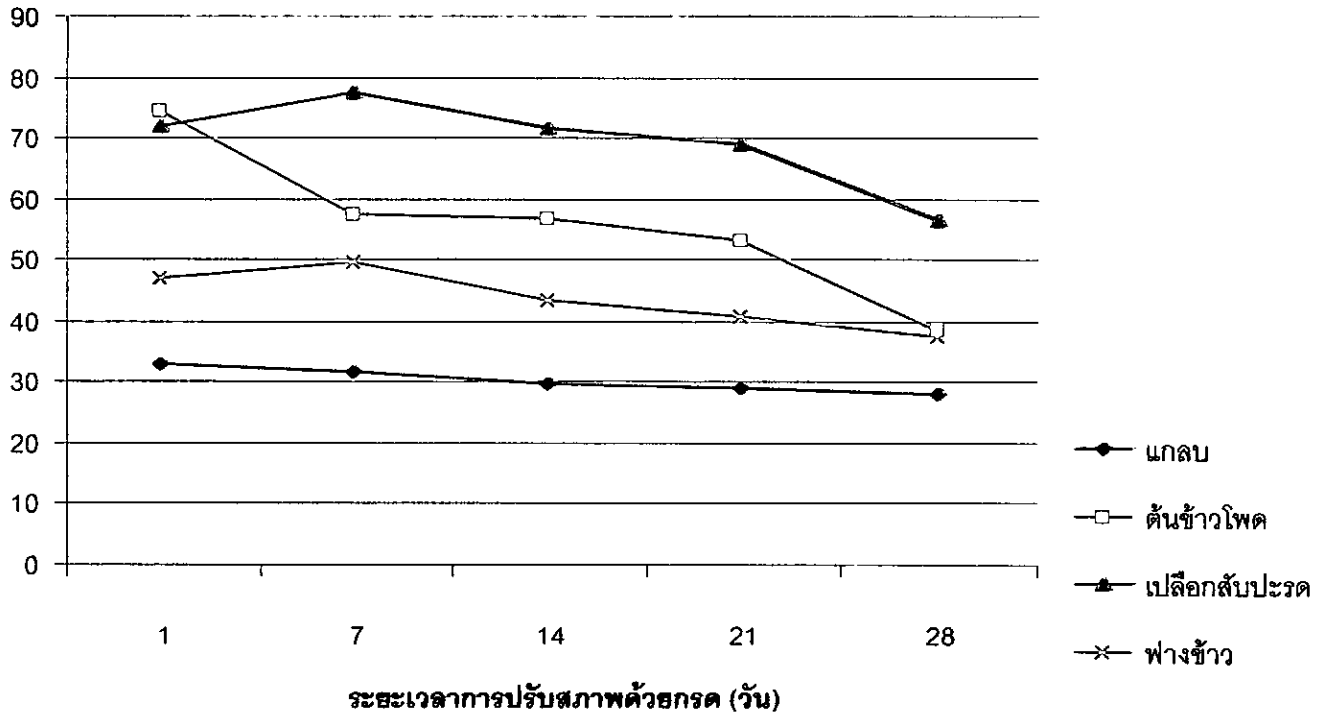
ภาพประกอบ 30 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก

จากการทดลองพบว่า วัสดุแต่ละชนิดที่ปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกัน (ภาพประกอบ 30)

- แกลบ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 7 วัน เท่ากับ 10.3 g/L
- ต้นข้าวโพด จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 1 วัน เท่ากับ 40.0 g/L
- เปลือกสับปะรด จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 14 วัน เท่ากับ 35.9 g/L
- ฟางข้าว จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 7 วัน เท่ากับ 48.3 g/L

4.2.4 วัสดุปรับสภาพด้วยกรดอะซิติก

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)



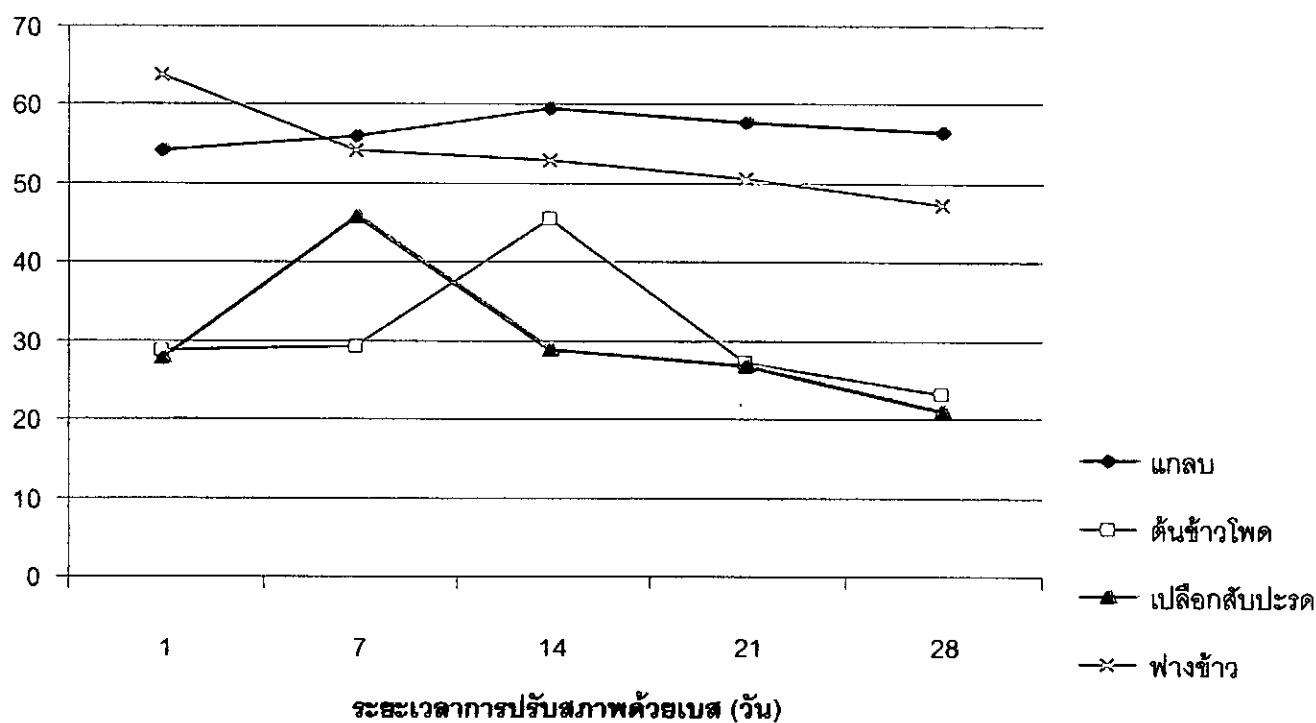
ภาพประกอบ 31 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดอะซิติก

จากการทดลองพบว่า วัสดุแต่ละชนิดที่ปรับสภาพด้วยกรดอะซิติก จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกัน (ภาพประกอบ 31)

- แกลบ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 1 วัน เท่ากับ 33.2 g/L
- ต้นข้าวโพด จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 1 วัน เท่ากับ 74.7 g/L
- เปลือกสับปะรด จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 7 วัน เท่ากับ 77.5 g/L
- ฟางข้าว จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 7 วัน เท่ากับ 47.3 g/L

4.2.5 วัสดุปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)



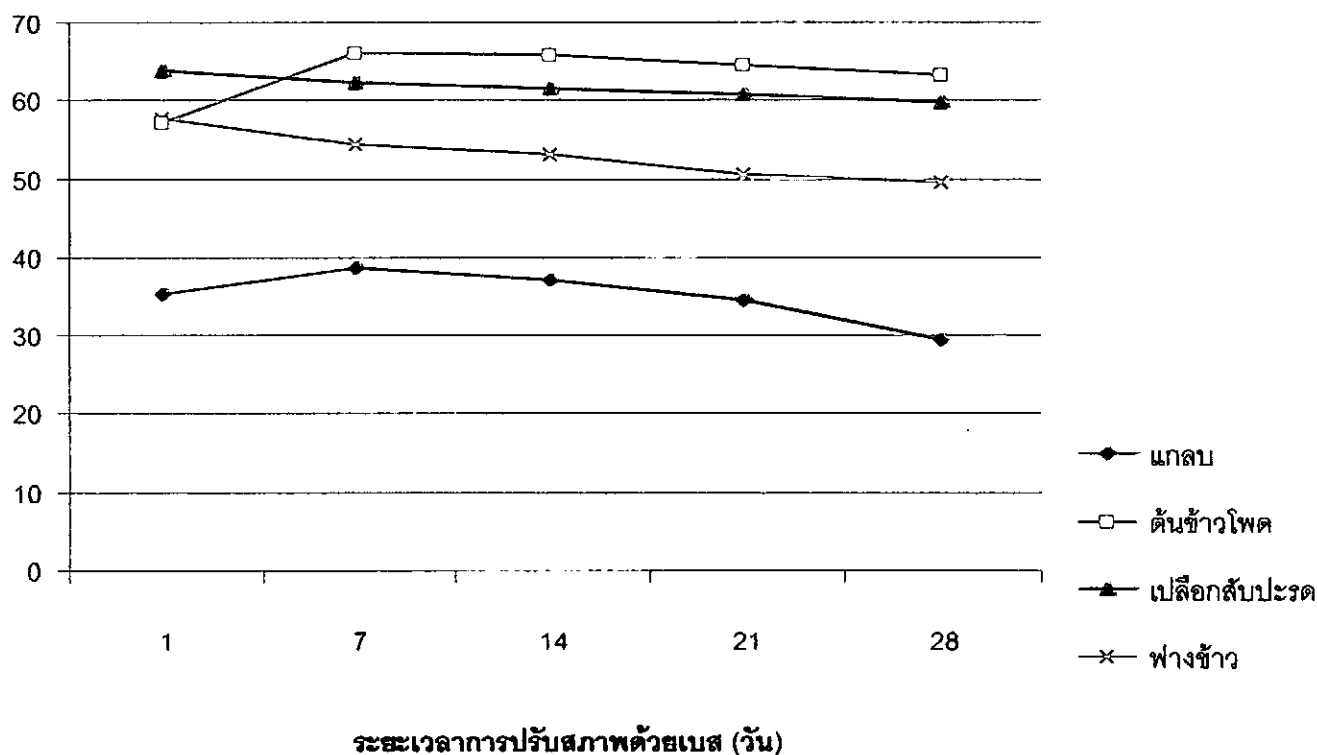
ภาพประกอบ 32 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

จากการทดลองพบว่า วัสดุแต่ละชนิดที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกัน (ภาพประกอบ 32)

- แกลบ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 14 วัน เท่ากับ 59.6 g/L
- ต้นข้าวโพด จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 14 วัน เท่ากับ 45.7 g/L
- เปลือกสับปะรด จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 7 วัน เท่ากับ 46.0 g/L
- ฟางข้าว จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 1 วัน เท่ากับ 63.8 g/L

4.2.6 วัสดุปรับสภาพด้วยโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)



ภาพประกอบ 33 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์

จากการทดลองพบว่า วัสดุแต่ละชนิดที่ปรับสภาพด้วยโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกัน (ภาพประกอบ 33)

- แกลบ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 7 วัน เท่ากับ 38.8 g/L
- ต้นข้าวโพด จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 7 วัน เท่ากับ 66.2 g/L
- เปลือกสับปะรด จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 7 วัน เท่ากับ 63.8 g/L
- ฟางข้าว จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดเมื่อปรับสภาพ 1 วัน เท่ากับ 57.8 g/L

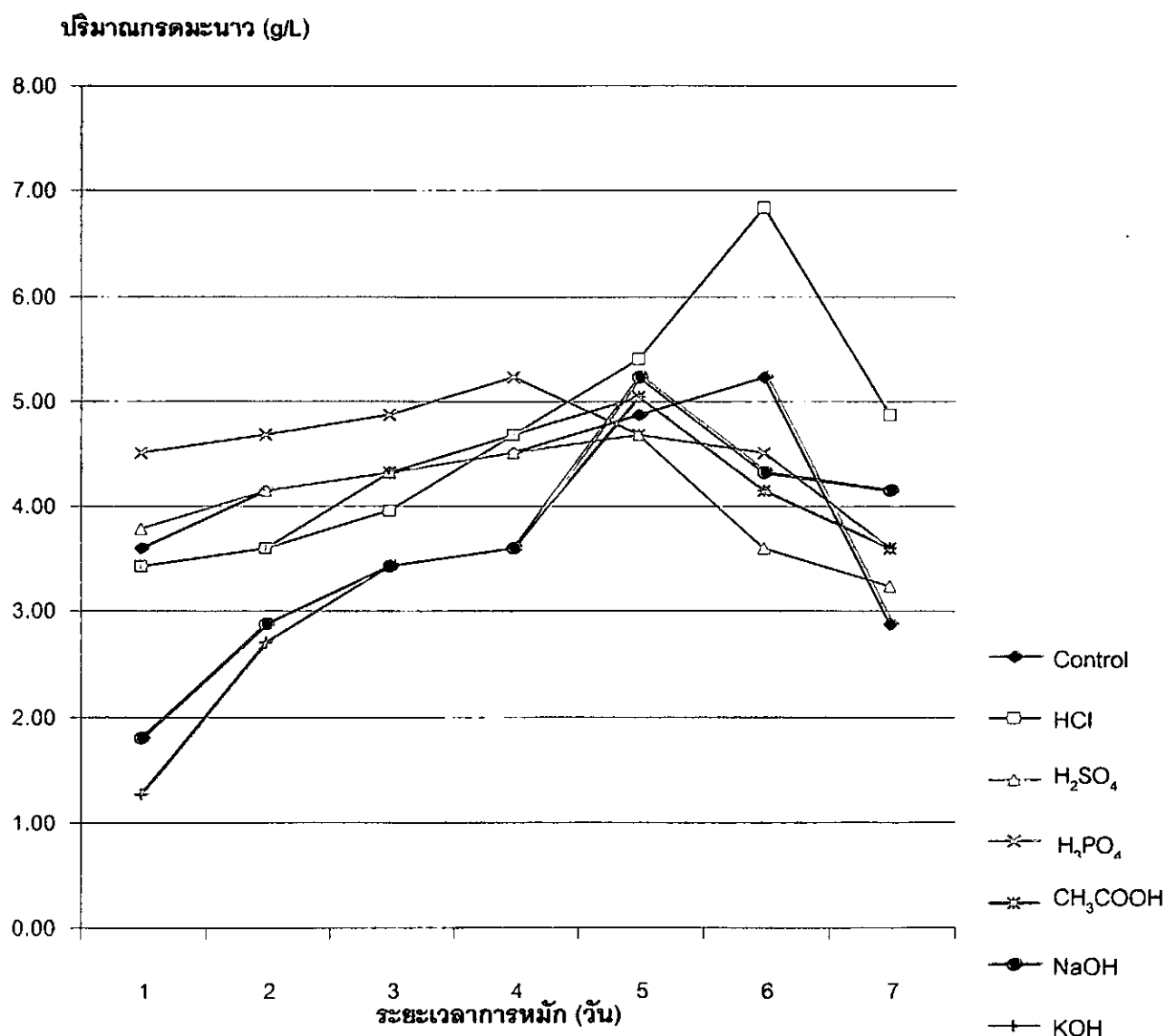
จากผลการทดลองปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทั้ง 4 ชนิด ด้วยกรด-เบส 6 ชนิด นำชุดที่วัดค่าน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดมาทำการหมักกรดมะนาว โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง ทำการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SS medium ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา

7 วัน ทำการวิเคราะห์ ปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน สามารถแสดงผลการทดลองเป็นตารางและกราฟ ดังต่อไปนี้

4.3 ผลการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในการหมักกรดมะนาว

4.3.1 ผลการทดลองการใช้แกลบ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในการหมักกรดมะนาว

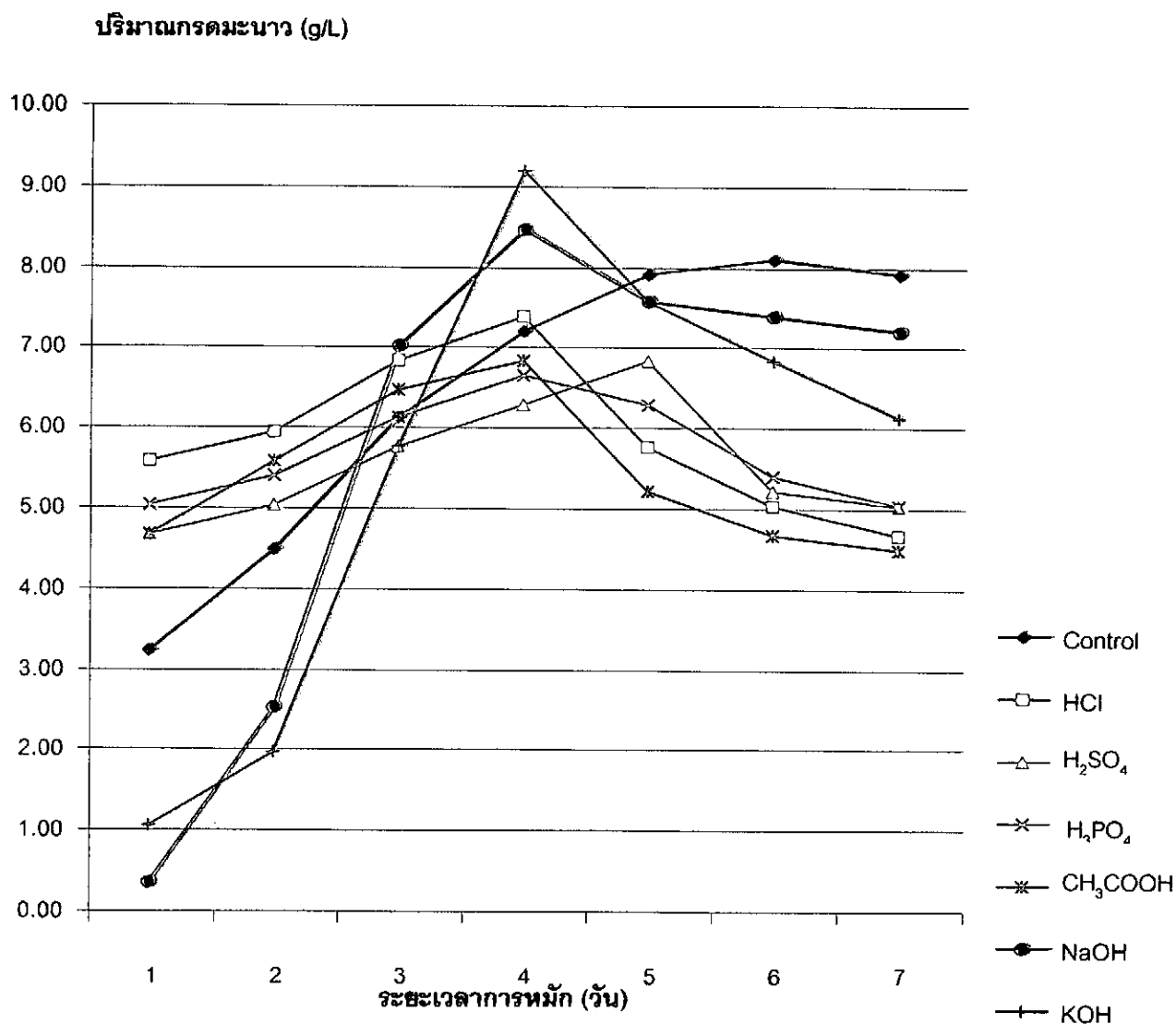
เมื่อนำแกลบไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 5 g วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันของการหมัก พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 6.85 g/L จากการใช้แกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วย HCl เป็นเวลา 7 วัน และหมักเป็นเวลา 6 วัน (ภาพประกอบ 34)



ภาพประกอบ 34 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตโดยมีแกลบเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

4.3.2 ผลการทดลองการใช้ฟางข้าว เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในการหมักกรดมะนาว

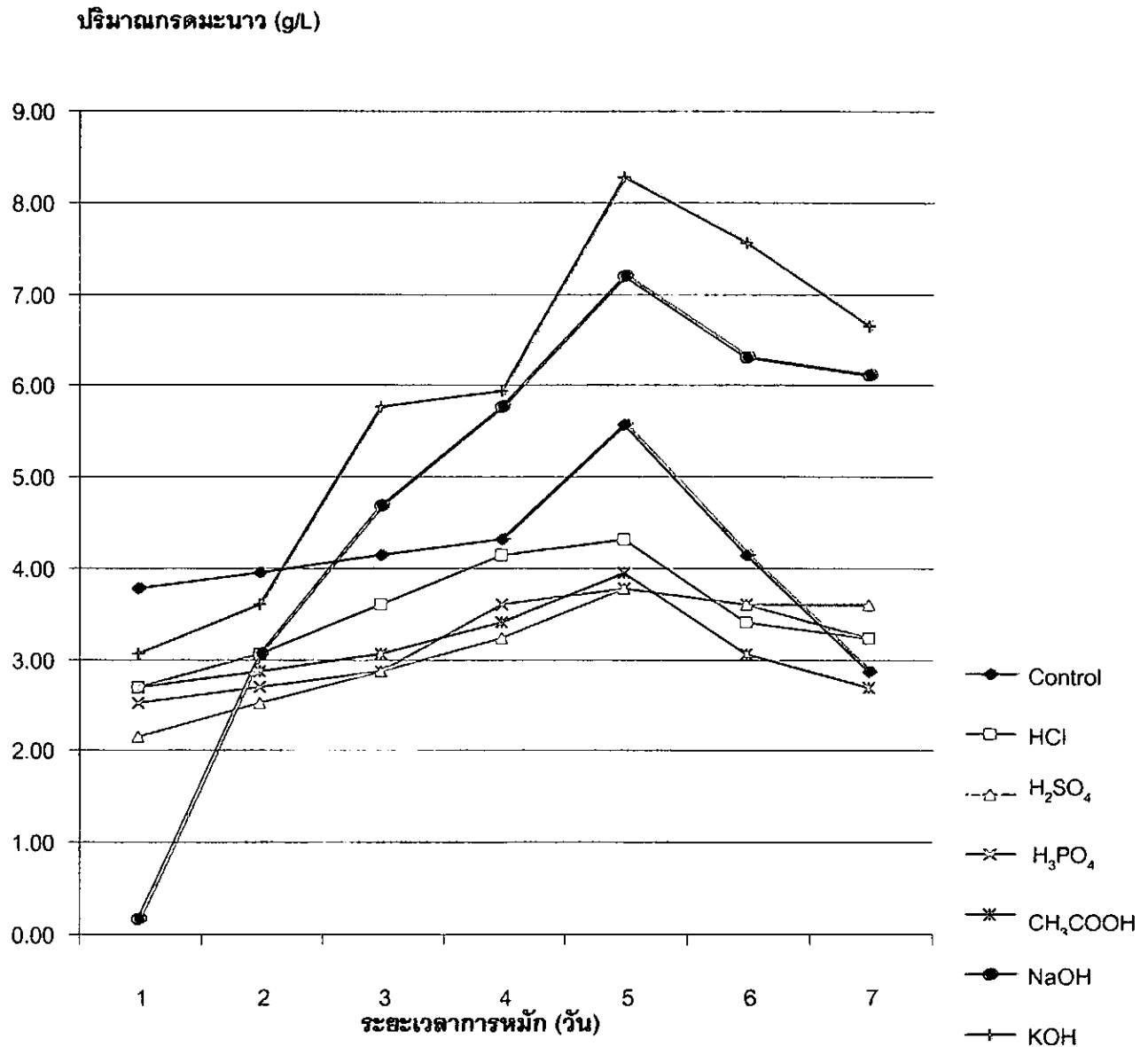
เมื่อนำฟางข้าวไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 5 g วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันของการหมัก พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 9.20 g/L จากการใช้ฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วย KOH เป็นเวลา 1 วัน และหมักเป็นเวลา 4 วัน (ภาพประกอบ 35)



ภาพประกอบ 35 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตโดยมีฟางข้าวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

4.3.3 ผลการทดลองการใช้ต้นข้าวโพดเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในการหมักกรดมะนาว

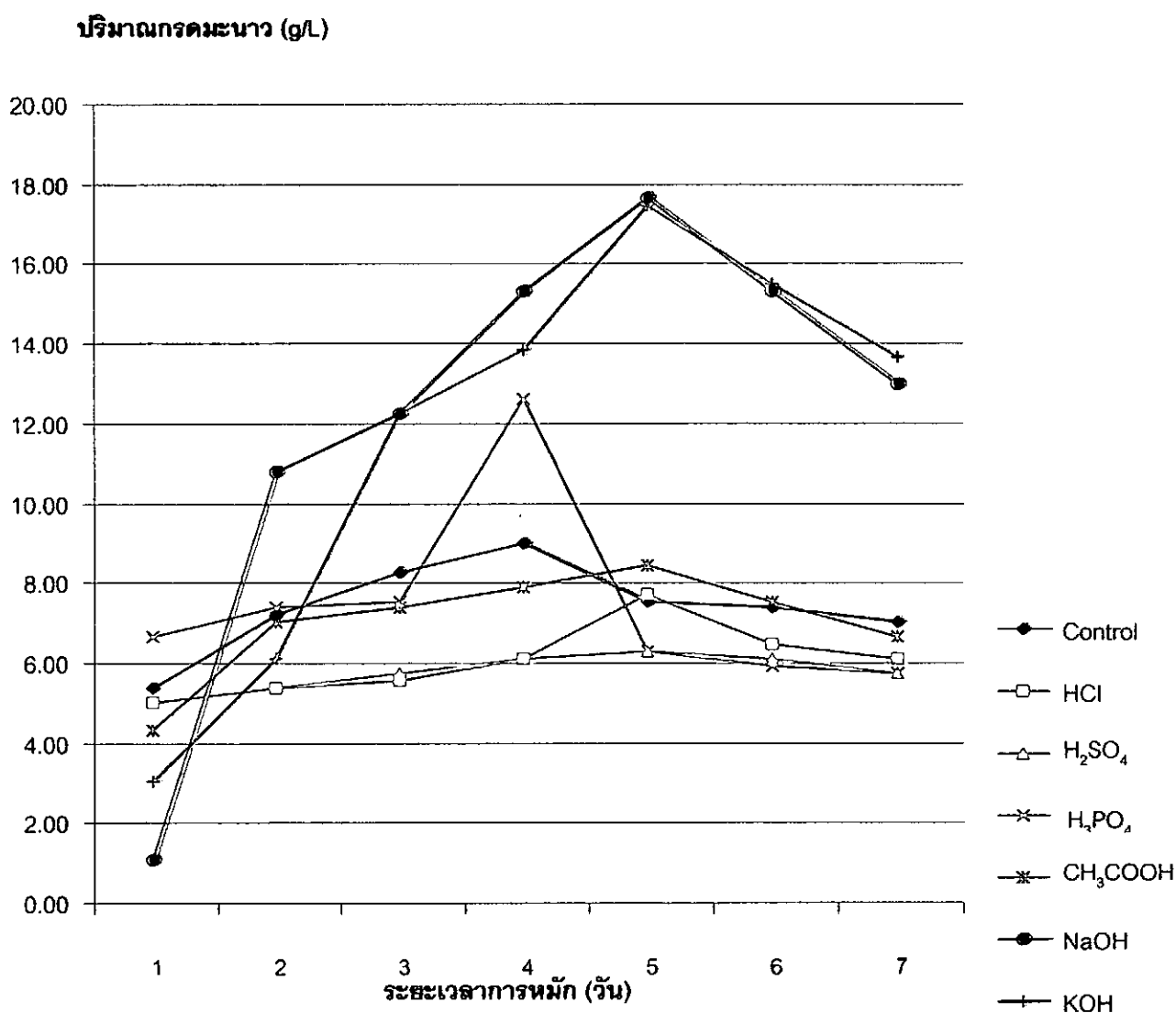
เมื่อนำต้นข้าวโพดไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 5 g วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันของการหมัก พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 8.29 g/L จากการใช้ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย KOH เป็นเวลา 7 วัน และหมักเป็นเวลา 5 วัน (ภาพประกอบ 36)



ภาพประกอบ 36 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตโดยมีต้นข้าวโพดเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

4.3.4 ผลการทดลองการใช้เปลือกสับปะรดเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในการหมักกรดมะนาว

เมื่อนำเปลือกสับปะรดไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อปริมาณ 5 g วัดปริมาณของกรดมะนาวและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันของการหมัก พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้สูงสุดคือ 17.67 g/L จากการใช้เปลือกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย NaOH เป็นเวลา 7 วัน และหมักเป็นเวลา 5 วัน (ภาพประกอบ 37)

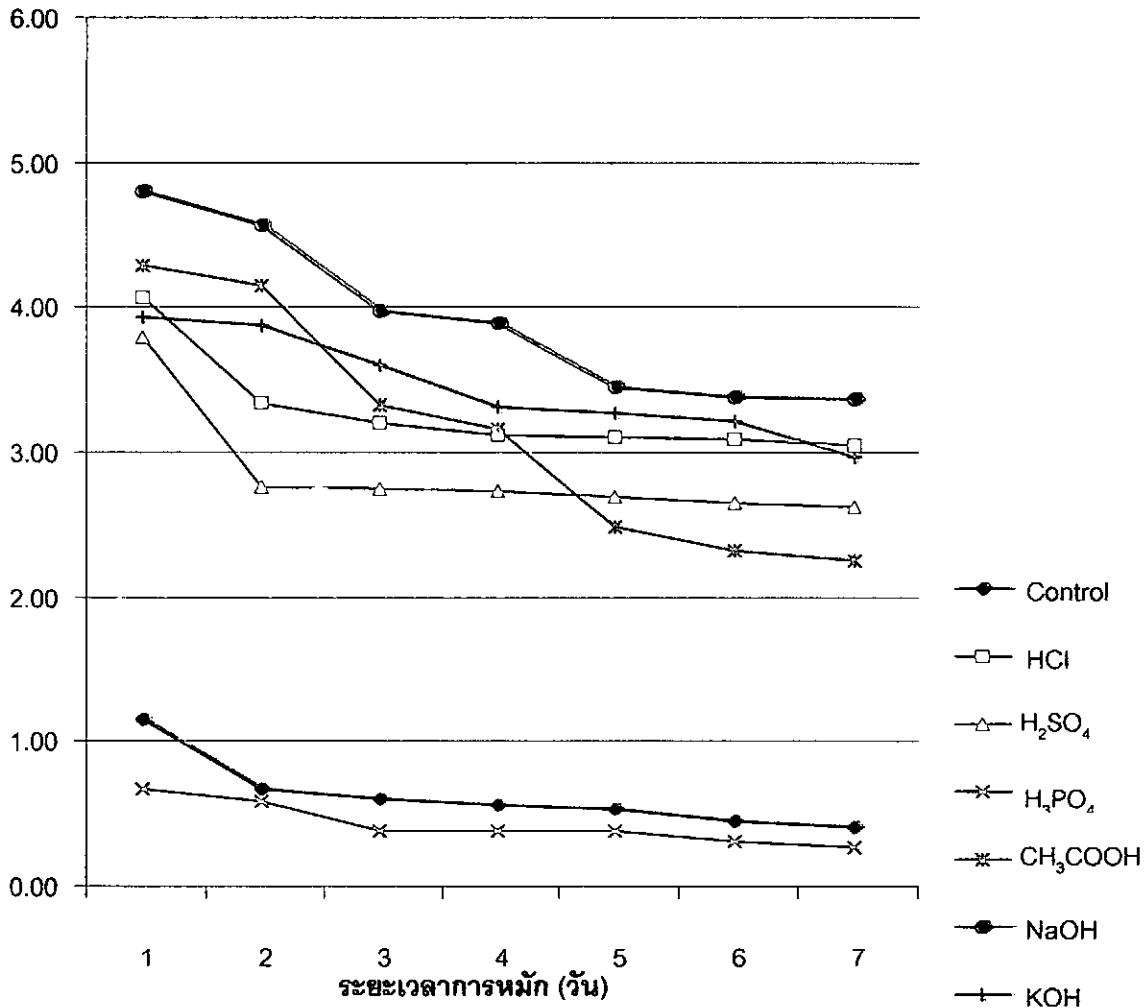


ภาพประกอบ 37 กราฟแสดงปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตโดยมีเปลือกสับปะรดเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

4.4 ผลการวัดค่าน้ำตาลรีดิวซ์ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no. 2

4.4.1 ผลการวัดค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้แกลบเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)



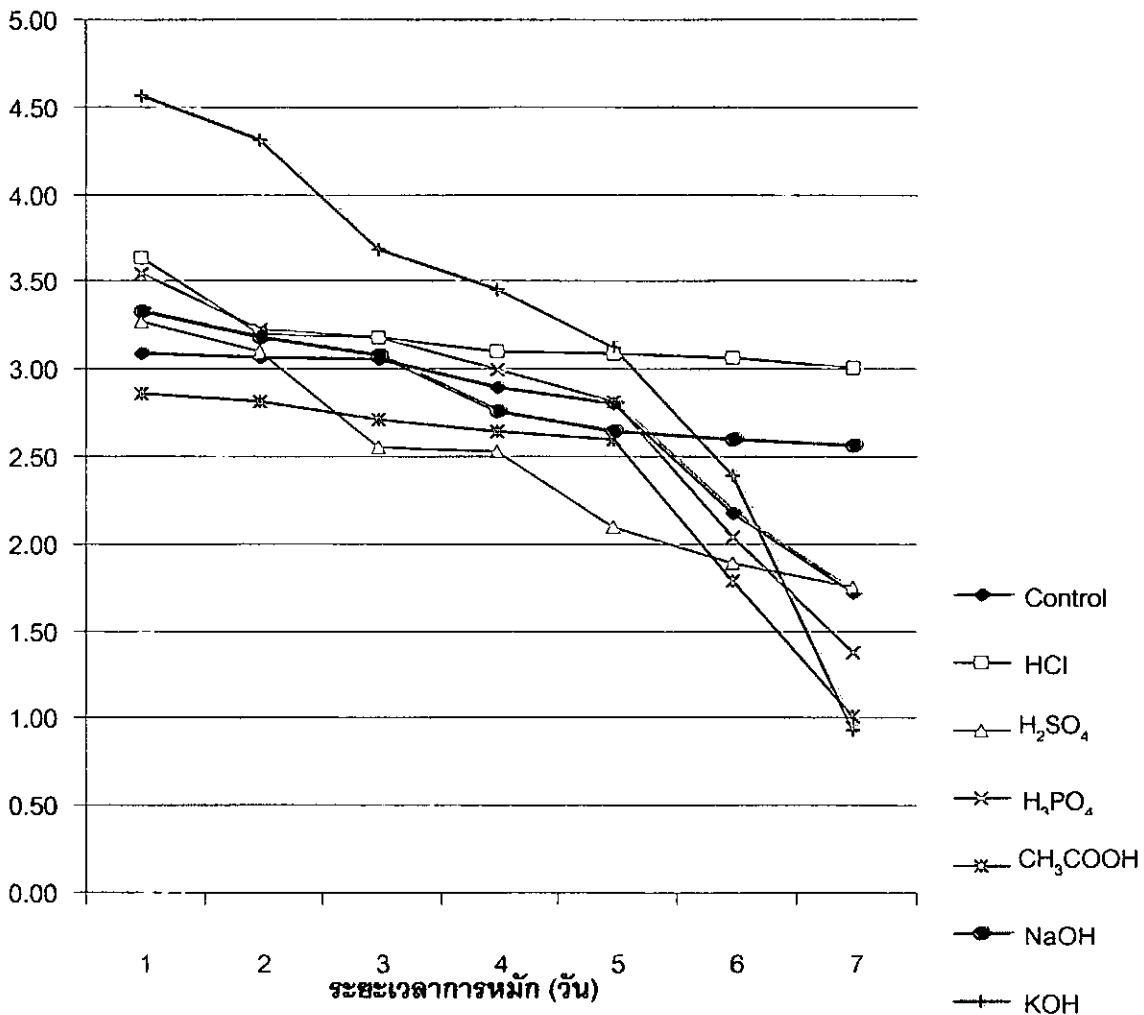
ภาพประกอบ 38 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อใช้แกลบในการหมัก

จากการทดลองพบว่า เมื่อนำแกลบมาผ่านการปรับสภาพแล้วนำมาหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no. 2 เป็นเวลา 7 วัน ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 1 จะมีปริมาณมากที่สุดแล้วจะลดลงทุกวัน

แกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วย NaOH จะให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุด และแกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วย H₃PO₄ จะให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุด

4.4.2 ผลการวัดค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)



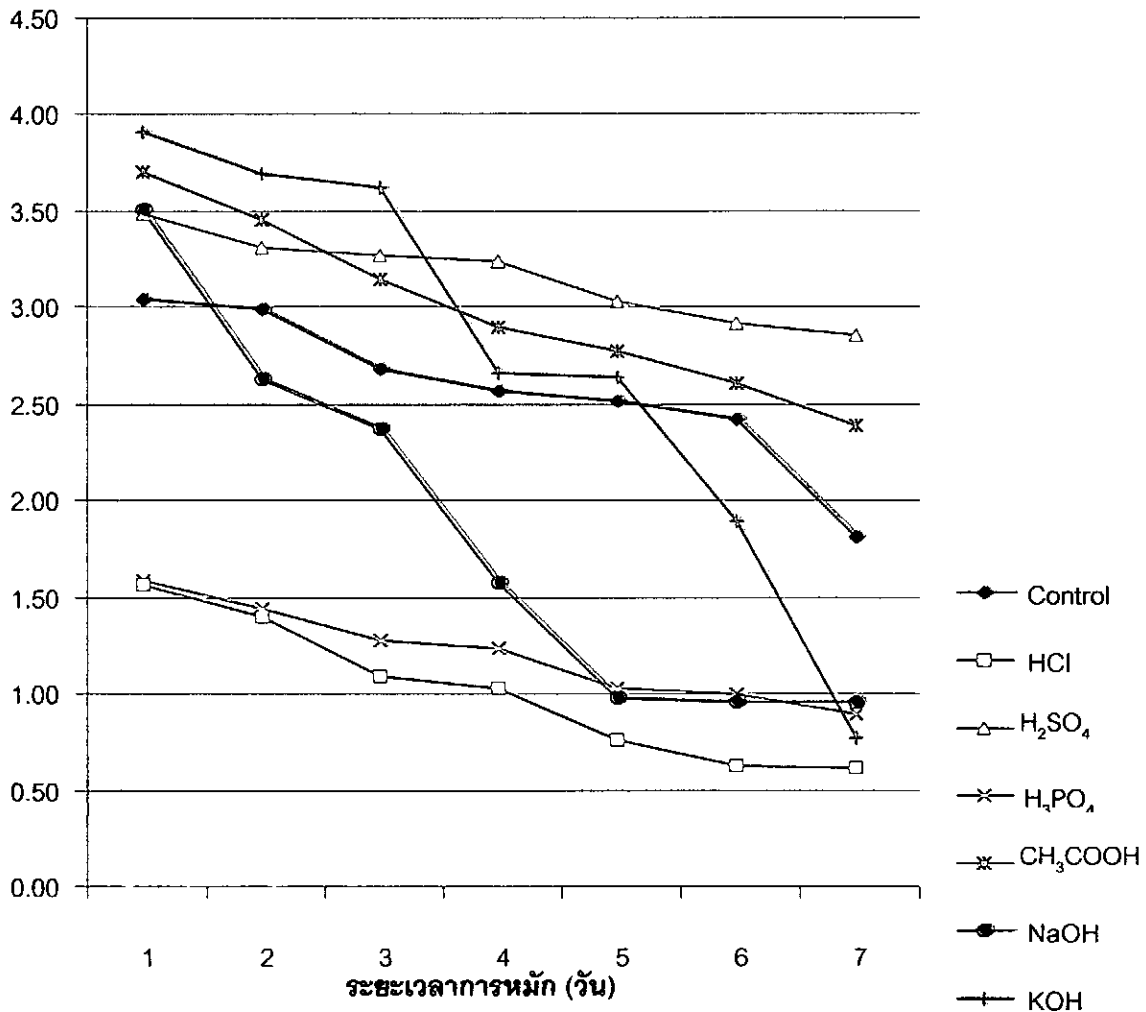
ภาพประกอบ 39 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือนเมื่อใช้ฟางข้าวในการหมัก

จากการทดลองพบว่า เมื่อนำฟางข้าวมาผ่านการปรับสภาพแล้วนำมาหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no. 2 เป็นเวลา 7 วัน ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 1 จะมีปริมาณมากที่สุดแล้วจะลดลงทุกวัน

ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วย KOH จะให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุด และฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วย CH₃COOH จะให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุด

4.4.3 ผลการวัดค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้ต้นข้าวโพดเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)



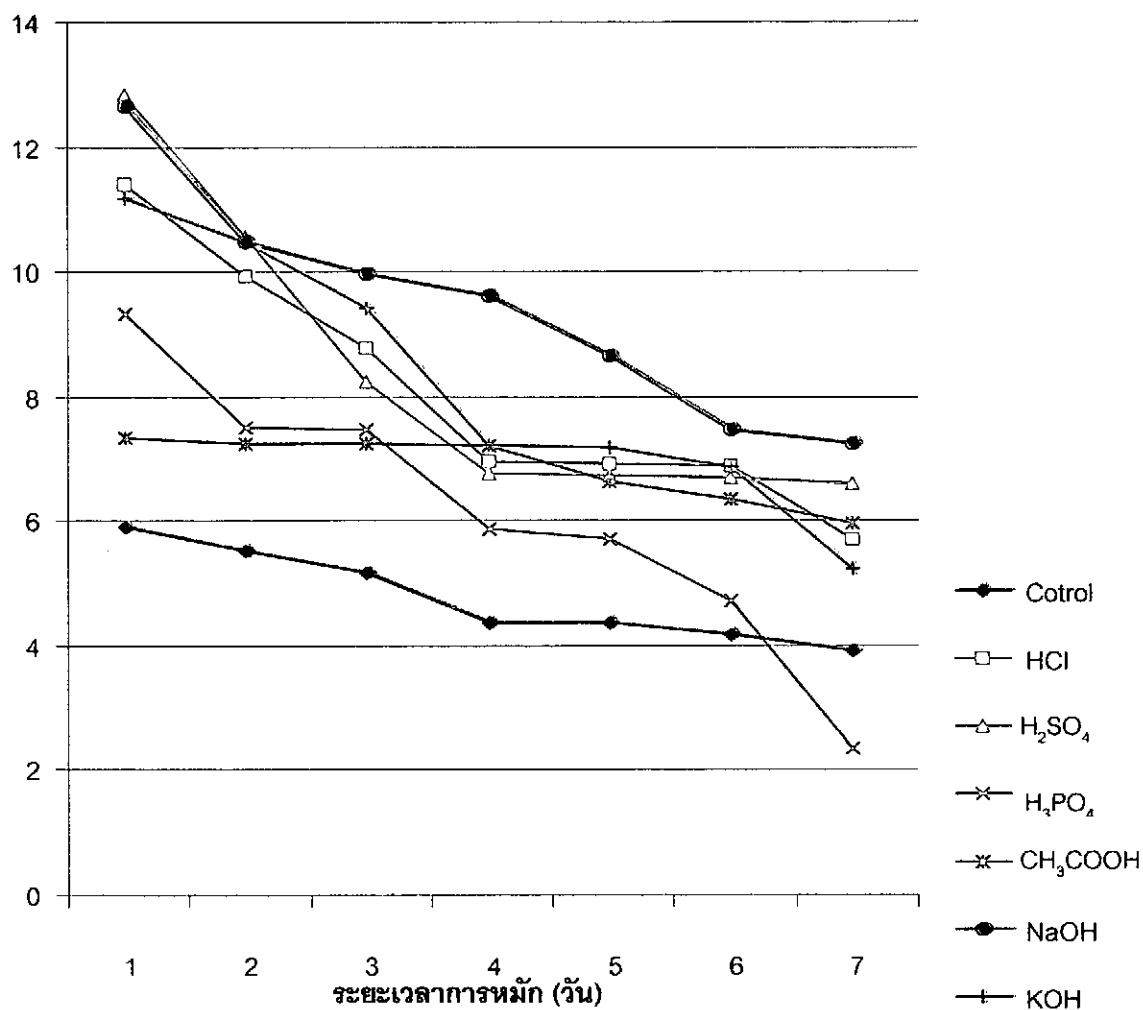
ภาพประกอบ 40 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อใช้ต้นข้าวโพดในการหมัก

จากการทดลองพบว่า เมื่อนำต้นข้าวโพดมาผ่านการปรับสภาพแล้วนำมาหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no. 2 เป็นเวลา 7 วัน ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 1 จะมีปริมาณมากที่สุดแล้วจะลดลงทุกวัน

ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย KOH จะให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุด และต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย HCl จะให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุด

4.4.4 ผลการวัดค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้เปลือกสับปะรดเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)



ภาพประกอบ 41 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อใช้เปลือกสับปะรดในการหมัก

จากการทดลองพบว่า เมื่อนำเปลือกสับปะรดมาผ่านการปรับสภาพแล้วนำมาหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no. 2 เป็นเวลา 7 วัน ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 1 จะมีปริมาณมากที่สุดแล้วจะลดลงทุกวัน

เปลือกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย H₂SO₄ จะให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุด และเปลือกสับปะรดไม่ผ่านการปรับสภาพจะให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุด

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 4 ชนิด คือ แกลบ ฟางข้าว ต้นข้าวโพด และเปลือกสับปะรดมาทำการปรับสภาพด้วยวิธีหั่น หรือตัด ให้ได้รูปร่างและขนาดตามความเหมาะสมของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิด จะได้วัสดุที่มีลักษณะทางกายภาพแตกต่างกัน 4 รูปแบบ คือ แกลบ ตามสภาพวัสดุที่ดั้งเดิม ฟางข้าว และต้นข้าวโพดที่หั่นได้ความยาว 1 cm. และเปลือกสับปะรดที่หั่นให้ได้ขนาด 1 X 1 cm. มาทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพด้วยกรด-เบส 6 ชนิด ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก กรดอะซิติก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 2 M เป็นเวลา 1 7 14 21 และ 28 วัน โดยอัตราส่วนของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่อสารละลายเป็น 8:100 (W:V)

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเมื่อนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Cellulase ของเชื้อรา *Aspergillus niger* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45 °C พบว่า เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่อเอนไซม์ เป็น 1:10 (W:V) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงสุดในแต่ละชนิดของกรด-เบส จะอยู่ภายใน 1-14 วัน

ตาราง 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงสุดจากวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพ

ชนิดของสารที่ใช้ในการปรับสภาพ	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงสุด			
	แกลบ	ฟางข้าว	ต้นข้าวโพด	เปลือกสับปะรด
กรดไฮโดรคลอริก	40.6 (7 วัน)	47.7 (1 วัน)	55.1 (14 วัน)	40.8 (14 วัน)
กรดซัลฟูริก	37.5 (7 วัน)	50.5 (7 วัน)	76.2 (7 วัน)	42.7 (14 วัน)
กรดฟอสฟอริก	10.3 (7 วัน)	48.3 (7 วัน)	40.0 (1 วัน)	35.9 (14 วัน)
กรดอะซิติก	33.2 (1 วัน)	49.9 (7 วัน)	74.7 (1 วัน)	77.5 (7 วัน)
โซเดียมไฮดรอกไซด์	59.6 (14 วัน)	63.8 (1 วัน)	45.7 (14 วัน)	46.0 (7 วัน)
โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์	38.2 (7 วัน)	58.8 (1 วัน)	66.2 (1 วัน)	63.8 (1 วัน)

เมื่อนำวัสดุเหลือใช้ปริมาณ 5 g ที่ผ่านการปรับสภาพและวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดไปหมักโดย เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบ Semi-solid culture ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SS medium 15 mL วัดปริมาณกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน

พบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการใช้วัสดุที่ปรับสภาพแล้วแต่ละชนิด มีความแตกต่างกัน โดยการใช้แกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริกเป็นเวลา 7 วัน จะได้ปริมาณกรดมะนาว 6.85 g/L ในวันที่ 6 ของการหมัก การใช้ฟางข้าว ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลา 1 วัน จะได้ปริมาณกรดมะนาว 9.20 g/L ในวันที่ 4 ของการหมัก การใช้ต้นข้าวโพด ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลา 7 วัน จะได้ปริมาณกรดมะนาว 8.29 g/L ในวันที่ 5 ของการหมัก และการใช้เปลือกสับปะรด ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลา 7 วัน จะได้ปริมาณกรดมะนาว 17.67 g/L ในวันที่ 5 ของการหมัก

เมื่อนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการหมักเป็นเวลา 7 วัน มาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จะพบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะสูงสุดในวันที่ 1 และลดลงทุกวัน เป็นเช่นนี้ทุกชุด เป็นการยืนยันว่า เชื้อราใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไปผลิตกรดมะนาวจริง

5.2 อภิปรายผลการทดลอง

จากงานวิจัยที่ผ่านมา การผลิตกรดมะนาวในการเจริญแบบ Semi-solid culture มักจะใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นตัวพา ดังเช่น คิริมูระ ;และคณะ (Kirimura ;and other. 1999:573-577) ได้ใช้ขานอ้อย (ไม่ระบุขนาดและปริมาณ) เป็นตัวพา ในการผลิตกรดมะนาว โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบ Semi-solid culture โดยมี น้ำตาล Xylose และ Arabinose เป็นสารต้นตอคาร์บอน และชะไมพร. (2541) ได้ทำการใช้ขานอ้อยเป็นตัวพา ทำการหมักกรดมะนาวโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบ Semi-solid culture ที่มี กลูโคส 140 g/L เป็นสารต้นตอคาร์บอน พบว่าการใช้ฟางข้าวเป็นตัวพาจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวได้ ยังพบว่ามีกรดมะนาวที่ได้บางส่วนมาจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ดังนั้น หากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านั้นมาเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ น่าจะให้ผลการหมักกรดมะนาวได้ในระดับหนึ่ง จึงได้ทำการศึกษาหาวิธีที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการนำวัสดุเหลือใช้เหล่านั้นมาผลิตกรดมะนาว

เมื่อศึกษาผลที่ได้จากการทดลองโดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพทั้งทางกายภาพ และทางเคมีด้วย กรด-เบส เพื่อเป็นสารต้นตอคาร์บอนพบว่า ประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นมากกว่าไม่ปรับสภาพวัสดุเหลือใช้เหล่านั้น เนื่องจากการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจะเพิ่มความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยาของเชื้อกับวัสดุให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจาก การปรับสภาพจะช่วยลดสิ่งกีดขวางการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 และยังทำให้การซึมซับอาหารเลี้ยงเชื้อมีมากขึ้น ทั้งยังมีสภาพที่ เหมาะสมในการให้ Mycelium ของเชื้อราได้ยึดเกาะและเจริญเติบโต มีความสามารถในการเก็บกักความชื้น และองค์

ประกอบทางเคมีบางอย่างที่มีอยู่ในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านั้น ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวมากขึ้น

การทดลองปรับสภาพฟางข้าวด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ยังคงมีการศึกษาต่อไปโดยหาสภาวะที่ดีที่สุดในการปรับสภาพ ระวังวรรณ. (2538) ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 2 M ต้มกับฟางข้าวที่อุณหภูมิต่างกัน และใช้เวลาต่างกัน พบว่า การต้มฟางข้าวกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 1 วัน จะให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด แต่ในความเป็นจริง การปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อผลิตกรดมะนาว ไม่สามารถใช้สารเคมี กรด-เบส ที่ความเข้มข้นสูงพร้อมกันกับการใช้อุณหภูมิสูง เพราะจะทำให้เกิดการกัดกร่อนของเครื่องมือ และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก จึงมีงานวิจัยหลายชิ้นที่มีการปรับความเข้มข้นของกรด-เบสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวให้ดีขึ้น

จากรายงานต่างๆ พบว่าการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ภายใต้การต้มด้วยความดัน ได้มีการศึกษามาก่อนแล้ว โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายมวลชีวภาพ ซึ่งผลที่ได้รับจะคล้ายๆกัน แต่อย่างไรก็ตามจุดประสงค์ของการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ก็คือ ทำให้วัสดุอยู่ในสภาพที่ง่ายต่อการย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูโลสมากขึ้น เช่น รักฤดี. (2540) พบว่าการปรับสภาพขานอ้อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 20 % อุณหภูมิ 121 °C ปริมาณของกรดมะนาวจะสูงกว่าการปรับสภาพที่ความเข้มข้น 5% หรือ 10% ที่อุณหภูมิเดียวกัน แต่ผลการทดลองที่ได้ก็ไม่ดีเท่าที่ควร คือปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำ ทั้งที่ตามปกติแล้วขานอ้อยจะมีปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์สูงอยู่แล้ว ทั้งนี้เนื่องมาจากการล้างขานอ้อยทำให้สูญเสียน้ำตาลรีดิวซ์ไปอย่างมาก ส่งผลให้ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ต่ำ การศึกษาการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้ กรด-เบส ที่ความเข้มข้นและบ่มด้วยระยะเวลาที่เหมาะสม จะสามารถนำไปใช้จริงได้และให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวมากกว่า

การปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วย กรด-เบส ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความแตกต่างของเวลาเป็น 1 7 และ 14 วันนั้น พบว่ามีประสิทธิภาพในการให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดทั้ง แกลบ ฟางข้าว ต้นข้าวโพด และเปลือกสับปะรด ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-เบสทั้ง 6 ชนิด ทั้งนี้ยังขึ้นกับวิธีการล้างซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มากหรือน้อยต่างกัน เพราะการล้างจะทำให้สูญเสียน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้กรดก็เช่นเดียวกัน จากการทดลองจะพบว่า กรดแต่ละชนิดมีความสามารถในการให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีมากขึ้น และสามารถนำหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 เพื่อให้ผลผลิตเป็นกรดมะนาวได้ดีในระดับหนึ่งซึ่งเป็นปริมาณที่มากพอสมควร นอกจากนี้กรดจะมีราคาต่ำกว่าเบสมาก และเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 ยังสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดมากกว่าเบส

ในส่วนขององค์ประกอบทางเคมีที่มีในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดนั้น เป็นส่วนที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ การนำวัสดุเหล่านั้นมาเป็นตัวพา เพราะวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้ มีคุณสมบัติซึ่งแสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบทางเคมีบางอย่างที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว นั่นคือความสามารถในการเป็นสารต้นตอคาร์บอนของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยที่วัสดุเหล่านี้มีสารต้นตอคาร์บอนที่เชื้อรานำไปใช้ได้คือ วัสดุ ที่มีการผลิตกรดมะนาวได้ในปริมาณมาก จากงานวิจัยของ มนัส. (2547) พบว่าปริมาณของกรดมะนาว แปรผันตรงกับปริมาณของตัวพา ได้แก่ ฟางข้าว และ ชังข้าวโพด ในขณะที่ตัวพาที่ไม่มีสารต้นตอคาร์บอนที่เชื้อรานำไปใช้ได้ คือ ตัวพา ที่เมื่อไม่เติมสารต้นตอคาร์บอนอื่นในการหมัก จะมีการผลิตกรดมะนาวได้ในปริมาณน้อย มีค่าเกือบคงตัว และไม่ขึ้นกับปริมาณของตัวพา ได้แก่ แกลบ ผักตบชวา ชานอ้อย และกากมะพร้าว ทั้งนี้จากการศึกษาทำให้เชื่อได้ว่าสารต้นตอคาร์บอนที่เชื้อราใช้นั้นเป็นสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเกาะอยู่บริเวณผิวของตัวพา โดยไม่ละลายไปกับน้ำเมื่อทำการล้าง แต่จะละลายออกมาหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) นั่นคือ *Aspergillus niger* Yang no.2 จะให้มีสารต้นตอคาร์บอนกระจายในทุกบริเวณที่มีตัวพา ทำให้เชื้อราเจริญได้อย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะนำตัวพาเหล่านั้นมาเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน จะทำให้ไม่เกิดการสิ้นเปลืองทรัพยากรเสียเปล่า

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการสังเกตระหว่างการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย กรด-เบส ระยะเวลาในการแช่วัสดุแต่ละชนิด การล้างวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพให้เป็นกลาง มีความสำคัญอย่างยิ่งในการทดลองการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หากสามารถใช้สารละลายกรด-เบสที่แช่แล้วมาทำการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอีก จะยิ่งลดต้นทุนในการผลิตมากขึ้น วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งมีราคาถูกนี้ หากนำมาใช้เป็นสารต้นตอคาร์บอนด้วยวิธีการต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่นำมาเจริญร่วมกัน (Co-culture) เพื่อย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรให้เป็นสารต้นตอคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาว เพื่อให้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรนี้เป็นทั้งตัวพาและสารต้นตอคาร์บอน ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์มากเมื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในประเทศไทยมีมากมาย การวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาพัฒนากระบวนการผลิตแบบ Semi-solid culture ที่สามารถประยุกต์ใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม เพราะปริมาณกรดซิตริกที่ได้มีปริมาณมากพอสมควร จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสภาวะที่ใช้ในการหมัก (Optimization) สภาวะที่เหมาะสมในการใช้กรดในการปรับสภาพ และต้นทุนในการใช้ตัวพาและสารต้นตอคาร์บอนแต่ละชนิดต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กำเนิด สุภณวงษ์. (2532). จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- พิทยากร ลิ้มทอง. (2004). ผลของวิธีการระบายอากาศต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมักจากฟางข้าว รายงานผลการวิจัยการปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรีย์วัตถุ. กรมพัฒนาที่ดิน : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- มนัส สุวามิน. (2547). อิทธิพลของตัวพาต่อการผลิตกรดมะนาวของ *Aspergillus niger* Yang no.2 ในการเจริญแบบกึ่งแข็ง. ปรินญานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพมหานคร : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- ระวีวรรณ แก้วกล้า. (2538). การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เคมีเทคนิค). กรุงเทพมหานคร : บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- รักฤดี สารธิมา. (2540). การผลิตกรดมะนาวจากชานอ้อยที่ผ่านการปรับแต่งแล้วโดยราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* Yang no.2. ปรินญานิพนธ์ วท.บ. (ชีวเคมี). ขอนแก่น : บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. ถ่ายเอกสาร.
- สมศักดิ์ สว่างบิน. (2542). การผลิตกรดมะนาวจากวัสดุการเกษตรโดยเชื้อรา *Aspergillus niger*. โครงการวิจัยของภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Alexander, M. (1977). *Introduction to Soil Microbiology*. 2nd ed. New York : John Wiley and Sons, Inc.
- Bertoldi, M., G. Vallini, A. Pera and F. Zocconi. (1982). "Comparison of three window compost systems," *Biocycle*. 23(2) : 45-50.
- Bertoldi, M., G. Vallini and A. Pera. (1983). "The biology of composting : A review Waste Manage". *Res*. 1 : 157-176.
- Brownell, H.H. & Saddler, J.N. (1987). "Steam Preatment of Lignocellulosic Material for Enhanced Enzymatic Hydrolysis," *Biotechnol. Bioeng*. 29 : 228-235.

- Chaudhary, K.K., Lakshminarayana, S., Ethiraj & Tauro, P. (1978). "Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Indain Cane Molasse by Solid state Fermentation," *J. Fermentation. Technol. Jpn.* 56 : 554.
- Crawford, J.H. (1983). "Composting of agricultural wastes". *A Review. Process Biochem.* 18 : 14-18.
- Curried, J.N., (1972). "The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*". *Biol. Chem.* 31 : 15-67.
- Doneffer, E., Adelefe, I.O.A. & Jones, T.A.O.C. (1996). "Effect of Urea Supplementation of the Nutritive Value of NaOH-Treated Oat Straw," *Advan. Chem. Ser.* 95 : 328-342.
- Gupta, J.K., Heding, L.G. & Jangensen, O.B. (1976). "Effect of Sugar, pH and Ammonium Nitrate on Formation of Citric Acid by *Aspergillus niger*," *Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 23 : 63.
- Hamilton, T.J. et al. (1984). "Pretreatment Crop by Sodium hydroxide," *Biotech.* 26 : 781-787.
- Han, Y.M. & Callihan, C.D. (1974). "Cellulose Fermentation : Effect of Substrate Pretreatment on Microbial Growth," *Applied. Microbiology.* 27 : 159-165.
- Hossion, M., Brooks, J.D. & Maddox, I.S. (1983). "Production of citric acid from whey peament by fermentation using *Aspergillus niger*," *Newzealand J.Dairy Sci. Technol.* 19 : 161-168.
- Hossion, M., Brooks, J.D. & Maddox, I.S. (1984). "The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*". *Appl. Microbiol.* 19 : 393-394.
- Kirimura, K. et al. (1992). "Citric acid production by 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Aspergillus niger*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36 : 573-577.
- Miall, L.M., (1978). *Organic acid in economic microbiology*. Academic Press, London : 2, 47-119.

- Paquat , M. et al. (1984). *Anaerobic Digestion and Carbohydrate Hydrolysis of Waste*. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Poincelot, R.P. (1975). *The biochemistry and methodology of composting. The Connecticut Agricultural Experiment Station*. New Haven Bulletin. 754 : 1-17.
- Prescott, S.C. & Dunn, C.G. (1949). *The Citric Acid Fermentation. Industrial Microbiology*. New York: Mc – Graw Hill.
- Prescott, S.C. & Dunn, C.G. (1959). *Industrial Microbiology*. 3rd ed. London : McGraw – Hill.
- Rohr, M., stadler, P.J., Salzbrunn, W.D.J. and Kubicek, C.P. (1976). "An improved method for characterization of citrate production by conidia of *Aspergillus niger*". *Biotechnol. Lett* . 1 : 281-286.
- Tengerdy, R.P. (1985). "Solid substrate fermentation". *Trends in Biotech*. 3(4) : 96-99.

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อรา (Media)

1.1 Czapek-Dox medium

เป็นอาหารสูตรปรับต่ำ (Basal minimum medium) สำหรับเพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อ ปรับ pH เป็น 6.0 ก่อนเติมผงวุ้น (Agar) 20 g/L ลงไปในอาหารก่อนทำการฆ่าเชื้อ

ตาราง 2 Czapek-Dox minimum medium (Solution)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (g/L)
Glucose	30
NaNO ₃	2
K ₂ HPO ₄	1
KCl	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01

1.2 Semi-solid culture medium (SS Medium)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการหมักให้เกิดกรดมะนาว เป็นอาหารสูตรควบคุมมีแร่ธาตุบางชนิดในปริมาณที่จำกัด เพื่อทำให้เกิดการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด โดยต้องปรับ pH ของ SS Medium ให้เป็น 4.25 ก่อนนำไปฆ่าเชื้อ

ตาราง 3 SS Medium (Solution)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (g/L)
C-Source (Glucose or Starch)	140
KH ₂ PO ₄	10
NH ₄ NO ₃	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.02

2. การเตรียมสารละลาย

2.1 สารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS Reagent)

1. กรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก	10	g
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์	16	g
3. โฟสเฟอรัสโซเดียมไฮดรอกไซด์	300	g
4. น้ำกลั่น	1000	mL

นำส่วนประกอบข้างต้นมาเทรวมกันในขวดกันกลม แล้วทำการ Reflux เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
ทิ้งให้เย็น เก็บสารละลายที่เตรียมได้ในขวดสีชา

2.2 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ชั่งกลูโคส 25 mg ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 25 mL จะได้กลูโคสที่มีความเข้มข้น 1 g/L นำไปเตรียมสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 100–600 $\mu\text{g/mL}$

ทำการพามาตรฐานโดยเติมสารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 1 mL ลงในสารละลายกลูโคส 1 mL เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที แล้วนำมาแช่น้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL ลงไป เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จะใช้สำหรับไตเตรทหาความเข้มข้นของกรดมะนาวใน Culter filtrate ซึ่งการหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำได้โดยการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน KHP (Potassium hydrogen phthalate) โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

2.4 สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 M pH 4.5

2.4.1 ชั่งกรดมะนาว 9.62 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 L

2.4.2 ชั่งไตรโซเดียมซิเตรทไดไฮเดรต 14.70 g ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 L

จากนั้นใช้สารละลายข้อ 2.4.1 เป็นหลัก แล้วใช้สารละลายข้อ 2.4.2 เป็นตัวปรับ pH เป็น pH 4.5

3. ตารางผลการทดลอง

3.1 คำนํ้าตาลรีดิวซ์ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ปรับสภาพด้วยกรด-เบส

ตาราง 4 ปริมาณนํ้าตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวัสดุปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริก

ระยะเวลาในการ ปรับสภาพ (วัน)	Conc. (g/L)			
	แกลบ	ข้าวโพด	เปลือกสับปะรด	ฟางข้าว
1	38.9	44.1	35.1	47.7
7	40.6	46.0	37.0	46.3
14	36.7	55.1	40.8	45.4
21	35.2	47.1	25.4	42.5
28	28.9	40.5	24.6	38.8

ตาราง 5 ปริมาณนํ้าตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวัสดุปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก

ระยะเวลาในการ ปรับสภาพ (วัน)	Conc. (g/L)			
	แกลบ	ข้าวโพด	เปลือกสับปะรด	ฟางข้าว
1	33.0	68.5	26.5	49.8
7	37.5	76.2	27.1	50.5
14	19.9	74.1	42.7	46.2
21	17.9	60.2	24.2	43.8
28	17.0	27.5	23.3	40.2

ตาราง 6 ปริมาณนํ้าตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวัสดุปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก

ระยะเวลาในการ ปรับสภาพ (วัน)	Conc. (g/L)			
	แกลบ	ข้าวโพด	เปลือกสับปะรด	ฟางข้าว
1	8.8	40.0	33.0	45.8
7	10.3	27.8	33.5	48.3
14	10.1	26.4	35.9	46.6
21	9.9	24.6	28.4	43.1
28	9.8	16.1	21.9	40.5

ตาราง 7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวัสดุปรับสภาพด้วยกรดอะซิติก

ระยะเวลาในการ ปรับสภาพ (วัน)	Conc. (g/L)			
	แกลบ	ข้าวโพด	เปลือกสับปะรด	ฟางข้าว
1	33.2	74.7	71.9	47.2
7	31.9	57.5	77.5	49.9
14	29.7	57.1	71.6	43.5
21	29.0	53.3	69.2	41.0
28	28.1	38.5	56.6	37.6

ตาราง 8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวัสดุปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

ระยะเวลาในการ ปรับสภาพ (วัน)	Conc. (g/L)			
	แกลบ	ข้าวโพด	เปลือกสับปะรด	ฟางข้าว
1	54.2	29.0	28.0	63.8
7	56.0	29.5	46.0	54.4
14	59.6	45.7	28.9	53.0
21	57.8	27.4	26.8	50.6
28	56.5	23.4	21.1	47.4

ตาราง 9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวัสดุปรับสภาพด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

ระยะเวลาในการ ปรับสภาพ (วัน)	Conc. (g/L)			
	แกลบ	ข้าวโพด	เปลือกสับปะรด	ฟางข้าว
1	35.5	57.4	63.8	57.8
7	38.8	66.2	62.4	54.5
14	37.1	65.9	61.5	53.1
21	34.5	64.7	60.8	50.7
28	29.6	63.3	59.7	49.6

3.2 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการหมักวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

ตาราง 10 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการหมักแกลบ (g/L)

ชนิดของสารที่ใช้ ปรับสภาพ	ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	3.61	4.15	4.33	4.51	4.87	5.23	2.88
HCl	3.43	3.61	3.97	4.69	5.41	6.85	4.87
H ₂ SO ₄	3.79	4.15	4.33	4.51	4.69	3.61	3.25
H ₃ PO ₄	4.51	4.69	4.87	5.23	4.69	4.51	3.61
CH ₃ COOH	3.43	3.61	4.33	4.69	5.05	4.15	3.61
NaOH	1.80	2.88	3.43	3.61	5.23	4.33	4.15
KOH	1.26	2.70	3.43	3.61	5.05	4.15	3.61

ตาราง 11 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการหมักฟางข้าว (g/L)

ชนิดของสารที่ใช้ ปรับสภาพ	ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	3.25	4.51	6.13	7.21	7.93	8.11	7.93
HCl	5.59	5.95	6.85	7.39	5.77	5.05	4.69
H ₂ SO ₄	4.69	5.05	5.77	6.31	6.85	5.23	5.05
H ₃ PO ₄	5.05	5.41	6.13	6.67	6.31	5.41	5.05
CH ₃ COOH	4.69	5.59	6.49	6.85	5.23	4.69	4.51
NaOH	0.36	2.52	7.03	8.47	7.57	7.39	7.21
KOH	1.08	1.98	5.77	9.20	7.57	6.85	6.13

ตาราง 12 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการหมักต้นข้าวโพด (g/L)

ชนิดของสารที่ใช้	ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	3.79	3.97	4.15	4.33	5.59	4.15	2.88
HCl	2.70	3.07	3.61	4.15	4.33	3.43	3.25
H ₂ SO ₄	2.16	2.52	2.88	3.25	3.79	3.61	3.61
H ₃ PO ₄	2.52	2.70	2.88	3.61	3.79	3.61	3.25
CH ₃ COOH	2.70	2.88	3.07	3.43	3.97	3.07	2.70
NaOH	0.18	3.07	4.69	5.77	7.21	6.31	6.13
KOH	3.07	3.61	5.77	5.95	8.29	7.57	6.67

ตาราง 13 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการหมักเปลือกสับปะรด (g/L)

ชนิดของสารที่ใช้	ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	5.41	7.21	8.29	9.02	7.57	7.39	7.03
HCl	5.05	5.41	5.59	6.13	7.75	6.49	6.13
H ₂ SO ₄	5.05	5.41	5.77	6.13	6.31	6.13	5.77
H ₃ PO ₄	6.67	7.39	7.57	12.62	6.31	5.95	5.77
CH ₃ COOH	4.33	7.03	7.39	7.93	8.47	7.57	6.67
NaOH	1.08	10.82	12.26	15.33	17.67	15.33	12.98
KOH	3.07	6.13	12.26	13.88	17.49	15.51	13.70

3.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อรา
Aspergillus niger Yang no. 2

ตาราง 14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้แกลบเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	Conc. (g/L)						
	Control	HCl	H ₂ SO ₄	H ₃ PO ₄	CH ₃ COOH	NaOH	KOH
1	1.15	4.08	3.80	0.68	4.29	4.80	3.94
2	0.67	3.35	2.76	0.59	4.15	4.57	3.88
3	0.61	3.20	2.75	0.39	3.33	3.98	3.61
4	0.56	3.13	2.74	0.39	3.16	3.90	3.32
5	0.54	3.11	2.70	0.38	2.49	3.46	3.27
6	0.45	3.10	2.65	0.31	2.32	3.39	3.22
7	0.41	3.06	2.63	0.28	2.26	3.37	2.97

ตาราง 15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	Conc. (g/L)						
	Control	HCl	H ₂ SO ₄	H ₃ PO ₄	CH ₃ COOH	NaOH	KOH
1	3.09	3.64	3.28	3.55	2.87	3.33	4.57
2	3.07	3.21	3.11	3.23	2.82	3.18	4.32
3	3.06	3.18	2.56	3.18	2.72	3.08	3.69
4	2.90	3.11	2.53	3.00	2.65	2.76	3.46
5	2.81	3.09	2.10	2.82	2.60	2.65	3.13
6	2.18	3.07	1.89	2.04	1.79	2.60	2.40
7	1.72	3.01	1.76	1.38	1.02	2.57	0.94

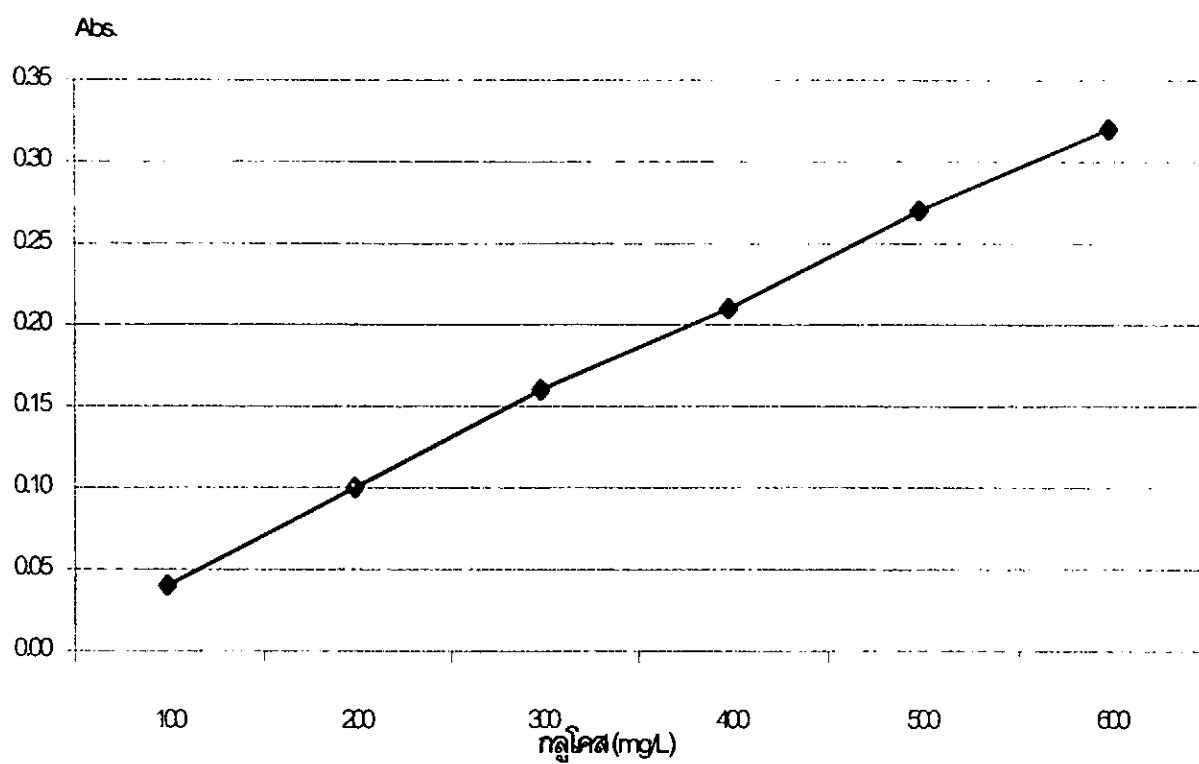
ตาราง 16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้ต้นข้าวโพดเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	Conc. (g/L)						
	Control	HCl	H ₂ SO ₄	H ₃ PO ₄	CH ₃ COOH	NaOH	KOH
1	3.04	1.57	3.49	1.59	3.71	3.51	3.91
2	2.99	1.40	3.31	1.45	3.46	2.63	3.69
3	2.68	1.09	3.27	1.28	3.15	2.37	3.62
4	2.57	1.03	3.24	1.24	2.90	1.58	2.66
5	2.52	0.76	3.03	1.03	2.78	0.98	2.64
6	2.43	0.63	2.92	1.00	2.61	0.96	1.90
7	1.82	0.62	2.86	0.90	2.39	0.96	0.77

ตาราง 17 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้เปลือกสับปะรดเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	Conc. (g/L)						
	Control	HCl	H ₂ SO ₄	H ₃ PO ₄	CH ₃ COOH	NaOH	KOH
1	5.91	11.4	12.84	9.34	7.35	12.66	11.19
2	5.53	9.95	10.59	7.52	7.26	10.47	10.48
3	5.17	8.78	8.25	7.48	7.24	9.97	9.42
4	4.39	6.96	6.78	5.89	7.23	9.63	7.22
5	4.38	6.94	6.74	5.73	6.66	8.66	7.18
6	4.18	6.91	6.71	4.72	6.37	7.47	6.88
7	3.92	5.71	6.61	2.35	5.98	7.24	5.23

4. กราฟกลูโคสมาตรฐาน



ภาพประกอบ 42 กราฟกลูโคสมาตรฐาน

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวมาลีณี พูลพิพัฒน์
วันเดือนปีเกิด	วันที่ 23 กุมภาพันธ์ 2521
สถานที่เกิด	อ.เมือง จ.เชียงราย
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 261/3 ถ.สันโค้งหลวง ซ.12 ต.เวียง อ.เมือง จ.เชียงราย 57000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2539	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนดำรงราษฎร์สงเคราะห์
พ.ศ. 2543	การศึกษามหาบัณฑิต (เคมี) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2548	การศึกษามหาบัณฑิต (เคมี) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ