



การผลิตกรณีศึกษาแบบป้อนจากการคัดแยกเชื้อรา

นางสาวกาญจนา เดชชมภู

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ปีการศึกษา 2568

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

การผลิตกรดซิตริกแบบป้อนจากการคัดแยกเชื้อรา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
ปีการศึกษา 2568

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ



ใบรับรองโครงงานวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

เรื่อง การผลิตกรดซิดริกแบบป้อนจากการคัดแยกเชื้อรา

โดย นางสาวกาญจนา เดชขมภู

ได้รับอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย / หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ จันทรวีวัฒน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร คงเรือง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.ณิชารีย์ วิสุทธิแพทย์)

ชื่อ : นางสาวกาญจนา เดชชมภู
 ชื่อวิทยานิพนธ์ : การผลิตกรดซิตริกแบบป้อนจากการคัดแยกเชื้อรา
 สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ
 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร คงเรือง
 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อาจารย์ ดร.ณิชาธิ์ วิสุทธิแพทย์
 ปีการศึกษา : 2568

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตกรดซิตริกจาก *Aspergillus niger* TISTR 3063 และ *Aspergillus luchuensis* SK01 โดยใช้กระบวนการหมักในอาหารเหลว การหมักแบบเบ็ดเสร็จ และแบบป้อนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร เพื่อหาสภาวะการหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริก จากการออกแบบการทดลองแบบบล็อก-เบห์นเคน โดยมีสามปัจจัยในการศึกษา ได้แก่ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (70, 85, 100 กรัมต่อกรัม) ความเร็วในการเขย่า (200, 250, 300 รอบต่อนาที) และปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ (0.01, 0.055, 0.1 กรัมต่อลิตร) ต่อการผลิตกรดซิตริก และผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้ (Yields) และการจัดแยกกรดซิตริกด้วยวิธีการตกตะกอน พร้อมตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของกรดซิตริกด้วยเทคนิค FTIR ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสูงสุดในการผลิตกรดซิตริกคือ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 97.93 กรัมต่อกรัม ความเร็วในการเขย่า 300 rpm และปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ *A. niger* TISTR 3063 สามารถผลิตกรดซิตริกได้ 26.88 ± 0.01 กรัมต่อลิตร และ *A. luchuensis* SK01 ผลิตได้ 28.47 ± 0.01 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดซิตริก พบว่า *A. luchuensis* SK01 มีผลผลิตกรดซิตริกสูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 โดย *A. luchuensis* SK01 ผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด 36.16 กรัมต่อลิตร ที่ 96 ชั่วโมง ในการหมักแบบป้อน มีการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ แบบจำลองโมโนด โลจิสติก และกอมเพิร์ตซ์ ในการอธิบายการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองโลจิสติกและกอมเพิร์ตซ์มีความแม่นยำสูงในการทำนายการผลิตกรดซิตริก การศึกษาแสดงให้เห็นว่า การหมักแบบป้อนเป็นสภาวะการผลิตกรดซิตริกที่ดีกว่าแบบเบ็ดเสร็จจากทั้งสองเชื้อรา การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของกรดซิตริกที่ได้จากการหมักโดยใช้เทคนิค HPLC และ FTIR พบว่า กรดซิตริกที่ผลิตจากทั้งสองกระบวนการมีคุณสมบัติทางเคมีใกล้เคียง งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการหมักแบบป้อนในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริก

คำสำคัญ : แอสเปอร์จีลัส ไนเจอร์, แอสเพอร์จีลัส ลูซูเอนซิส, บล็อก – เบห์นเคน, การผลิตกรดซิตริก, การหมักแบบป้อน, จลนพลศาสตร์ และสมการทางคณิตศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Name : Miss Kanjana Detchomphoo
Thesis Title : Fed-Batch Production of Citric Acid from Screening Fungi
Major Field : Biotechnology
King Mongkut's University of Technology North
Bangkok
Thesis Advisor : Associate Professor Dr. Sasithorn Kongruang, Ph.D.
Co-Advisor : Dr. Nicharee Wisuthiphaet, Ph.D.
Academic Year : 2025

ABSTRACT

This research investigates the production of citric acid from *Aspergillus niger* TISTR 3063 and *Aspergillus luchuensis* SK01 using liquid fermentation, both in batch and fed-batch processes in a 5-liter bioreactor, to determine the optimal fermentation conditions for citric acid production. The experiment was designed using a Box-Behnken design, with three factors investigated: carbon-to-nitrogen ratio (70, 85, 100 g/g), shaking speed (200, 250, 300 rpm), and calcium chloride concentration (0.01, 0.055, 0.1 g/L), all of which were tested for their effects on citric acid production and yield. Citric acid was extracted using a precipitation method and identified using FTIR analysis. The results revealed that the optimal conditions for citric acid production were a carbon-to-nitrogen ratio of 97.93 g/g, shaking speed of 300 rpm, and calcium chloride concentration of 0.1 g/L. Under these conditions, *A. niger* TISTR 3063 produced 26.88 ± 0.01 g/L, and *A. luchuensis* SK01 produced 28.47 ± 0.01 g/L. When comparing the citric acid production capacities, *A. luchuensis* SK01 exhibited a higher yield, producing a maximum of 36.16 g/L at 96 hours in the fed-batch fermentation. Mathematical models, including Monod, Logistic, and Gompertz models, were used to describe citric acid production by the fungi. The study showed that both the Logistic and Gompertz models provided high accuracy in predicting citric acid production. Furthermore, the study demonstrated that fed-batch fermentation outperformed batch fermentation in both strains of fungi for citric acid production. Chemical property analysis of the citric acid produced using HPLC and FTIR revealed that the citric acid produced from both fermentation processes had chemical properties similar to commercially available citric acid. This research highlights the potential of fed-batch fermentation in enhancing citric acid production.

Keywords: *Aspergillus niger*, *Aspergillus luchuensis*, Box-Behnken design, Citric acid production, Fed-batch Fermentation, Kinetics and Mathematical models

Advisor

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและการสนับสนุนอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร คงเรือง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ณิชารีย์ วิสุทธิแพทย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณา ให้คำแนะนำอย่างใกล้ชิดตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์ ตั้งแต่การกำหนดประเด็นวิจัย ออกแบบวิธีการ ศึกษา วิเคราะห์และตีความผล ตลอดจนให้ข้อเสนอแนะที่ตรงประเด็น อันเป็นประโยชน์ยิ่งต่อการพัฒนาคุณภาพ ของงานวิจัยฉบับนี้ ทั้งยังได้ให้กำลังใจและสนับสนุนผู้เขียนอย่างต่อเนื่องจนงานสำเร็จลุล่วง ขอขอบพระคุณ บริษัท เอ็นเชิร์ฟ โฮลดิ้ง จำกัด ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยและทรัพยากรที่จำเป็นต่อการดำเนินโครงการครั้งนี้ อันเป็นแรงขับเคลื่อนสำคัญให้การศึกษาฉบับนี้บรรลุผลสำเร็จ ขอขอบคุณ ดร.กิตติวุฒิ เกษมวงศ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อานนท์ ขำแก้ว กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรประจำหลักสูตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ คำปรึกษา และการสนับสนุน ด้านวิชาการตลอดการดำเนินงาน ขอขอบคุณเพื่อนร่วมวิจัยและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ช่วยเหลือ ในการทดลอง การเก็บรวบรวมและประมวลผลข้อมูลรวมถึงคำแนะนำที่มีคุณค่า

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่สาว ครอบครัว และ Bae รวมถึงบุคคลรอบข้างทุกคนที่คอย ช่วยเหลือ รับฟังปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นระหว่างการทำวิทยานิพนธ์และให้การสนับสนุน ใน เรื่องต่าง ๆ แก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ นางสาวณัฐชา คงคุ้ม นางสาวณัฏฐกรณ์ ปาศรีรัมย์ นางสาว ชลธร บัวโรย และนางสาวลลิตา ธานี นักศึกษาปริญญาโทภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนในด้านต่าง ๆ รวมถึงเพื่อนๆที่คอยให้กำลังใจและอยู่เคียงข้างผู้วิจัยมาเสมอ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณการ์ตูนชินจังจอมแก่น พี่แจ๊ค เดอะโกสต์เรดิโอ พี่หนุ่ม โหนกระแส และขอบคุณวงคาราบาว อัสนี&วสันต์ หมู พงเทพ ผู้สร้างเพลงซึ่งเป็นแรงบันดาลใจให้ผู้วิจัยสามารถฝ่าฟันอุปสรรคที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณตัวเองที่อดทน พยายาม และใส่ใจในรายละเอียดอยู่เสมอ ทำให้ตัวเองเป็นคนที่พัฒนาขึ้นในทุกวัน ทุก ๆ ความพยายามทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาต่อไป หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใดต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ ผู้วิจัยยินดีน้อมรับข้อเสนอแนะเพื่อการปรับปรุงในโอกาสต่อไป

กาญจนา เดชขมภู

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง (ถ้ามี).....	ญ
สารบัญรูปภาพ (ถ้ามี).....	ท
บทที่ 1 บทนำ	17
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	17
1.2 วัตถุประสงค์	19
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	19
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	20
บทที่ 2.....	21
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	21
2.1 กรดซิตริก	21
2.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดซิตริก	22
2.3 การคัดเลือกเชื้อราสำหรับการผลิตกรดซิตริก.....	24
2.4 เชื้อรา <i>A. niger</i>	25
2.5 เชื้อรา <i>Aspergillus luchuensis</i>	33
2.6 ประวัติของเชื้อรา <i>Aspergillus luchuensis</i>	34

2.7 ถิ่นอาศัยของเชื้อรา <i>Aspergillus luchuensis</i>	34
2.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>A. luchuensis</i>	35
2.9 การประยุกต์ใช้เชื้อรา <i>Aspergillus luchuensis</i> ในอุตสาหกรรม	36
2.10 ชีวิตเคมีของการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อรา	37
2.11 การหมักเพื่อผลิตกรดซิตริก	40
2.12 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก	54
2.13 พารามิเตอร์ทางเคมี	55
2.14 การเก็บเกี่ยวกรดซิตริก (Recovery of citric acid)	67
2.15 การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (box - behnken design)	83
2.16 แบบจำลองจลนพลศาสตร์ในการผลิตกรดซิตริก	84
2.17 การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (Mathematical Modeling)	85
2.17 สิทธิบัตรและอนุสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้อง	87
บทที่ 3	91
วิธีการทดลอง.....	91
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	91
3.2 สารเคมี	91
3.3 อุปกรณ์	92
3.4 เครื่องมือการวิเคราะห์	93
3.5 วิธีการทดลอง	94
3.6 ศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) ต่อการผลิตกรดซิตริก	95
3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อราสายพันธุ์แอสเพอร์จิลลัส ลูซุ เอนซิส (<i>Aspergillus luchuensis</i>) และเพื่อการยืนยันสภาวะการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ ...	98

3.8 การศึกษาจุลณพลศาสตร์ของเชื้อราในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จในอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารเหลวสูตรดัดแปร.....	99
3.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา.....	100
3.10 การแยกเชื้อจุลินทรีย์	101
3.11 การจำแนกชนิดของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> ด้วยวิธีชีวโมเลกุล	101
3.12 การวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ	102
3.13 วิธีวิเคราะห์.....	102
3.14 กระบวนการหลังจากการหมัก (Downstream).....	104
3.15 การพิสูจน์เอกลักษณ์กรดซิตริกจากเชื้อรา	104
3.16 การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดซิตริก	105
บทที่ 4	109
ผลการทดลอง	109
4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดซิตริก	109
4.2 ผลของประเภทของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดซิตริก	110
4.3 ผลของความเข้มข้นของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตกรดซิตริก.....	112
4.4 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3063 โดยใช้อาหารดัดแปรด้วยวิธีการฟื้นผิวดอบสนอง	116
4.5 ผลการยืนยันสภาวะเหมาะสมสูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการ	123
4.6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อราสายพันธุ์แอสเพอร์จิลลัส ลูชเวนซิส (<i>A. luchuensis</i> SK01) เพื่อยืนยันสภาวะการผลิตกรดซิตริกในระดับห้องปฏิบัติการ.....	126
4.7 ผลการศึกษาการผลิตกรดซิตริก และการศึกษาจุลณพลศาสตร์ของเชื้อราในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง.....	130
4.8 ผลการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดซิตริกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ	134

4.9 ผลการศึกษาการผลิตกรดซิตริก และการศึกษาजनพลศาสตร์ของเชื้อราในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง.....	140
4.10 ผลการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดซิตริกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน	145
4.11 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา	152
4.12 ผลการวิเคราะห์แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการ	158
4.13 ผลการตกตะกอนกรดซิตริก	161
4.14 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์กรดซิตริกจากเชื้อรา.....	161
บทที่ 5	164
สรุปผลการทดลองและวิจารณ์	164
5.1 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดซิตริก	164
5.2 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดซิตริก	165
5.3 การศึกษาของความเข้มข้นของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตกรดซิตริก.....	165
5.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา.....	165
5.5 การยืนยันสภาวะเหมาะสมสูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการของ <i>A. niger</i> TISTR 3063	166
5.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อราสายพันธุ์ <i>Aspergillus luchuensis</i> เพื่อยืนยันสภาวะการผลิตกรดซิตริกในระดับห้องปฏิบัติการ	166
5.7 การศึกษาการผลิตกรดซิตริก และการศึกษาजनพลศาสตร์ของเชื้อราในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง	167
5.8 ผลการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดซิตริกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ	168
5.9 การศึกษาการผลิตกรดซิตริก และการศึกษาजनพลศาสตร์ของเชื้อราในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง	168

5.10 การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดซิดริกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ ป้อน	169
5.11 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา	170
5.12 การวิเคราะห์แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการ	172
5.13 การตกตะกอนกรดซิดริก	172
5.14 ข้อเสนอแนะ	173
บรรณานุกรม.....	1
บรรณานุกรม.....	13
ภาคผนวก	14
ภาคผนวก ก.....	14
ภาคผนวก ข.....	17
ภาคผนวก ค.....	19
ประวัติผู้เขียน.....	24

สารบัญตาราง (ถ้ามี)

หน้า

ตารางที่ 1	สายพันธุ์เชื้อราที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา	25
ตารางที่ 2	วิธีการแยกกรดซิตริก (Saeed et al., 2020)	81
ตารางที่ 3	ตัวแปรปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาสภาวะเหมาะสมสูงสุด	96
ตารางที่ 4	ชุดการทดลองสำหรับการศึกษาสภาวะเหมาะสมสูงสุดในการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา ...	97
ตารางที่ 5	ผลของความเข้มข้นของคาร์บอนแตกต่างกันกับแหล่งไนโตรเจน 2 แหล่งต่อการผลิตกรดซิตริก	114
ตารางที่ 6	ผลของความเข้มข้นของคาร์บอนแตกต่างกันกับแหล่งไนโตรเจน 2 แหล่งต่อการผลิตกรดซิตริก ในระยะเวลาการหมัก 192 ชั่วโมง	115
ตารางที่ 7	ตัวแปรปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาสภาวะเหมาะสมสูงสุด	116
ตารางที่ 8	ผลการทดลองแบบบล็อกซ์ – เบห์นเคนและผลของตัวแปรตอบสนอง	117
ตารางที่ 9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนจากการลดรูปสมการถดถอยผลตอบสนองของการผลิตกรดซิตริก (ANOVA for Reduced Quadratic model)	119
ตารางที่ 10	การวิเคราะห์ความแปรปรวนจากการลดรูปสมการถดถอยผลตอบสนองของผลผลิตที่ได้ (ANOVA for Reduced Quadratic model).....	121
ตารางที่ 11	ผลการยืนยันสภาวะเหมาะสมสูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการ	125
ตารางที่ 12	จุลพลศาสตร์การผลิตกรดซิตริกใช้สภาวะเหมาะสมสูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการของ <i>A. luchuensis</i> SK01	128
ตารางที่ 13	ค่าพารามิเตอร์ทางจุลพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของ <i>A. niger</i> TISTR 3063 และ <i>A. luchuensis</i> SK01	132
ตารางที่ 14	ค่าพารามิเตอร์จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์	138
ตารางที่ 15	ค่าพารามิเตอร์ทางจุลพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของ <i>A. niger</i> TISTR 3063 และ <i>A. luchuensis</i> SK01	143
ตารางที่ 16	ค่าพารามิเตอร์จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์	149
ตารางที่ 17	เปรียบเทียบภาพของมวลเซลล์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สภาวะการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์	154

ตารางที่ 18	เปรียบเทียบภาพของมวลเซลล์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สภาวะการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ	154
ตารางที่ 19	เปรียบเทียบภาพของมวลเซลล์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สภาวะการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน	155
ตารางที่ 20	พารามิเตอร์จลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของชีวมวลและการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3063 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ	14
ตารางที่ 21	พารามิเตอร์จลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของชีวมวลและการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา <i>A. luchuensis</i> SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ.....	15
ตารางที่ 22	พารามิเตอร์จลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของชีวมวลและการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3063 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน.....	15
ตารางที่ 23	พารามิเตอร์จลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของชีวมวลและการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา <i>A. luchuensis</i> SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน.....	16
ตารางที่ 24	การเปรียบเทียบการวิเคราะห์กรดซิตริกเกรตวิเคราะห์ กับกรดซิตริกที่ตกตะกอนได้น้ำหนัก	19
ตารางที่ 25	การเปรียบเทียบการวิเคราะห์กรดซิตริกเกรตอาหารกับกรดซิตริกที่ตกตะกอนได้น้ำหนัก..	20

สารบัญรูปภาพ (ถ้ามี)

หน้า

ภาพที่ 1	กรดซิตริก	21
ภาพที่ 2	อนุกรมวิธาน Taxonomy เชื้อรา <i>A. niger</i>	26
ภาพที่ 3	ภาพนี้เปรียบเทียบโครงสร้างของ <i>A. niger</i> กับอุปการณที่เรียกว่า <i>aspergillum</i> ซึ่งใช้พรมประพรม น้ำมันตีในพิธีทางศาสนา (https://twitter.com/AminaEllmam/status/133598316)	28
ภาพที่ 4	สัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>A. niger</i>	29
ภาพที่ 5	<i>A. niger</i> ที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อมันฝรั่งเด็กชไวทอส	31
ภาพที่ 6	ภาพรวมของเมตาบอลิซึมที่นำไปสู่การผลิตกรดซิตริกใน <i>A. niger</i>	39
ภาพที่ 7	แผนภาพของการเพาะเลี้ยงเชื้อบนพื้นผิวของเหลว(Ksiażek, 2023)	42
ภาพที่ 8	แผนภาพการหมักแบบในอาหารเหลว(Ksiażek, 2023)	46
ภาพที่ 9	แผนภาพการหมักในอาหารเหลวแบบปั่น (Ksiażek, 2023)	50
ภาพที่ 10	แผนภาพแสดงกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสถานะของแข็ง (Ksiażek, 2023).....	53
ภาพที่ 11	แผนภาพเชิงสัญลักษณ์สำหรับการเก็บเกี่ยวกรดซิตริกโดยกระบวนการตกตะกอน (Saeed, et al., 2020).....	71
ภาพที่ 12	การออกแบบการทดลองสำหรับการทดลองที่มี 3 ตัวแปร (a) การออกแบบการทดลองชนิด แฟคทอเรียลเต็มรูป (b) การออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเค้น (c) การออกแบบส่วนประสมกลาง (Breig & Luti, 2021)	84
ภาพที่ 13	ความเข้มข้นของกรดซิตริกของเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3063 ภายใต้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน	109
ภาพที่ 14	ความเข้มข้นของสารตั้งต้นของเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3063 ภายใต้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	110
ภาพที่ 15	ความเข้มข้นของกรดซิตริกของเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3063ภายใต้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	111
ภาพที่ 16	การใช้สารตั้งต้นของเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3063 ภายใต้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	112
ภาพที่ 17	ความเข้มข้นของชีวมวลและค่า pH ของเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3063 ภายใต้แหล่งไนโตรเจนที่ แตกต่างกัน	112

ภาพที่ 18 การเปรียบเทียบการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3063 ภายใต้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน.....	113
ภาพที่ 19 พื้นที่ผิวตอบสนองของการผลิตกรดซิตริก (ก) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และความเร็วในการเขย่า (ข) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์ (ค) ความเร็วในการเขย่า และปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์	120
ภาพที่ 20 พื้นที่ผิวตอบสนองของผลผลิตที่ได้ (ก) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และความเร็วในการเขย่า (ข) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์ (ค) ความเร็วในการเขย่า และปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์.....	123
ภาพที่ 21 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์ การใช้กลูโคส และการผลิตกรดซิตริกระหว่างการหมัก <i>A. niger</i> TISTR 3063 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 384 ชั่วโมง ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที.....	126
ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์ การใช้กลูโคส และการผลิตกรดซิตริกระหว่างการหมัก <i>A. luchuensis</i> SK01 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 384 ชั่วโมง ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที.....	128
ภาพที่ 23 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์ การใช้กลูโคส และการผลิตกรดซิตริกระหว่างการหมักของเชื้อ (ก) <i>A. niger</i> TISTR 3063 และ (ข) <i>A. luchuensis</i> SK01 ที่สภาวะ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 384 ชั่วโมง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ	129
ภาพที่ 24 การประมาณค่าของแบบจำลอง (ก) แบบจำลองโมโนด (ข) แบบจำลองโลจิสติก และแบบจำลอง (ค) แบบจำลองกอมเพิร์ตซ์ ให้เข้ากับความเข้มข้นของสารตั้งต้น ชีวมวล และผลิตภัณฑ์โดย <i>A. niger</i> TISTR 2365 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเบ็ดเสร็จขนาด 5 ลิตร.....	136
ภาพที่ 25 การประมาณค่าของแบบจำลอง (ก) แบบจำลองโมโนด (ข) แบบจำลองโลจิสติก และแบบจำลอง (ค) แบบจำลองกอมเพิร์ตซ์ ให้เข้ากับความเข้มข้นของสารตั้งต้น ชีวมวล และผลิตภัณฑ์โดย <i>A. luchuensis</i> SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จขนาด 5 ลิตร	137
ภาพที่ 26 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์ การใช้กลูโคส และการผลิตกรดซิตริกระหว่างการหมักของเชื้อ (ก) <i>A. niger</i> TISTR 3063 และ (ข) <i>A. luchuensis</i> SK01 ที่สภาวะ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 384 ชั่วโมง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกบ้อน.....	139
ภาพที่ 27 การประมาณค่าของแบบจำลอง (ก) แบบจำลองโมโนด (ข) แบบจำลองโลจิสติก และแบบจำลอง (ค) แบบจำลองกอมเพิร์ตซ์ ให้เข้ากับความเข้มข้นของสารตั้งต้น ชีวมวล และผลิตภัณฑ์โดย <i>A. niger</i> TISTR 2365 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกบ้อน ขนาด 5 ลิตร.....	147

ภาพที่ 28 การประมาณค่าของแบบจำลอง (ก) แบบจำลองโมโนด (ข) แบบจำลองโลจิสติก และแบบจำลอง (ค) แบบจำลองกอมเพิร์ตซ์ ให้เข้ากับความสัมพันธ์ของสารตั้งต้น ชีวมวล และผลิตภัณฑ์โดย <i>A. luchuensis</i> SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อนขนาด 5 ลิตร.....	148
ภาพที่ 29 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3063 (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ข) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 เท่า (ค) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า (ง) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า (จ) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า.....	150
ภาพที่ 30 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>A. luchuensis</i> SK01 (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ข) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 เท่า (ค) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า (ง) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า (จ) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า.....	151
ภาพที่ 31 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 1000, 2000, และ 5000 เท่าของสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ก-ค) มวลเซลล์ของเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3063 ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ (ง-ฉ) และมวลเซลล์ของเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3063 ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (ซ-ณ) ...	157
ภาพที่ 32 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 1000, 2000, และ 5000 เท่าของสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ก-ค) มวลเซลล์ของเชื้อรา <i>A. luchuensis</i> SK01 ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ (ง-ฉ) และมวลเซลล์ของเชื้อรา <i>A. luchuensis</i> SK01 ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (ซ-ณ).....	158
ภาพที่ 33 แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการของเชื้อรา <i>Aspergillus luchuensis</i>	160
ภาพที่ 34 การเปรียบเทียบลักษณะของกรดซิตริก (ก) กรดซิตริกเกรดวิเคราะห์ (ข) กรดซิตริกเกรดอาหาร (ค) กรดซิตริกจาก <i>A. niger</i> TISTR 3063 และ (ง) กรดซิตริกจาก <i>A. luchuensis</i> SK01	161
ภาพที่ 35 การวิเคราะห์เปรียบเทียบกรดซิตริกที่ผลิตจากสามแหล่งที่แตกต่างกัน เส้นสีน้ำเงินแสดงถึงกรดซิตริกที่ได้จาก <i>A.niger</i> (CAN) และเส้นสีเขียว กรดซิตริก <i>A. luchuensis</i> SK01 (CAL) ในขณะที่เส้นสีดำแสดงถึงกรดซิตริกโมโนไฮเดรตจากแหล่งเชิงพาณิชย์ (CAR) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 210.14 กรัมต่อโมล (Sisco Research Laboratories, India) เส้นสีแดงแสดงถึงกรดซิตริกโมโนไฮเดรต ซึ่งเป็นกรดซิตริกเกรดอาหาร (CFG) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 210.14 กรัมต่อโมล (Tokyo Chemical Industry, India)	163
ภาพที่ 36 กราฟมาตรฐานกรดซิตริก	17
ภาพที่ 37 โคโรมาโทแกรมโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ของน้ำหมักจากไบโอรีแอคเตอร์โดย <i>A. niger</i> TISTR 3063	18

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดซิตริก (Citric Acid หรือ CA) หรือชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid เป็นสารที่พบได้ในเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ เช่น เลือด กระดุก และกล้ามเนื้อ สำหรับสิ่งมีชีวิต กรดซิตริกถือเป็นหนึ่งในกรดคาร์บอกซิลิกที่สำคัญในวงจรเครปส์ (Krebs cycle) ซึ่งเป็นกระบวนการปฏิกิริยาที่มีบทบาทในการออกซิไดซ์กลูโคสให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ พร้อมทั้งปลดปล่อยพลังงานที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ เนื่องจากกรดซิตริกมีคุณสมบัติที่ปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิต และยังสามารถจับโลหะไอออนและแยกสารโลหะออกจากสารละลายได้ จึงทำให้มีการใช้งานอย่างกว้างขวางในหลายอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เกษษกรรม เคมีภัณฑ์ และอุตสาหกรรมโลหะ (Amato et al., 2020; Hu et al., 2019) นอกจากนี้ การใช้กรดซิตริกในอุตสาหกรรมต่างๆ ยังเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยปัจจุบันการผลิตกรดซิตริกทั่วโลกอยู่ที่ประมาณ 2.8 ล้านตันต่อปี และตลาดกรดซิตริกถือเป็นหนึ่งในตลาดที่เติบโตเร็วที่สุดในอุตสาหกรรมสารเติมแต่งอาหาร (Group., 2023) การเติบโตของการผลิตกรดซิตริกนั้นเกิดจากการใช้งานที่หลากหลายไม่เพียงแต่ในอุตสาหกรรมอาหารและยาเท่านั้น แต่ยังรวมถึงการผลิตไบโพลีเมอร์ การใช้ในชีวการแพทย์อีกด้วย และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Behera et al., 2021; Belén et al., 2010)

ปัจจุบันมากกว่า 90% ของกรดซิตริกที่ผลิตในโลกมาจากการหมัก การหมักซิตริกในอุตสาหกรรมสามารถทำได้ในสามวิธีหลัก ได้แก่ การหมักในอาหารเหลว (Submerge fermentation) การหมักบนผิวหน้า (surface fermentation) และการหมักในสภาพของแข็ง (Madigan et al., 1997) โดยใช้สายพันธุ์แอสเพอร์จีลัส ไนเจอร์ (*Aspergillus niger*) ยีสต์ *Yarrowia lipolytica* และแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ซึ่ง *A. niger* ถือเป็นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดในกระบวนการสังเคราะห์กรดซิตริกเชิงพาณิชย์ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการผลิตสูง (Lambros et al., 2022; Lende et al., 2021) แม้ว่าเชื้อรา *A. niger* ถือเป็นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดในกระบวนการสังเคราะห์กรดซิตริกเชิงพาณิชย์ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการผลิตสูง จึงเป็นเชื้อราที่นิยมใช้ในการผลิตกรดซิตริกมากที่สุด แต่ยังมีเชื้อราและจุลินทรีย์อีกหลายชนิดที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้เช่นกัน มีการค้นพบจุลินทรีย์หลายชนิดที่สะสมกรดซิตริก รวมถึง *Absidia* sp., *Acremonium*, *Botrytis*, *Eupenicillium*, *Penicillium* และ *Aspergillus* sp. บางชนิด เช่น *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus luchensis* และ *Aspergillus flavus* (Papagianni, 2007b) นอกจากนี้เชื้อราที่มีเส้นใยแล้ว แบคทีเรียและยีสต์บางชนิดยังพบว่าผลิตกรด

ชนิดที่ได้อีกด้วย เช่น *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Klebsiella* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น (Anastassiadis et al., 2008) และยังพบสายพันธุ์ยีสต์เป็นผู้ผลิตที่มีศักยภาพจากแหล่งคาร์บอนหลากหลาย เช่น *Candida* sp. และ *Yarrowia* sp. (Papagianni, 2007a, 2007b)

เชื้อราหลายสปีชีส์ที่อยู่ในกลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri* มีความเกี่ยวข้องกับการหมักอาหารในเอเชียตะวันออก ตัวอย่างเช่น *Aspergillus luchuensis* และ *Aspergillus awamori* (เชื้อราผลิตโคจิสีดำ) ซึ่งเชื่อมโยงกับการผลิตอวามอริ (Awamori) เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ผ่านการกลั่นที่ผลิตบนเกาะโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น *Aspergillus kawachii* และ *Aspergillus coreanus* (เชื้อราผลิตโคจีสีขาว) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตโชชู (shochu) และมักเกอลี (makgeolli) เชื้อราโคจีสีดำและสีขาวใช้ในการทำโคจิ (วัสดุที่มีเชื้อรา) สำหรับการหมักอวามอริ โชชู และมักเกอลี ซึ่งให้เอนไซม์ต่างๆ สำหรับการบดและการแปลงแป้งจากวัตถุดิบ เช่น ข้าว บาร์เลย์ และมันหวาน รวมถึงการผลิตกรดซิตริกในปริมาณมากเพื่อรักษาค่า pH ของน้ำหมักให้ต่ำ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type) ที่อาจเป็นอันตราย (Hong et al., 2013) ปัจจุบันมากกว่า 90% ของกรดซิตริกที่ผลิตในโลกมาจากการหมัก โดยกว่า 80% ได้มาจากการหมักแบบ submerged fermentation โดยเชื้อ *A. niger* ประสิทธิภาพของวิธีปัจจุบันซึ่งเป็นการหมักแบบเบ็ดเสร็จหรือแบบเบ็ดเสร็จ (Batch) สำหรับการผลิตกรดซิตริกในอุตสาหกรรมนั้นมีจำกัด เพื่อให้ได้กรดซิตริกอย่างต่อเนื่องด้วยผลผลิตที่เพิ่มขึ้นและต้นทุนที่ลดลง จึงใช้การหมักแบบกึ่งกะหรือแบบป้อน (Fed-Batch) เข้ามาช่วย เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิตกรดซิตริก เนื่องจากสามารถเพิ่มผลผลิตและควบคุมกระบวนการหมักได้

การหมักแบบป้อน (Fed-Batch) เป็นกระบวนการหมักที่ดัดแปลงมาจากการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (Batch) แบบดั้งเดิมโดยมีลักษณะเฉพาะคือมีการเติมสารอาหารลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ในระหว่างกระบวนการหมัก ทำให้มีระบบกึ่งเปิดซึ่งปริมาณของอาหารจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปเมื่อมีการเติมสารอาหารมากขึ้น หลักการการหมักแบบป้อน การเติมสารอาหารในระบบการเลี้ยงแบบป้อนสารอาหารจะเติมลงไปอย่างปลอดภัยและค่อยเป็นค่อยไปตลอดกระบวนการหมัก ซึ่งจะช่วยรักษาสภาวะการเจริญเติบโตที่เหมาะสมโดยป้องกันการสูญเสียสารตั้งต้นและหลีกเลี่ยงผลกระทบที่ยับยั้งเนื่องจากสารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูง การหมักแบบป้อนจะเพาะเลี้ยงระบบกึ่งเปิดไม่เหมือนกับการหมักแบบเบ็ดเสร็จ ที่สารอาหารทั้งหมดจะเติมลงไปตั้งแต่เริ่มต้น ระบบป้อนช่วยให้สามารถเติมสารตั้งต้นได้อย่างต่อเนื่องหรือตามลำดับ ซึ่งอาจนำไปสู่ความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงขึ้นและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ยาวนานขึ้น เพิ่มปริมาณ เมื่อเติมสารอาหารเข้าไป ปริมาณของอาหารในไบโอรีแอคเตอร์ก็จะเพิ่มขึ้น ทำให้ระยะเวลาการหมักนานขึ้นและเพิ่มความเข้มข้นของชีว

มวล์ได้(Thapa Magar, 2021) (Lim & Shin, 2013) โดยรวมแล้ว การหมักแบบป้อนนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม เนื่องจากมีความสามารถในการเพิ่มผลผลิตและประสิทธิภาพในกระบวนการต่างๆ เช่น การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ การสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะ และการประยุกต์ใช้ทางชีวอุตสาหกรรมอื่นๆ (Xavier, 2024) ดังนั้นงานวิจัยนี้ทำการศึกษาและเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ในการผลิตกรดซิตริก ประยุกต์การใช้เทคนิคการหมักแบบป้อนเพื่อเพิ่มผลผลิตและประสิทธิภาพในการสังเคราะห์กรดซิตริก โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการปรับปรุงกระบวนการผลิตกรดซิตริกเพื่อสนับสนุนการพัฒนาที่ยั่งยืนในอุตสาหกรรมเคมีชีวภาพ

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสูงสุดในการผลิตกรดซิตริก โดยการออกแบบการทดลองแบบบล็อก – เบห์นเคน (Box – behnken) ในระดับขบวนการหมัก
- 1.2.2 เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์การผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 โดยการหมักแบบป้อนในอาหารเหลว
- 1.2.3 เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์การผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3063 *A. luchuensis* SK01 โดยการหมักในอาหารเหลวในระดับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ 5 ลิตร ในกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ
- 1.2.4 เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์การผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 โดยการหมักแบบป้อนในอาหารเหลวในระดับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ 5 ลิตร ในกระบวนการหมักแบบป้อน
- 1.2.5 เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของกรดซิตริกจากเชื้อรา เปรียบเทียบกับกรดซิตริกทางการค้า
- 1.2.6 อธิบายกระบวนการผลิตกรดซิตริกโดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาผลกระทบขององค์ประกอบของอาหารมีผลต่อการผลิตกรดของเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3063 โดยการออกแบบการทดลองแบบบล็อก – เบห์นเคน (Box – behnken) ในระดับขบวนการหมัก เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสูงสุดของเชื้อราในการผลิตกรดซิตริกมากที่สุด โดยพิจารณา 3 ปัจจัย 3 ระดับ ได้แก่ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ความเร็วรอบในการเขย่า และปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์ เพื่อตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมในระดับห้องปฏิบัติการ ศึกษาจลนพลศาสตร์การผลิตกรดซิตริก จากการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ ได้ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์การผลิตกรด

ชิตริกของ *A. niger* TISTR 3063 โดยการหมักในอาหารเหลวในระดับขวดรูปชมพู่ใช้ในขยายการผลิต จากนั้นได้ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์การผลิตกรดชิตริกของ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 โดยการหมักในอาหารเหลวในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) 5 ลิตร และเปรียบเทียบในกระบวนการหมักแบบเปิดเสร็จ และแบบป้อน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสูงสุด สำหรับการผลิตกรดชิตริก หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราในสภาวะที่เหมาะสมสูงสุด ทำการแยกกรดชิตริกออกจากนํ้าหมัก โดยวิธีตกตะกอน เพื่อเปรียบเทียบลักษณะผลึกที่เกิดขึ้น และคุณสมบัติตะกอนกรดชิตริกที่ได้จากนํ้าหมัก และเปรียบเทียบกับกรดชิตริกเชิงพาณิชย์ ด้วยเทคนิควิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier transform Infrared Spectroscopy; FTIR) การวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณกรดอินทรีย์ในนํ้าหมัก ด้วยการวิเคราะห์แบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC) และทำการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุองค์ประกอบในสารตัวอย่าง โดยเทคนิค X-ray fluorescence; XRF โดยใช้การวัดปริมาณรังสีเอ็กซ์ฟลูออเรสเซนซ์ที่ปลดปล่อยออกมาจากธาตุองค์ประกอบแต่ละชนิดในสารตัวอย่าง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

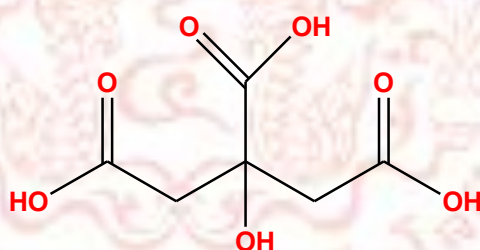
- 1.4.1 พัฒนาระบบการผลิตกรดชิตริกที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืนในระดับอุตสาหกรรม โดยการศึกษาองค์ประกอบของอาหารและการปรับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดชิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดชิตริกในกระบวนการหมักแบบป้อน ซึ่งเป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนการผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญ
- 1.4.2 สามารถเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดชิตริกได้อย่างเหมาะสม เช่น อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ความเร็วรอบในการเขย่า และปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์ ทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญในการปรับปรุงกระบวนการผลิตกรดชิตริกในระดับที่สูงขึ้น
- 1.4.3 ได้ทราบคุณสมบัติและองค์ประกอบของกรดชิตริกที่ได้จากนํ้าหมัก ช่วยให้สามารถประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์และเปรียบเทียบกับกรดชิตริกเชิงพาณิชย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- 1.4.4 งานวิจัยนี้ยังมีประโยชน์ในการสนับสนุนการพัฒนาที่ยั่งยืนในอุตสาหกรรมเคมีชีวภาพ และการผลิตกรดชิตริก ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการผลิตกรดชิตริกจากแหล่งทรัพยากรท้องถิ่น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดซิตริก

กรดซิตริก (citric) หรือ *2-hydroxy-propane-1,2,3-tricarboxylic acid* มีรากศัพท์มาจากภาษาละตินคำว่า *citrus* ซึ่งหมายถึงไม้ผลในสกุล Citrus เช่น ต้มมะนาว (Belén et al., 2010) กรดซิตริกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดอ่อน ลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี และสามารถละลายน้ำได้ดีในรูปบริสุทธิ์ ทั้งนี้ กรดซิตริกจัดเป็นกรดไตรเบสิก (tribasic acid) เนื่องจากมีหมู่ฟังก์ชันกรดทรिकาร์บอกซิลิก ภาพที่ 1 มีค่า pKa สามค่าคือ 3.13, 4.76 และ 6.39 ตามลำดับ (Sinko, 2023) กรดซิตริกอยู่ในสถานะของแข็งที่อุณหภูมิห้อง โดยมีจุดหลอมเหลวที่ 153°C และจุดเดือดที่ 310°C (Kubicek et al., 1998) กรดซิตริกมีอยู่ในสองรูปแบบหลัก ได้แก่ รูปแบบแอนไฮไดรส์ (Anhydrous) มีมวลโมเลกุล 192.12 และรูปแบบมอนอไฮเดรต (Monohydrate) มีมวลโมเลกุล 210.14 ทั้งสองรูปแบบสามารถละลายได้ในน้ำ อย่างไรก็ตาม กรดซิตริกในรูปแบบแอนไฮไดรส์สามารถละลายได้ดีในเอทานอล ในขณะที่รูปแบบมอนอไฮเดรตละลายได้ในอีเทอร์ในระดับจำกัดเท่านั้น



Citric acid

ภาพที่ 1 กรดซิตริก

ในปัจจุบัน การผลิตกรดซิตริกมีทั้งจากแหล่งธรรมชาติและการสังเคราะห์ โดยมีปริมาณการผลิตทั่วโลกในปี ค.ศ. 2020 อยู่ที่ 2.39 ล้านตัน และคาดการณ์ว่าจะเพิ่มขึ้นเป็น 2.91 ล้านตันภายในปี ค.ศ. 2026 (Lambros et al., 2022) กรดซิตริกมีการประยุกต์ใช้ในหลายอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง โดยใช้เป็นสารเพิ่มความเปรี้ยว (acidulant) เนื่องจากมีความสามารถในการละลายน้ำสูงและความเป็นพิษต่ำ รวมถึงมีบทบาทในการทำมาความสะอาดหม้อไอน้ำชนิดพิเศษ

ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อาหาร และขนมหวาน กรดซิตริกถูกใช้ในปริมาณมากในบทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สารช่วยกระจายตัว (emulsifier) สารบัฟเฟอร์ (buffer) สารจับโลหะ (chelating agent) สารปรุงแต่งรส และสารเพิ่มความเป็นกรด (Behera, 2020) นอกจากนี้ กรดซิตริกยังนำมาใช้แทนฟอสเฟตในสูตรผงซักฟอกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผงซักฟอก และยังใช้ในการทำความสะอาดโลหะและในผลิตภัณฑ์ซักล้างภายในครัวเรือน กรดซิตริกสามารถเกิดพันธะเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะ ซึ่งช่วยในการควบคุมปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและน้ำมัน และป้องกันการเร่งปฏิกิริยาโดยโลหะ (Lambros et al., 2022) แม้ว่ากรดซิตริกสามารถสกัดได้จากแหล่งธรรมชาติ เช่น มะนาว ส้ม และมะกรูด แต่ในทางปฏิบัติ พืชเหล่านี้ไม่สามารถผลิตกรดซิตริกในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการทางการค้าได้ ดังนั้น ปัจจุบันมีการใช้จุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อผลิตกรดซิตริกในปริมาณมาก โดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้มีทั้งแบคทีเรียและรา เช่น *Bacillus licheniformis*, *Arthrobacter paraffinens*, *Penicillium janthinellum*, *Candida spp.*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula anomala* และสายพันธุ์ในสกุล *Aspergillus* (Mores et al., 2021) การเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก ตัวอย่างเช่น (Pazouki & Panda, 1998) รายงานว่า *Candida parapsilosis* NH-3 สามารถผลิตกรดซิตริกได้ 0.09 กรัมต่อกรัมน้ำตาลจากกากน้ำตาลอ้อย อย่างไรก็ตาม *A. niger* ได้รับความนิยมสูงสุดเนื่องจากสามารถใช้วัตถุดิบที่หลากหลายและให้ผลผลิตกรดซิตริกในระดับสูง (Soccol et al., 2006) โดย *A. niger* สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงถึง 90 กรัมต่อลิตรในระบบการหมักแบบในอาหารเหลว โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (Chmiel, 1975) กรดซิตริกไม่ใช่เพียงแค่สารให้รสเปรี้ยว แต่เป็นสารอเนกประสงค์ที่เชื่อมโยงทั้งชีวเคมี อุตสาหกรรม และสิ่งแวดล้อม การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตที่เป็นมิตรต่อโลกจึงเป็นเป้าหมายสำคัญของการศึกษาวิจัยในปัจจุบัน

2.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดซิตริก

Wehmer เป็นผู้ค้นพบครั้งแรกว่า กรดซิตริกสามารถเกิดขึ้นเป็นผลพลอยได้ระหว่างกระบวนการผลิตแคลเซียมออกซาลेटโดยเชื้อ *Citromyces* ซึ่งในปัจจุบันจัดอยู่ในสกุล *Penicillium* จุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถสะสมกรดซิตริกได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลและเกลืออนินทรีย์ (Papagianni, 2007a) ภายหลังมีการค้นพบว่าจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์สามารถผลิตและสะสมกรดซิตริกได้ โดยเฉพาะเชื้อราในสกุล *Aspergillus* ได้แก่ *A. niger*, *A. awamori*, *A. nidulans*, *A. fonsecaeus*, *A. luchensis*, *A. phoenicus*, *A. wentii*, *A.saitoi*, *A. flavus* รวมถึงจุลินทรีย์สกุลอื่น ๆ เช่น *Absidia sp.*, *Acremonium sp.*, *Botrytis sp.*, *Eupenicillium sp.*, *Mucor piriformis*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium restrictum*, *Talaromyces sp.*, *Trichoderma viride* และ *Ustilina vulgaris*

ในปี ค.ศ. 1917 Currie รายงานว่า *A. niger* บางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีน้ำตาลและเกลืออนินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีค่า pH เริ่มต้นระหว่าง 2.5–3.5 และสามารถผลิตกรดซิตริกในปริมาณมากระหว่างการเจริญเติบโต ซึ่งถือเป็นรากฐานสำคัญของเทคโนโลยีการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม (Currie, 1917) นอกเหนือจากเชื้อรา ยังพบว่ายีสต์บางชนิดสามารถผลิตกรดซิตริกได้จาก *n*-alkanes และคาร์โบไฮเดรต (Mattey, 1999) โดยเฉพาะในสกุล *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Torula*, *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* และ *Yarrowia* ในช่วงทศวรรษที่ 1960–1970 เมื่อราคาน้ำมันยังอยู่ในระดับต่ำ ยีสต์ *Candida* spp. เช่น *C. tropicalis*, *C. catenula*, *C. guilliermondii* และ *C. intermedia* ใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อผลิตกรดซิตริกจากน้ำมัน อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน แนวทางนี้ไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ นอกจากนี้ ยีสต์มักผลิต isocitric acid ซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่ไม่ต้องการในปริมาณมาก การแก้ไขปัญหานี้สามารถทำได้โดยใช้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ **isocitrate dehydrogenase** และ **aconitase** ต่ำ เอนไซม์เหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในการแปลงกรดซิตริกไปเป็นสารอื่น ๆ เช่น อะโคนิเตส (aconitate) และไอโซซิเตรต (isocitrate) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการเผาผลาญพลังงานในเซลล์ โดยเอนไซม์ aconitase จะทำงานเพื่อเปลี่ยนกรดซิตริกเป็นสารอื่นในกระบวนการเครบส์ เมื่อมีแหล่งคาร์บอนสูง (เช่น น้ำตาล) เข้ามาในกระบวนการหมัก อัตราการเผาผลาญจะเพิ่มขึ้น แต่การทำงานของเอนไซม์เหล่านี้จะยับยั้งเมื่อมีปริมาณคาร์บอนสูงเกินไป ทำให้เส้นทางการเผาผลาญไม่สามารถดำเนินต่อไปได้ตามปกติ ซึ่งจะทำให้กรดซิตริกสะสมมากขึ้นในเซลล์ เมื่อ aconitase และ isocitrate dehydrogenase ยับยั้ง การเปลี่ยนแปลงของกรดซิตริกในกระบวนการเครบส์จะหยุดชะงัก ซึ่งทำให้กรดซิตริกสะสมในเซลล์ของจุลินทรีย์แทนที่จะเปลี่ยนเป็นสารอื่นๆ ที่ใช้ในกระบวนการเผาผลาญพลังงาน นี่คือนิยามสำคัญที่ช่วยเพิ่มผลผลิตของกรดซิตริกในกระบวนการหมัก เนื่องจากกรดซิตริกสะสมและสามารถปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้น การปรับเพิ่มแหล่งคาร์บอนสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ aconitase และ isocitrate dehydrogenase ซึ่งจะทำให้กรดซิตริกสะสมในเซลล์ของจุลินทรีย์มากขึ้น และกระบวนการนี้ช่วยเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกในขั้นตอนการหมัก โดยที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปเป็นสารอื่นในกระบวนการเครบส์ (Latif et al., 2025)

แม้ว่าจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้ผลิตกรดซิตริกได้ แต่ *A. niger* ยังคงเป็นจุลินทรีย์หลักที่ใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการผลิตสูงและสามารถใช้วัตถุดิบตั้งต้นได้หลากหลาย สายพันธุ์ของ *A. niger* ที่ได้รับการคัดเลือกและพัฒนาสามารถผลิตกรดซิตริกได้ในระดับสูงทั้งในกระบวนการหมักแบบผิวหน้า แบบจม และแบบสถานะของแข็ง จากการคำนวณทางทฤษฎี ปริมาณกรดซิตริกที่สามารถได้สูงสุดคือ 112 กรัม ของกรดซิตริกในอาหารเหลวต่อซูโครส 100

กรัม อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติ ผลผลิตจริงมักอยู่ที่ประมาณ 70% ของค่าสูงสุดเชิงทฤษฎี เนื่องจากการสูญเสียในระยะ trophophase (ระยะเจริญเติบโตและสะสมเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ) แม้ว่า *A. niger* จะนำมาใช้อย่างกว้างขวางและประสบความสำเร็จในการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม แต่จนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีคำอธิบายที่เป็นเอกฉันท์และสมบูรณ์เกี่ยวกับกลไกทางชีวเคมีของกระบวนการนี้

2.3 การคัดเลือกเชื้อราสำหรับการผลิตกรดซิตริก

หนึ่งในปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างสำคัญต่อประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตกรดซิตริก คือ การคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก โดยเฉพาะเชื้อราจากสกุล *Aspergillus* ซึ่งได้รับการศึกษาและใช้งานอย่างแพร่หลายมาอย่างยาวนานในด้านการผลิตกรดซิตริก เชื้อรา *A. niger* เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับความนิยมสูงสุดในการผลิตเชิงพาณิชย์ เนื่องจากมีศักยภาพในการผลิตกรดซิตริกในระดับสูง และสามารถเจริญเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย (Papagianni et al., 1999) นอกจากนี้ *A. niger* แล้ว ยังมีรายงานการใช้ *Aspergillus awamori* และ *Aspergillus luchuensis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีบทบาทในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แบบดั้งเดิมในภูมิภาคเอเชียตะวันออก เช่น การผลิตสุราอะวะมะริของประเทศญี่ปุ่น (O. Yamada et al., 2016) (S. Hong et al., 2013) ทั้งนี้ ยังมีการศึกษาสายพันธุ์อื่น ๆ ของเชื้อราในสกุล *Aspergillus* เพื่อประเมินศักยภาพในการผลิตกรดซิตริก เช่น *A. terreus* และ *A. tamaraii* แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่น่าพึงพอใจในระดับห้องปฏิบัติการ (Bhattacharjee & Baruah, 2015) กระบวนการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรามักเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงบนวัสดุตั้งต้นต่าง ๆ และการประเมินความสามารถในการผลิตกรดซิตริกภายใต้เงื่อนไขการหมักที่แตกต่างกัน โดยมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของปัจจัยต่าง ๆ เช่น ค่า pH อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารอาหาร และชนิดของวัตถุดิบตั้งต้น (Chergui et al., 2021) เทคนิคการหมักเองยังเป็นอีกตัวแปรหนึ่งที่ส่งผลต่อผลผลิตของกรดซิตริกอย่างชัดเจน โดยสายพันธุ์เชื้อราบางสายอาจให้ผลผลิตที่ดีภายใต้กระบวนการหมักในอาหารเหลว (Submerged Fermentation) แต่ให้ผลผลิตต่ำในระบบหมักแบบสถานะของแข็ง (Solid-State Fermentation) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทดสอบความเหมาะสมของแต่ละสายพันธุ์ร่วมกับเทคนิคการหมักที่หลากหลาย รวมถึงการใช้วัสดุตั้งต้นที่เป็นผลพลอยได้ทางอุตสาหกรรม เพื่อคัดเลือกสภาวะการผลิตที่เหมาะสมที่สุด (Chen et al., 2014) การถ่ายโอนอาจอยู่ในรูปของแขวนลอยในของเหลว และนำเข้าสู่ระบบหมัก เช่น ขวดเขย่า หรือเครื่องหมักในระดับอุตสาหกรรม โดยทั่วไป การบ่มเชื้อ *A. niger* สำหรับการผลิตกรดซิตริกให้ได้ผลผลิตสูงสุดต้องใช้เวลาประมาณ 7 วัน อย่างไรก็ตาม หลังจากระยะเวลานี้ ความสามารถในการออกของสปอร์จะเริ่มลดลงตามเวลา (Vergano et al., 1996)

ตารางที่ 1 สายพันธุ์เชื้อราที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา

1 (K)	<i>Aspergillus oryzae</i>	NCIM-647
2 (L)	<i>Aspergillus flavus</i>	NCIM-650
3 (M)	<i>Aspergillus wentii</i>	NCIM-661
4 (N)	<i>Aspergillus fonsecae</i>	NCIM-511
5 (O)	<i>Aspergillus niger</i>	NCIM-683

ในกระบวนการผลิตกรดซิตริกด้วย *A. niger* การเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูง (potent strain) เป็นขั้นตอนสำคัญ เนื่องจากแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้คาร์บอนจากกากน้ำตาล การสังเคราะห์กรดซิตริก และการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน การคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มผลผลิตสูงสุด ลดการสร้างผลิตภัณฑ์ไม่พึงประสงค์ และปรับปรุงประสิทธิภาพของกระบวนการหมักให้เหมาะสมกับเงื่อนไขทางอุตสาหกรรม เช่น ความเข้มข้นของคาร์บอนและไนโตรเจน การเติมธาตุรอง และสภาพกายภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้น การวิจัยในปัจจุบันจึงเน้นการประเมินสายพันธุ์ *A. niger* หลายชนิด โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริก การเจริญของไมซีเลียม และการสร้างเมแทบอไลต์อื่น ๆ ผลลัพธ์จากการศึกษาเหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงกระบวนการผลิตเชิงอุตสาหกรรมให้ได้ผลผลิตกรดซิตริกสูง ลดต้นทุน และเพิ่มความสม่ำเสมอของผลิตภัณฑ์

2.4 เชื้อรา *A. niger*

Aspergillus เป็นสกุลของเชื้อราชั้นสูงที่มีขนาดใหญ่ ประกอบด้วยสายพันธุ์มากกว่า 250 ชนิด ซึ่งในปัจจุบันจัดจำแนกออกเป็น 7 สกุลย่อย (subgenera) และแต่ละสกุลย่อยแบ่งย่อยออกเป็นกลุ่มย่อย (sections) ตามลักษณะทางอนุกรมวิธานของสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน (Raper and Fennell, 1965; Gams et al., 1985; Geiser et al., 2007) โดยทั่วไป ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางคลินิกมักอาศัยการจำแนกชนิดของเชื้อ *Aspergillus* จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ตาม มีหลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะกลุ่ม *Aspergillus* section *Fumigati* ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ซับซ้อนกัน จึงนำไปสู่ความคลาดเคลื่อนในการจำแนกชนิดของเชื้อที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (Balajee et al., 2005; 2007) จากปัญหาดังกล่าวจึงมีการจัดกลุ่มเชื้อที่มีลักษณะที่ซับซ้อนกันเข้าเป็น “species complexes” เพื่อให้การรายงานผลในห้องปฏิบัติการมีความแม่นยำมากขึ้นแม้อิงจากข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

เชื้อ *A. niger* เป็นสปอร์ชนิดหนึ่งในกลุ่ม *Aspergillus section nigri* ซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเป็นเชื้อราที่พบได้ทั้งในดิน น้ำ พืช ซากอินทรีย์ มูลสัตว์ และในบรรยากาศ สายพันธุ์ในสกุล *Aspergillus* มักมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และสามารถสร้างสปอร์ได้ภายในไม่กี่วันหลังจากเริ่มงอก โดยเฉพาะ *A. niger* ถือเป็นจุลชีพที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในอุตสาหกรรม เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์หลายชนิด โปรตีน เอนไซม์ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้ในปริมาณสูง อันเนื่องมาจากความหลากหลายทางเมตาบอลิซึม ความสามารถในการหลั่งสารออกนอกเซลล์ และศักยภาพในการดัดแปรโปรตีนหลังการแปลรหัส (post-translational modification)

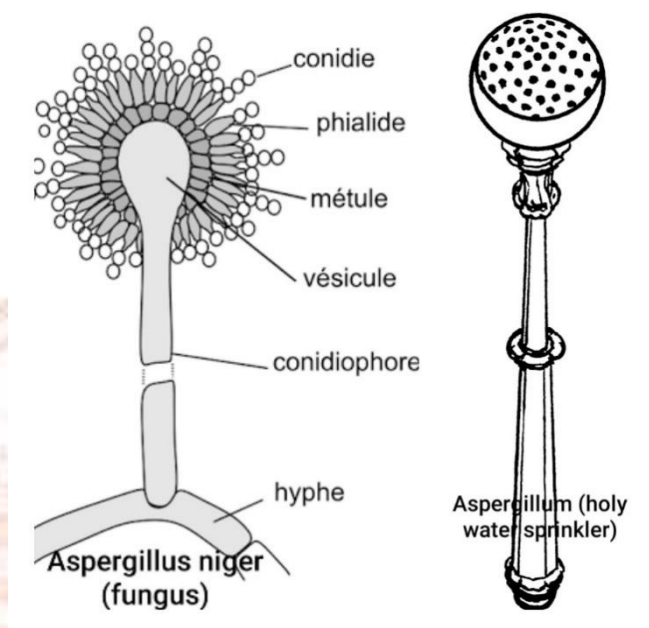


ภาพที่ 2 อนุกรมวิธาน Taxonomy เชื้อรา *A. niger*

นอกจากนี้ *A. niger* ยังทนทานต่อสภาวะความเป็นกรดสูงได้ดี จึงเหมาะสมอย่างยิ่งในการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตาม เชื้อรา *A. niger* ก็เป็นเชื้อปนเปื้อนทั่วไปในอาหาร โดยเป็นสาเหตุของการเกิด “เชื้อราดำ” (black mold) ในองุ่น แอปริคอต หัวหอม ถั่วลิสง และผลผลิตทางการเกษตรอื่นๆ ทั้งยังพบได้ทั่วไปในดินและในอาคาร ที่ซึ่งโคโลนีของมันมักมีสีดำคล้ายกับ *Stachybotrys* ซึ่งบางครั้งก็เรียกรวมกันว่า “เชื้อราดำ” เช่นกัน *A. niger* จะสามารถผลิตสารบางชนิดที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพมนุษย์ได้ แต่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US FDA) จัดให้ *A. niger* อยู่ในกลุ่ม “Generally Recognized As Safe” (GRAS) สำหรับการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งสะท้อนถึงการยอมรับในความปลอดภัยของสายพันธุ์นี้ภายใต้เงื่อนไขการใช้งานที่ควบคุมได้

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สมัยใหม่ในทศวรรษต่อมาเผยให้เห็นว่า *A. niger* เป็นผู้ผลิตโปรตีนที่หลากหลายและมีประสิทธิภาพ โปรตีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับกลไกเฉพาะตัวไม่พบในเชื้อราสายใย

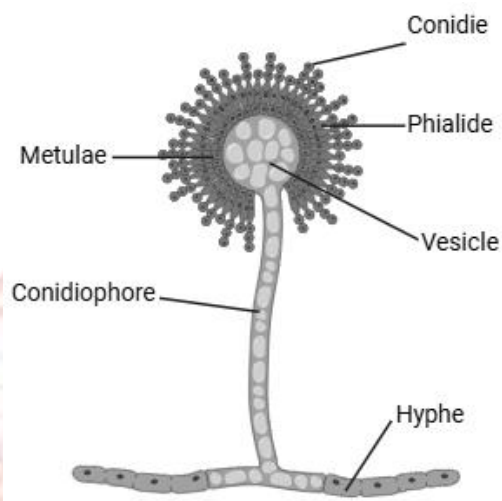
อื่น ๆ แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์นี้มีความยืดหยุ่นสูงในระดับการผลิตภายในเซลล์ การค้นพบเหล่านี้ช่วยเพิ่มความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับหน้าที่ของเอนไซม์และนำไปสู่การผลิตเอนไซม์นอกเซลล์จำนวนมาก เช่น α -amylase, oxidase, catalase, dehydrogenase, hydrolase, cellulase และ pectinase การเกิดขึ้นของชีววิทยาระดับโมเลกุลและเทคนิคทรานสคริปโตมิกและเมตาบอโลมิก เผยให้เห็นข้อมูลใหม่จำนวนมากและอนุญาตให้ถอดรหัสจีโนมของสายพันธุ์ *A. niger* บางสายพันธุ์ได้สำเร็จ เหตุการณ์เหล่านี้เปิดมุมมองใหม่ทั้งในการศึกษาสารเคมีและการประยุกต์เทคโนโลยีชีวภาพ และช่วยให้เข้าใจยีนของสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การแบ่งตัว ความแตกต่างของเซลล์ สรีรวิทยา และการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ตลอดศตวรรษที่ผ่านมา การศึกษาเชิงวิทยาศาสตร์เหล่านี้ส่งผลให้เกิดกระบวนการและสารประกอบใหม่มากมาย และทำให้ความสนใจต่อความหลากหลายทางเคมีและศักยภาพทางเภสัชวิทยาของสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิจาก *A. niger* เพิ่มขึ้น การศึกษาเน้นไปที่การคัดกรองสารชีวภาพโดยใช้สายพันธุ์จากแหล่งต่าง ๆ การปรับเปลี่ยนเส้นทางการหมัก การแก้ไขจีโนม การปรับยีนผ่านอพิเจเนติก และการแปรสภาพเชิงจุลินทรีย์ เผยให้เห็นว่า *A. niger* เป็นเครื่องมือที่ทรงพลังในการผลิตสารประกอบที่หลากหลายและซับซ้อนเชิงโครงสร้าง ซึ่งมีศักยภาพสูงในงานวิจัยระดับทดลอง ลักษณะและการเกิดของ *A. niger* สายพันธุ์ในกลุ่ม *Aspergillus section Nigri* มีลำต้นเรียวยาวและหัวสปอร์สีดำกลม ซึ่งประกอบด้วยสปอร์รูปร่างเฉพาะที่เกิดจากร่างกายของเชื้อราเป็นส่วนหนึ่งของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ชื่อ '*Aspergillus*' มาจากคำภาษาละติน '*aspergillum*' ซึ่งแปลคร่าวๆ ว่า 'อุปกรณ์พรมน้ำมนต์ใช้ในพิธีกรรมทางศาสนา' (Hidaka et al., 1988) แสดงดังภาพที่ 3 ซึ่งหมายถึงรูปร่างของสปริงเกลอร์เหล่านี้คล้ายกับลักษณะของเชื้อราเหล่านี้มากเมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ *A. niger* สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่มีอากาศเกือบทุกชนิด มีความทนต่อความร้อน สามารถอยู่รอดในอุณหภูมิจาก -6 ถึง 47 °C ค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตคือ 6 แต่สามารถทนได้ตั้งแต่ 1.5 ถึง 9.8 ความชื้นสัมพัทธ์และความพร้อมของน้ำที่เหมาะสมที่สุดคือ 96–98% และ 0.97 ตามลำดับ สปอร์สีดำของ *A. niger* ช่วยปกป้องจากรังสี UV และให้ความได้เปรียบในการแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่น ๆ



ภาพที่ 3 ภาพนี้เปรียบเทียบโครงสร้างของ *A. niger* กับอุปกรณ์ที่เรียกว่า *aspergillum* ซึ่งใช้พรมประพรมน้ำมนต์ในพิธีทางศาสนา (<https://twitter.com/AminaEllmam/status/133598316>)

2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. niger*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. niger* คล้ายกับเชื้อราเส้นใยชนิดอื่น โดยมีการสร้างเส้นใย (hyphae) ที่แผ่กระจายออกไปคล้ายโครงสร้างของพืช เมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภาพที่ 4 จะพบว่าโคนิเดียฟอร (conidiophores) และสปอร์ของ *A. niger* มีพื้นผิวเรียบและไม่มีสี อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาอย่างละเอียดจะพบว่าศีรษะของโคนิเดีย (conidial head) มีลักษณะกลม (globose) และมีสีเข้มจนถึงน้ำตาลเข้ม โดยเมื่อเชื้อราเข้าสู่ระยะเจริญเติบโตมากขึ้น ศีรษะโคนิเดียจะเริ่มแยกออกเป็นคอลัมน์จำนวนมาก ลักษณะเฉพาะที่สำคัญของ *A. niger* คือการมีหัวโคนิเดียแบบ biseriate ซึ่งสามารถสร้างสปอร์สีดำหรือน้ำตาลเข้ม ลักษณะดังกล่าวถือเป็นเครื่องหมายจำแนกทางสัณฐานวิทยาที่ชัดเจน ซึ่งช่วยให้สามารถแยกแยะ *A. niger* ออกจากสายพันธุ์อื่นในสกุลเดียวกันได้ เนื่องจากยังไม่พบคุณลักษณะนี้ในสายพันธุ์ *Aspergillus* อื่น ๆ สีของสปอร์และโคนิเดียที่มีลักษณะเป็นคาร์บอนแบล็กหรือน้ำตาลเข้มจึงเป็นดัชนีสำคัญในการระบุชนิดของ *A. niger*



ภาพที่ 4 สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. niger*

A. niger มีลักษณะทั่วไปเป็นเชื้อราไม่มีก้านสปอร์แบบแบ่งเดี่ยว แต่สร้างเส้นใยที่มีการแตกแขนง (branched hyphae) เส้นใยของเชื้อรามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4–6 ไมครอน และมีลักษณะกลวงเล็กน้อยภายใน ทำให้สามารถขยายตัวและเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงได้รวดเร็ว การเจริญเติบโตของเส้นใยเริ่มจากสปอร์ (conidia) เมื่อสปอร์แตกจะเกิดท่อเจริญ (germ tube) ซึ่งจะยาวออกไปและแตกแขนงซ้ำ ๆ จนเกิดโครงข่ายเส้นใย (mycelial network) ที่ครอบคลุมพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Gao et al., 2011) หัวสปอร์ (conidial head) ของ *A. niger* เป็นลักษณะกลม มีสีดำหรือเกือบดำ ซึ่งเกิดจากการสะสมเมลานินในผนังสปอร์ เมลานินนี้ช่วยป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต และเพิ่มความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง เช่น อุณหภูมิสูงหรือความแห้งกร้าน (Luther et al., 2007) โครงสร้างหัวสปอร์ประกอบด้วยโคนสปอร์ (conidiophore stalk) ที่ยาวและตั้งตรงปลายโคนจะแตกเป็น vesicle ขนาดเล็ก และมี phialides กระจายรอบ vesicle phialides นี้เป็นจุดที่สปอร์สร้างออกมาอย่างต่อเนื่อง การจัดเรียงของสปอร์และ phialides เป็นลักษณะเฉพาะที่ช่วยในการจำแนกสายพันธุ์ของ *A. niger* จากเชื้อราในกลุ่ม Aspergillus ชนิดอื่น ๆ (Samson et al., 2014)

การสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. niger* สามารถทำได้ทั้งในระดับมหภาคและจุลภาค ในระดับมหภาค การเจริญของเชื้อราบนจานเพาะเลี้ยงแสดงให้เห็นโครงสร้าง colony ที่หนาแน่นและมีสีดำเข้มที่เกิดจากสปอร์จำนวนมาก ผิว colony มักเรียบหรือมีลักษณะเป็นปุ่มเล็ก ๆ และมีเส้นใยด้านล่างช่วยยึดกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนในระดับจุลภาค การใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscopy หรือ scanning electron microscopy (SEM) จะสามารถเห็นรายละเอียดของ hyphae, conidiophore, vesicle, phialides และสปอร์ที่มีผนังหนาและเรียบหรือมีปุ่มเล็ก ๆ

(Bennett & Klich, 2003) ลักษณะสัณฐานวิทยาที่โดดเด่นของ *A. niger* ยังเกี่ยวข้องกับพฤติกรรม การเจริญในกระบวนการหมักอาหารเหลว (SF) และกระบวนการหมักอาหารแข็ง (SSF) ในการหมัก แบบ SF เส้นใยมักลอยตัวในของเหลวและเกิด pellet formation ซึ่งมีผลต่อการแพร่กระจายของ ออกซิเจนและการผลิตเอนไซม์ ในขณะที่ใน SSF เส้นใยจะแพร่กระจายบนพื้นผิววัสดุแข็งและสร้าง biofilm ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์หรือกรดซิตริกเพิ่มขึ้น (Soccol et al., 2017) (Villena et al., 2001) นอกจากนี้ ความสามารถของ *A. niger* ในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อม เช่น ความเป็นกรดสูงหรืออุณหภูมิหลากหลาย ยังสัมพันธ์กับโครงสร้างสัณฐานวิทยาของเชื้อรา เมล็ดในผนัง สปอร์และโครงสร้าง hyphal network ช่วยเพิ่มความทนทานต่อความเครียดทางสิ่งแวดล้อม และมีบทบาทต่อการแพร่กระจายของเชื้อราในธรรมชาติและในอุตสาหกรรม (Luther et al., 2007) (Cairns et al., 2019)

2.4.2 ลักษณะทางการเพาะเลี้ยงของ *A. niger*

A. niger เป็นเชื้อราแบบเส้นใย (filamentous fungus) ที่แสดงลักษณะจำเพาะทางการ เพาะเลี้ยงเมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ โดยมีลักษณะเด่นชัดหลายประการ ได้แก่ รูปร่างของโคโลนี การสร้างสปอร์ อัตราการเจริญเติบโต และความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะ แวดล้อมที่หลากหลาย เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ *A. niger* จะสร้างโคโลนีที่มีลักษณะแบน ผิวสัมผัสคล้ายกำมะหยี่ (velvety) และมีสีมะกอกดำ (olive-black) แสดงถึงภาพที่ 5 โดยโคโลนี สามารถขยายเส้นผ่านศูนย์กลางได้ถึง 7 เซนติเมตร ภายในระยะเวลาเพียง 5–7 วัน แสดงถึง ความสามารถในการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เชื้อรานี้มีการสร้างสปอร์จำนวนมากบริเวณผิวหน้าของ โคโลนี โดยในระยะแรกจะมีสีขาวหรือเหลือง และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือดำเมื่อเข้าสู่ระยะสุก เต็มที่

เชื้อรา *A. niger* ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญเติบโต (strict aerobe) โดยสามารถ เพาะเลี้ยงได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลากหลายชนิด เช่น potato dextrose agar (PDA), Sabouraud dextrose agar (SDA), Czapek Dox agar รวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งรองรับการใช้ศึกษาทั้งในงานวิจัยพื้นฐานและอุตสาหกรรม ในด้านความทนต่อค่า pH พบว่า *A. niger* มีความสามารถในการเจริญได้ในช่วง pH กว้างตั้งแต่ 1.5 ถึง 9.8 นอกจากนี้ ยังจัดเป็นเชื้อราใน กลุ่มไซโรไฟล์ (xerophilic fungi) ซึ่งสามารถเจริญและสืบพันธุ์ได้ในสภาวะแห้งแล้งอย่างรุนแรง ขณะเดียวกันก็สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่ชื้นสูง โดยสามารถทนต่อความชื้นสัมพัทธ์ในระดับ 90–100% ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในด้านอุณหภูมิ *A. niger* แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการ เจริญเติบโตได้ในช่วงกว้างตั้งแต่ 6 ถึง 47 องศาเซลเซียส โดยจัดอยู่ในกลุ่มเมโสไฟล์ (mesophilic)

fungi) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 35–37 องศาเซลเซียส ความสามารถดังกล่าวทำให้เชื้อ *A. niger* เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในกระบวนการชีวภาพภายใต้เงื่อนไขการควบคุมที่หลากหลาย ทั้งในห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม



ภาพที่ 5 *A. niger* ที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อมันฝรั่งเด็กซ์โทรส

2.4.3 วัฏจักรชีวิตของ *A. niger*

A. niger เป็นเชื้อราแบบมีเส้นใย (filamentous fungus) ซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยผ่านการสร้างสปอร์ชนิดโคนิเดีย (conidial spores) วัฏจักรชีวิตของ *A. niger* เริ่มต้นจากการแพร่กระจายของสปอร์โคนิเดียไปยังพื้นผิวที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการงอกของสปอร์อยู่ในช่วง 25–40 องศาเซลเซียส และค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 2–9 เมื่อโคนิเดียตกลงบนพื้นผิวที่เหมาะสม สปอร์จะเริ่มงอกและสร้างเซลล์พืช (vegetative cell) ซึ่งพัฒนาเป็นเส้นใยรา (hyphal mycelium) จากนั้นจึงแตกกิ่งเป็นเส้นใยตั้งตรง (aerial hyphae) ผ่านกระบวนการแตกแขนงแบบคู่ (dichotomous branching) เส้นใยตั้งตรงเหล่านี้จะเจริญเป็นโคนิเดียฟอว์ (conidiophore) ซึ่งเป็นโครงสร้างเฉพาะที่มีหน้าที่สร้างโคนิเดีย บริเวณปลายยอดของโคนิเดียฟอว์จะพองออกเป็นถุงรูปทรงกลมเรียกว่าเวสิเคิล (vesicle) ซึ่งเป็นจุดกำเนิดของเซลล์ปลายที่เรียกว่าไฟออลิด (phialide) โดยไฟออลิดจะสร้างสเตอริกมาตา (sterigmata) ชั้นที่สองซึ่งมีบทบาทในการสร้างสปอร์ ในขั้นตอนสุดท้าย สปอร์โคนิเดียจะสร้างเป็นสายโซ่บนยอด

ของไฟอาลิต และจัดเรียงตัวเป็นรูปแบบคอลัมน์หรือหลายแถว โคนิเดียของ *A. niger* เป็นโครงสร้างหลายเซลล์ (multicellular) ที่มีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายและการอยู่รอดของเชื้อรา เนื่องจากมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย และสามารถคงสภาพอยู่ในสภาพแวดล้อมที่รุนแรงเป็นระยะเวลานานได้ สปอร์เหล่านี้สามารถแพร่กระจายผ่านอากาศ น้ำ หรือพาหะอื่น ๆ และพร้อมจะงอกเมื่อถึงสภาวะที่เหมาะสมบนพื้นผิวใหม่ (Saini et al.)

วัฏจักรชีวิตของ *A. niger* ประกอบด้วยขั้นตอนพัฒนาที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีความสำคัญต่อการสืบพันธุ์และการแพร่กระจายของเชื้อรา ความสามารถในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศผ่านการสร้างโคนิเดียช่วยให้ *A. niger* สามารถปรับตัวอย่างรวดเร็วต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง และเข้ายึดครองแหล่งอาศัยใหม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ *A. niger* จึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีความยืดหยุ่นสูง และเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรมในหลากหลายรูปแบบ

2.4.6 การประยุกต์ใช้ *A. niger* ในอุตสาหกรรม

A. niger เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายแขนง เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์หลากหลายชนิด โดยเฉพาะในด้านการผลิตกรดซิตริก ซึ่ง *A. niger* เป็นสายพันธุ์หลักที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดชนิดนี้ในระดับอุตสาหกรรม กรดซิตริกมีการใช้จากงานวิจัย *A. niger* ถือเป็นหนึ่งในเชื้อราชั้นนำที่มีความสำคัญเชิงอุตสาหกรรมเนื่องจากความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์หลายชนิดและเอนไซม์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะกรดซิตริก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมักเชื้อรา *A. niger* ในระดับอุตสาหกรรม กระบวนการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อราชนิดนี้มีความได้เปรียบหลายประการ เช่น ความสามารถในการเจริญได้ดีในสภาพความเป็นกรดต่ำ (low pH) และการต้านทานต่อเชื้อปนเปื้อน ทำให้เหมาะสมต่อการผลิตในปริมาณมาก (Papagianni, 2007; Soccol et al., 2017) การประยุกต์ใช้ *A. niger* ยังขยายไปสู่การผลิตสารชีวภาพที่มีความซับซ้อนทางเคมี เช่น secondary metabolites ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ในงานวิจัยและพัฒนาใหม่ๆ การแก้ไขพันธุกรรมของเชื้อรา การควบคุมสภาวะแวดล้อมในไบโอรีแอक्टर และการพัฒนาสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง เป็นสิ่งสำคัญในการเพิ่มผลผลิตและ

ความสามารถในการแข่งขันของอุตสาหกรรมชีวภาพ (Schuster et al., 2002; Andersen et al., 2011)

2.5 เชื้อรา *Aspergillus luchuensis*

Aspergillus luchuensis เป็นเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus section nigri* หรือที่รู้จักกันทั่วไปว่า “เชื้อราโคจิดำ” (black koji mold) ซึ่งมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการหมักของเอเชียตะวันออก โดยเฉพาะการผลิตสุราพื้นเมืองของญี่ปุ่น เช่น เหล้ากลั่นโชจู (shochu) และอาวาโมริ (awamori) (Kadooka et al., 2020; Yamada et al., 2016; Futagami, 2022) เชื้อรายังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายแป้ง เช่น อัลฟา-อะไมเลส และกลูโคสอะไมเลส ซึ่งมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงในวัตถุดิบหมัก (เช่น ข้าว ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี มันเทศ และบักวีท) ให้กลายเป็นกลูโคสสำหรับการหมักโดยยีสต์ (Kadooka et al., 2020; Futagami, 2022) คุณสมบัติที่โดดเด่นอีกประการหนึ่งคือ ความสามารถในการผลิตกรดซิตริกในปริมาณสูงในระหว่างการเจริญและการหมัก กรดซิตริกดังกล่าวช่วยลดค่า pH ของระบบหมักให้อยู่ในระดับต่ำ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ไม่พึงประสงค์ และเพิ่มความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์หมัก (Yamada et al., 2016; Futagami, 2022) ความสามารถนี้ทำให้ *A. luchuensis* แตกต่างจากเชื้อราโคจิสายพันธุ์อื่น เช่น *A. oryzae* ซึ่งใช้ในการผลิตสาเก แต่ไม่มีการสร้างกรดซิตริกในระดับสูง ในด้านอนุกรมวิธาน *A. luchuensis* มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการกับ *A. niger* ซึ่งนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการผลิตกรดซิตริกเชิงอุตสาหกรรม (Hong et al., 2013; Kadooka et al., 2020) อย่างไรก็ตาม การศึกษาเชิงลึกด้านพันธุกรรมและสัณฐานวิทยา พบว่า *A. luchuensis*, *A. kawachii* และ *A. acidus* เป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และจัดเป็นสปีชีส์เดียวโดยใช้ชื่อ *A. luchuensis* ตามหลักเกณฑ์ความสำคัญด้านอนุกรมวิธาน (priority rule) (Hong et al., 2013) ทั้งนี้ *A. kawachii* ซึ่งเป็นอัลไบโนมิวแทนต์ของ *A. luchuensis* ได้รับการจัดให้เป็น *A. luchuensis* mut. *kawachii* เนื่องจากมีความสำคัญสูงในภาคอุตสาหกรรมการผลิตโชจู (Yamada et al., 2016; Futagami, 2022) อีกหนึ่งคุณลักษณะที่สำคัญของ *A. luchuensis* คือความปลอดภัยในการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร งานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมไม่มีการสร้างสารพิษไมโคท็อกซิน (mycotoxins) ที่เป็นอันตราย เช่น Ochratoxin A (OTA) และ Fumonisin B ซึ่งแตกต่างจากเชื้อราใน *section Nigri* บางชนิด (Hong et al., 2013; Yamada et al., 2016) ส่งผลให้ *A. luchuensis* ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe, GRAS) ในบริบทของการหมักอาหารและเครื่องดื่ม

2.6 ประวัติของเชื้อรา *Aspergillus luchuensis*

เชื้อรา *A. luchuensis* มีประวัติการใช้ที่ยาวนานในวัฒนธรรมการหมักของญี่ปุ่น โดยเฉพาะในเกาะโอกินาวาและคิวชู ซึ่งมีการนำเชื้อนี้มาใช้ผลิตสุราพื้นเมือง เช่น อาวาโมริ (*awamori*) และโชจู (*shochu*) มานานหลายร้อยปี (Hong et al., 2013; Osamu Yamada et al., 2016) บทบาทสำคัญ of เชื้อนี้อยู่ที่การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งและการผลิตกรดซิตริก ซึ่งช่วยป้องกันการปนเปื้อนและทำให้การหมักมีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้เชื้อราในสกุลอื่น ในปี ค.ศ. 2013 Hong และคณะ ได้ทำการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาและพันธุกรรมเชิงลึก โดยใช้ข้อมูลจาก multilocus sequence typing (MLST) และการเปรียบเทียบยีนหลายตำแหน่ง เช่น ITS, β -tubulin และ calmodulin ผลการศึกษาได้ยืนยันว่า *A. luchuensis*, *A. kawachii* และ *A. acidus* เป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และควรถูกรวมเป็นสปีชีส์เดียวกันภายใต้ชื่อ *A. luchuensis* ตามกฎของอนุกรมวิธานสากล (priority rule) (Hong et al., 2013) การจัดจำแนกใหม่นี้ช่วยแก้ไขความสับสนที่เกิดขึ้นมาอย่างยาวนานและสร้างความชัดเจนต่อการวิจัยศาสตร์และอุตสาหกรรม นอกจากนี้ ความสำคัญของ *A. luchuensis* ยังสะท้อนให้เห็นผ่านการศึกษาทางจีโนมิกส์ (genomics) โดย Yamada และคณะ (2016) ได้ถอดรหัสจีโนมของ *A. luchuensis* *mut. kawachii* ซึ่งเป็นสายพันธุ์อัลไบโนที่ใช้อย่างกว้างขวางในโรงงานผลิตโชจู ข้อมูลจีโนมดังกล่าวเผยให้เห็นกลไกทางชีวโมเลกุลในการสร้างเอนไซม์และการควบคุมการผลิตกรดซิตริก ซึ่งต่อมาได้นำไปประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์และกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม การบันทึกทางประวัติศาสตร์ของญี่ปุ่นระบุว่า *A. luchuensis* นำมาใช้ครั้งแรกในภูมิภาคริวกิว (ปัจจุบันคือจังหวัดโอกินาวา) เมื่อประมาณศตวรรษที่ 15–16 ร่วมกับการแพร่กระจายของเทคโนโลยีการหมักจากประเทศจีนสู่หมู่เกาะญี่ปุ่น (Futagami, 2022) นับแต่นั้นมา เชื้อนี้ได้กลายเป็นส่วนสำคัญของมรดกภูมิปัญญาทางวัฒนธรรม และกำหนดให้เป็นจุลินทรีย์พื้นบ้านที่มีบทบาทเฉพาะในการสร้างเอกลักษณ์ของสุราอาวาโมริและโชจู

2.7 ถิ่นอาศัยของเชื้อรา *Aspergillus luchuensis*

เชื้อรา *A. luchuensis* จัดเป็นเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri* ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อราที่แพร่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในเขตอบอุ่นและเขตร้อน (Hong et al., 2013; Futagami, 2022) ถิ่นอาศัยตามธรรมชาติของเชื้อราในกลุ่มนี้มักพบในดิน วัตถุอินทรีย์ที่กำลังย่อยสลาย เช่น ซากพืช เมล็ดพืช และอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง รวมถึงในผลิตภัณฑ์เกษตรที่เก็บเกี่ยวแล้ว เช่น ข้าวโพด ข้าว ข้าวสาลี และมันสำปะหลัง (Hong et al., 2013) สำหรับ *A. luchuensis* โดยเฉพาะ มีการรายงานการแยกเชื้อครั้งแรกจากสภาพแวดล้อมในภูมิภาคริวกิว ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งต่อมาได้พัฒนาเป็นจุลินทรีย์หลักที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักท้องถิ่น โดยเฉพาะการผลิตสุราอาวาโม

ริ (*awamori*) และโชจู (*shochu*) (Yamada et al., 2016) จากนั้นมีการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าเชื้อนี้สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีคาร์โบไฮเดรตและสารอินทรีย์เข้มข้น เช่น ข้าวและมันเทศ ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในกระบวนการหมัก (Kadooka et al., 2020)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. luchuensis* ได้แก่ บริเวณที่มีอุณหภูมิสูงและความชื้นเพียงพอ เชื้อสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30–40 °C และยังทนทานต่อสภาพที่มีกรดอินทรีย์สะสมสูง เช่น กรดซิตริก ซึ่งเป็นผลผลิตหลักของเชื้อนี้ (Futagami, 2022) คุณสมบัตินี้ช่วยให้เชื้อสามารถดำรงอยู่และแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้ว่าจะมีการพบ *A. luchuensis* ในแหล่งธรรมชาติ แต่ถิ่นอาศัยที่สำคัญที่สุดของเชื้อนี้ในปัจจุบันคือโรงงานหมักและโรงผลิตอาหารหมักดั้งเดิม โดยสายพันธุ์ที่ใช้อย่างต่อเนื่องในอุตสาหกรรมมีการคัดเลือกและปรับปรุงเพื่อให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการหมักมากที่สุด ทั้งในด้านการผลิตเอโนไซม์ การผลิตกรดซิตริก และความปลอดภัยจากการสร้างสารพิษ (Hong et al., 2013; Yamada et al., 2016) จึงอาจกล่าวได้ว่า *A. luchuensis* มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมการหมักของมนุษย์ (human-made habitat) อย่างชัดเจน

2.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. luchuensis*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. luchuensis* มีความคล้ายคลึงกับ *A. niger* และ *A. tubingensis* ในกลุ่ม *Aspergillus section nigri* ทำให้ยากต่อการจำแนกด้วยสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว (Hong et al., 2013) ลักษณะที่สำคัญของ *A. luchuensis* (อ้างอิงจากสายพันธุ์ต้นแบบ NBRC 4281) ประกอบด้วยหัวโคนเดี่ยวที่มีลักษณะแผ่กระจาย (radiate) โดยในระยะแรกหัวโคนเดี่ยวมักจะเป็นแบบแถวเดี่ยว (uniseriate) ซึ่งมักพบในการเพาะเลี้ยงบนข้าวสาลีในระยะเริ่มต้น และในระยะต่อมาจะเป็นแบบสองแถว (predominantly biseriate) (Hong et al., 2013; Osamu Yamada et al., 2016) ก้านโคนเดี่ยวยาวได้ถึง 1.5 มม. กว้าง 10–13 ไมโครเมตร มีผนังหนาเรียบและเป็นเนื้อเดียวกัน (hyaline) ส่วนเวสิเคิลมีลักษณะเกือบเป็นทรงกลม ขนาด 20–40 ไมโครเมตร เมทูลาคลุ่มพื้นผิวเกือบทั้งหมดของเวสิเคิล ขนาด 17.0–26.1 × 4.5–8.1 ไมโครเมตร ฟิลาไลด์มีลักษณะเป็นแอมพูลิฟอร์ม (ampulliform) ขนาด 5.6–8.4 × 3.5–4.9 ไมโครเมตร โคนินเดี่ยวมีลักษณะกลม (globose) ขนาด 3.5–4.5 ไมโครเมตร ผิวเรียบ (หรือหยาบเล็กน้อย) และมีสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ ส่วนสีของโคโลนีสามารถแปรผันได้ตั้งแต่สีขาวถึงสีเทา หรือสีน้ำตาลถึงสีดำ (Futagami, 2022; Hong et al., 2013) สำหรับ *A. luchuensis* mut. *kawachii* (โคจิขาว) ซึ่งเป็นอัลไบโนมิวแทนต์นั้น จะมีโคนินเดี่ยวสีน้ำตาลอ่อน (fawn) ไม่ใช่สีขาว โดยลักษณะอัลไบโนนี้เกิดจากการกลายพันธุ์แบบเฟรมชิพต์

(frameshift mutation) ในยีน *pkpP* ซึ่งเข้ารหัสเอนไซม์ polyketide synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ *dihydroxynaphthalene-melanin* ซึ่งเป็นเม็ดสีที่สร้างสีเข้ม (Futagami, 2022)

2.9 การประยุกต์ใช้เชื้อรา *Aspergillus luchuensis* ในอุตสาหกรรม

เชื้อรา *A. luchuensis* เป็นเชื้อราที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมักของเอเชียตะวันออก โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่น จีน และเกาหลี เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ช่วยปรับปรุงกระบวนการผลิตอาหารและเครื่องดื่มให้มีคุณภาพสูงและปลอดภัย เช่น การผลิตเหล้ากลั่นญี่ปุ่น (โชจู และอาวาโมริ) เชื้อรา *A. luchuensis* และสายพันธุ์อัลไบโนมิวแทนต์ *A. luchuensis* mut. *kawachii* (หรือโคจิขาว) เป็นเชื้อราโคจิหลักที่ใช้ในการผลิตเหล้ากลั่นโชจูและอาวาโมริ ซึ่งเชื้อราเหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการย่อยสลายแป้งและการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล (saccharification) ของวัตถุดิบ เช่น ข้าว ข้าวบาร์เลย์ และมันหวาน ให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นอาหารของยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) สำหรับการผลิตเอทานอล (Kadooka et al., 2020; Yamada et al., 2016) เอนไซม์อะไมโลไลติกที่สำคัญ ได้แก่ อัลฟา-อะไมเลสที่เสถียรต่อกรด (acid-stable α -amylase หรือ AsaA) และกลูโคอะไมเลส (glucoamylase หรือ GlaA) สามารถทำงานได้ดีแม้ในสภาวะ pH ต่ำ (ใกล้ 3) ซึ่งเหมาะสมกับการบ่มโชจูและอาวาโมริ (Futagami, 2022) จากนั้น การใช้โคจิขาว (*A. kawachii*) ช่วยให้เหล้ากลั่นมีสีอ่อนและกลิ่นรสที่นุ่มนวลยิ่งขึ้น เนื่องจากสายพันธุ์นี้สร้างเม็ดสีเข้มในระดับต่ำและลดการเกิดสารไม่พึงประสงค์ (Yamada et al., 2016)

ในด้านการผลิตกรดซิตริกเชื้อรา *A. luchuensis* ความสามารถในการผลิตกรดซิตริกในปริมาณสูง ซึ่งมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมหมักในพื้นที่เขตอบอุ่น การผลิตกรดซิตริกช่วยลดค่า pH ของวัตถุดิบหมัก จึงยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ และทำให้กระบวนการหมักมีเสถียรภาพ (Kadooka et al., 2020; Futagami, 2022) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์อื่นๆ ได้ นอกจากเอนไซม์อะไมโลไลติกแล้ว *A. luchuensis* mut. *kawachii* ยังสามารถสร้างเอนไซม์อื่นๆ ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ได้แก่ Xylanases เช่น XynC ซึ่งเสถียรต่อกรด ใช้ย่อยสลายสารโพลีแซ็กคาไรด์ในวัตถุดิบพืช และ β -Glucosidase (BglA) มีบทบาทในการสร้างแอลกอฮอล์โมโนเทอร์ปีน เช่น ลินาลูล (linalool) และเจอราเนียม (geraniol) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของกลิ่นรสในโชจูมันหวาน (Futagami, 2022) การผลิตเอนไซม์เหล่านี้ช่วยให้ได้รสชาติและกลิ่นที่ซับซ้อนในผลิตภัณฑ์หมัก เพิ่มมูลค่าเชิงอุตสาหกรรมและความหลากหลายของรสชาติ ในด้านความปลอดภัยทางอาหาร *A. luchuensis* เป็นเชื้อราที่ปลอดภัยต่อการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม สายพันธุ์นี้ไม่มีความสามารถในการผลิตไมโคท็อกซิน เช่น Ochratoxin A (OTA) และ Fumonisin B ซึ่งแตกต่างจาก *A. niger* บางสายพันธุ์ (Yamada et al., 2016; Futagami, 2022) ซึ่งความปลอดภัย

ของเชื้อราเหล่านี้ทำให้สามารถใช้ในกระบวนการหมักอาหาร เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์เอนไซม์ได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อผู้บริโภค

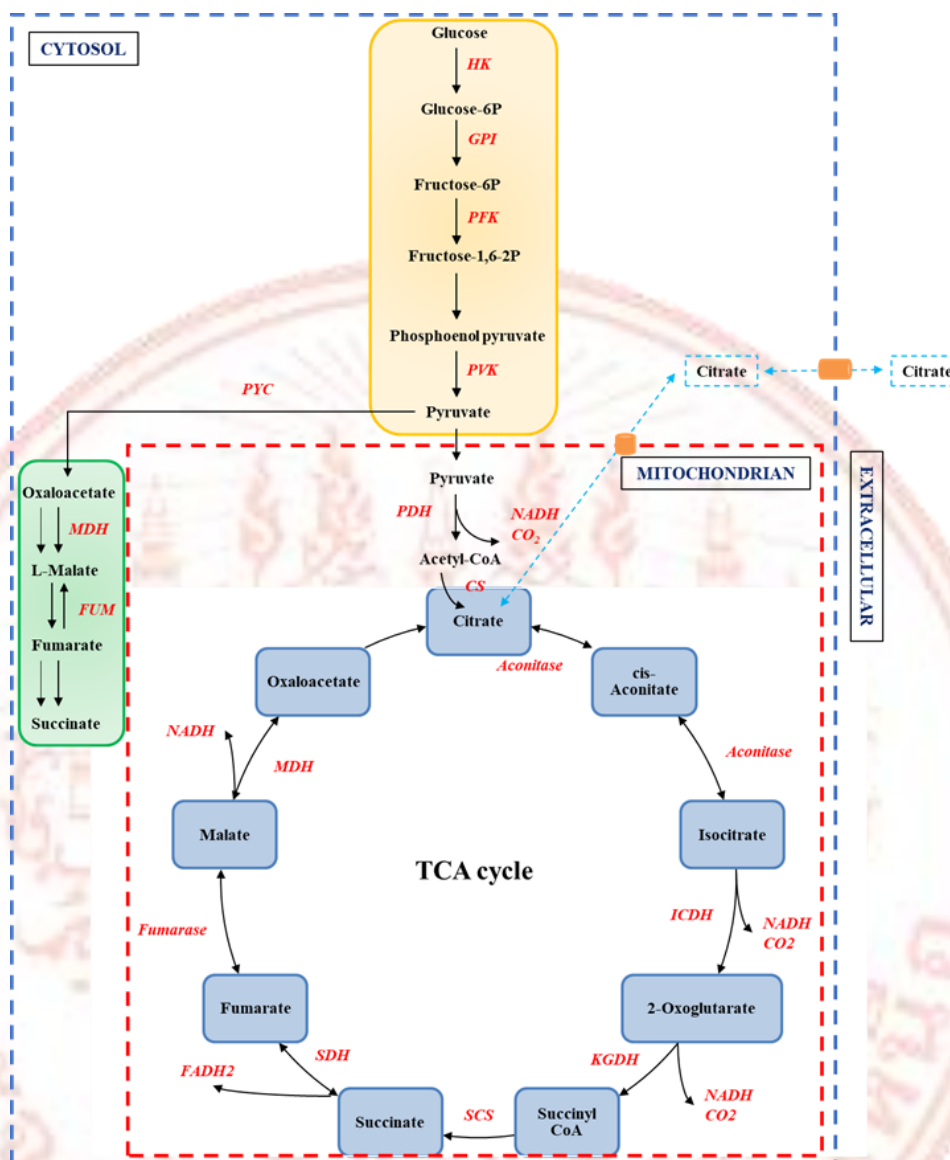
2.10 ชีวเคมีของการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อรา

เพื่ออธิบายความสามารถในการสะสมกรดซิตริกของ *A. niger* แต่หลายแง่มุมของกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมียังคงไม่สามารถอธิบายได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่มุ่งเน้นด้านเส้นทางเมแทบอลิซึมและคุณสมบัติของเอนไซม์ในเชื้อราชนิดนี้ ทำให้ *A. niger* กลายเป็นหนึ่งในเชื้อราชั้นนำที่ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลาย (Karaffa & Kubicek, 2003) ความสามารถของสายพันธุ์บางชนิดของ *A. niger* ในการสังเคราะห์กรดซิตริกนั้นกำหนดโดยพันธุกรรม โดยสามารถเพิ่มผลผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่ออยู่ภายใต้เงื่อนไขการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมและมีการควบคุมกระบวนการที่ดี (Papagianni, 2007) ในระยะโทโฟเฟส (trophophase) ซึ่งเป็นระยะการเจริญของเส้นใยเชื้อรา คาร์โบไฮเดรตจำพวกเฮกโซสจะดูดซึมเข้าสู่เซลล์ และผ่านเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) และเส้นทางพอนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) อย่างไรก็ตาม การมีส่วนร่วมของเส้นทางพอนโตสฟอสเฟตในการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตจะลดลงอย่างมากในช่วงระยะอิดิโอฟเฟส (idiophase) ซึ่งเป็นช่วงที่เริ่มมีการสะสมกรดซิตริก (Legiša & Matthey, 2007) ความสามารถของสายพันธุ์บางชนิดของ *A. niger* ในการสังเคราะห์กรดซิตริกนั้นกำหนดโดยพันธุกรรม โดยสามารถเพิ่มผลผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่ออยู่ภายใต้เงื่อนไขการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมและมีการควบคุมกระบวนการที่ดี (Papagianni, 2007) ในระยะโทโฟเฟส (trophophase) ซึ่งเป็นระยะการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา คาร์โบไฮเดรตประเภทเฮกโซส เช่น กลูโคส จะดูดซึมเข้าสู่เซลล์ และผ่านกระบวนการ ไกลโคไลซิส (glycolysis) และ เส้นทางพอนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) เพื่อผลิตพลังงานและตัวกลางเมแทบอลิซึม อย่างไรก็ตาม ในช่วงระยะอิดิโอฟเฟส (idiophase) ซึ่งเป็นช่วงที่เริ่มมีการสะสมกรดซิตริก การมีส่วนร่วมของเส้นทางพอนโตสฟอสเฟตจะลดลงอย่างมาก (Legiša & Matthey, 2007)

กลูโคสที่เข้าสู่เซลล์จะฟอสโฟรีเลตเป็น กลูโคส-6-ฟอสเฟต ผ่านการทำงานของเอนไซม์ เฮกโซไคเนส (hexokinase) และ กลูโคไคเนส (glucokinase) โดยเฮกโซไคเนสสามารถเร่งการถ่ายหมู่ฟอสเฟตจาก ATP ไปยังกลูโคสและฟรุกโตส ขณะที่กลูโคไคเนสมีความจำเพาะต่อกลูโคสสูง (Sándor et al., 2001) อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของเฮกโซไคเนสถูกยับยั้งอย่างมากโดยสาร trehalose-6-phosphate ซึ่งพบว่าการปิดกั้นยีน *tpsA* ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ trehalose-6-phosphate synthase สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริกได้ (Arisan-Atac et al., 1996; West, 2023) หลังจากกลูโคส-6-ฟอสเฟตสร้างขึ้น มันจะเข้าสู่เส้นทางไกลโคไลซิสและแปร

สภาพเป็น ฟอสโฟเอนอลไพรูเวต (phosphoenolpyruvate, PEP) และต่อมาเป็น อะเซทิลโคเอนไซม์เอ (acetyl-CoA) ซึ่งเข้าสู่ วงจรกรดซิตริก (TCA cycle) ภายใต้ออกซิเจนเพียงพอ ในสภาวะการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม วงจร TCA จะปรับสภาพโดยเอนไซม์สำคัญหลายชนิด เช่น ซิเทรตซินเทส (citrate synthase) และ อะโคนเนส (aconitase) ซึ่งทำให้เกิดการสะสมของซิเทรตในไซโตพลาสซึม แทนที่จะเผาผลาญต่อไปในวงจร TCA ปัจจัยที่สำคัญในการสะสมกรดซิตริก ได้แก่ การจำกัดไนโตรเจน การควบคุม pH ต่ำ และการมีไอออนโลหะ เช่น เหล็กและแมกนีเซียมในระดับต่ำ ซึ่งส่งผลต่อเอนไซม์บางชนิดและยับยั้งการเปลี่ยนแปลงซิเทรตเป็นสารเมแทบอลิซึมอื่น (Papagianni, 2007)

การผลิตกรดซิตริกยังเกี่ยวข้องกับ การขนส่งและการคายน้ำของซิเทรตออกจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโตพลาสซึม ซึ่งเกิดจากการทำงานของโปรตีนขนส่งเฉพาะ (citrate transporter) การสะสมซิเทรตในไซโตพลาสซึมจะเพิ่มความเข้มข้นของกรดซิตริกในเซลล์ และเนื่องจากสภาวะที่มี pH ต่ำ การแพร่ของกรดซิตริกออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อจึงเกิดขึ้นง่าย ส่งผลให้การผลิตกรดซิตริกต่อเนื่องมีประสิทธิภาพสูง การควบคุมปัจจัยสิ่งแวดล้อมและสารอาหารอย่างเหมาะสม เช่น การควบคุมคาร์บอนไนโตรเจน การจัดสมดุลแร่ธาตุ การเติมสารอาหารเสริม และการควบคุมอากาศ (aeration) ทำให้สามารถปรับสมดุลระหว่าง ระยะการเจริญ (growth phase) และ ระยะสะสมกรดซิตริก (production phase) ได้อย่างเหมาะสม ส่งผลให้เกิดผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดและลดการสร้างของเสียเมแทบอลิซึมอื่น ๆ เช่น แอสพาเทตหรือกลูตาเมต ด้วยเหตุนี้ การศึกษากลไกชีวเคมีของ *A. niger* ไม่เพียงช่วยให้เข้าใจการสะสมกรดซิตริกในระดับเซลล์และเอนไซม์เท่านั้น แต่ยังเป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับการปรับปรุงกระบวนการหมักเชิงอุตสาหกรรม การออกแบบสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง และการพัฒนากระบวนการผลิตเชิงชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมต่อไป (Karaffa & Kubicek, 2003; Papagianni, 2007; Legiša & Matthey, 2007)



ภาพที่ 6 ภาพรวมของเมตาบอลิซึมที่นำไปสู่การผลิตกรดซิตริกใน *A. niger*

กลูโคส-6-ฟอสเฟตจะแปรสภาพเป็นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต โดยมีเอนไซม์ phosphoglucose isomerase เป็นตัวเร่ง จากนั้นเอนไซม์ phosphofructokinase จะเร่งปฏิกิริยาการฟอสโฟรีเลตฟรุกโตส-6-ฟอสเฟตให้เป็นฟรุกโตส-1,6-บิสฟอสเฟต ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการไกลโคไลซิส (Berg et al., 2002) การทำงานของ phosphofructokinase จะยับยั้งโดยความเข้มข้นของ ATP สูง และยังได้รับอิทธิพลจากโลหะบางชนิด เช่น Mn^{2+} , citrate และ phosphoenolpyruvate ในทางตรงกันข้าม NH_4^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} และ AMP จะส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์นี้ (Karaffa & Kubicek, 2003); Yang, et al., 2017) ในขั้นตอนต่อมา 3-phosphoglyceraldehyde จะเปลี่ยนเป็น 1,3-bisphosphoglycerate ผ่านกระบวนการออกซิเดชันที่มี NAD^+ เป็นผู้รับอิเล็กตรอน

โดยเอนไซม์ 3-phosphoglycerate dehydrogenase จากนั้น phosphoglycerate kinase จะเร่งการสร้าง ATP และ 3-phosphoglycerate และขั้นสุดท้าย pyruvate kinase จะเร่งการแปรสภาพของ 3-phosphoglycerate เป็น pyruvate พร้อมกับการผลิต ATP (Yang et al., 2017)(Cordes, et al., 2015)

การเปลี่ยนไพรูเวตและการเข้าสู่วงจรกรดซิตริก ไพรูเวตที่ได้จากไกลโคไลซิสจะถูกเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA และ oxaloacetate โดย oxaloacetate เกิดจากปฏิกิริยา carboxylation ที่เร่งด้วย pyruvate carboxylase และใช้ CO₂ ที่ได้จากการสร้าง acetyl-CoA (Papagianni, 2007) หลังจากนั้น acetyl-CoA จะเข้าสู่ไมโทคอนเดรียและผ่านกระบวนการ oxidative decarboxylation ที่เร่งโดย pyruvate dehydrogenase เพื่อเริ่มต้นวงจรกรดซิตริก โดยเริ่มจากการควบแน่นของ oxaloacetate, acetyl-CoA และน้ำ เพื่อสร้าง citrate ผ่านเอนไซม์ citrate synthase จากนั้น citrate จะแปรสภาพเป็น isocitrate โดย aconitase (Akram, 2014; Behera, 2020; Torres & Voit, 2002) การสะสมกรดซิตริกในวงจรกรดซิตริกนั้น อาจเกิดจากการยับยั้งเอนไซม์ aconitase, isocitrate dehydrogenase-NADP และ α -ketoglutarate dehydrogenase ทั้งจากปัจจัยภายนอก เช่น pH, โลหะหนัก (เช่น Cu²⁺) และจากปัจจัยภายใน เช่น glycerol และ citrate (Karaffa & Kubicek, 2003)(Sándor, et al., 2001) การสะสมกรดซิตริกยังมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของตัวขนส่งไตรคาร์บอกซิเลต (tricarboxylate transporter) ที่มีความสามารถในการจับ citrate ได้ดีกว่า aconitase ส่งผลให้ citrate ปลอยออกจากไมโทคอนเดรียโดยไม่ยับยั้งวงจร Krebs การขนส่งนี้เกิดขึ้นผ่านกลไกแลกเปลี่ยนกับ malate ที่อยู่ในไซโทซอล ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ malate มักเกิดขึ้นก่อนการสะสมของ citrate จึงเชื่อว่า malate อาจมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสะสมกรดซิตริก (Karaffa & Kubicek, 2003)

2.11 การหมักเพื่อผลิตกรดซิตริก

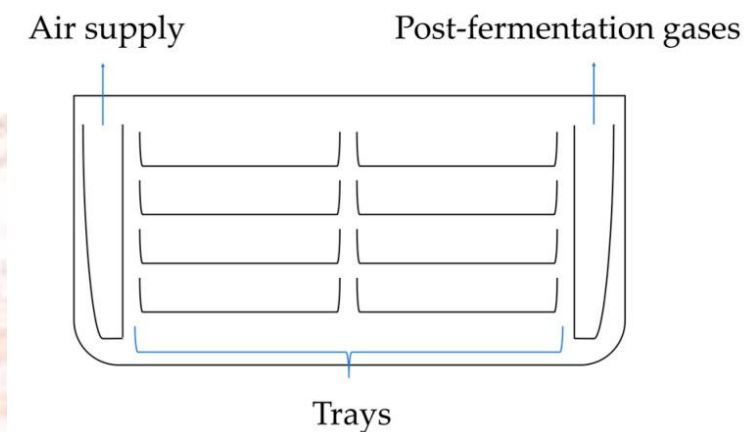
การผลิตกรดซิตริกโดยกระบวนการหมักนับเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายว่าเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพและคุ้มค่าที่สุด ปัจจุบันมากกว่า 90% ของกรดซิตริกที่ผลิตและใช้ทั่วโลก ได้มาจากการบวนการหมัก (Soccol et al., 2006) เทคนิคนี้มีข้อดีหลายประการ ได้แก่ ความง่ายและเสถียรในการดำเนินการ ความต้องการระบบควบคุมที่ไม่ซับซ้อน ใช้ทักษะทางเทคนิคต่ำ ใช้พลังงานน้อย และมีความไวต่อปัญหาทางไฟฟ้าน้อยกว่ากระบวนการทางเคมี โดยทั่วไป กระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดซิตริกประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การเตรียมและการเพาะเชื้อ (Inoculum Preparation) การหมัก (Fermentation) และการแยกและเก็บเกี่ยวกรดซิตริกจากระบบหมัก

(Product Recovery) การผลิตกรดซิตริกโดยกระบวนการหมักได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยในช่วงต้นคริสต์ศตวรรษที่ 20 การผลิตยังคงจำกัดอยู่ที่การใช้เชื้อราในสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ผ่านการเพาะเลี้ยงแบบนิ่งหรือการหมักบนผิวหน้า (surface culture) (Soccol et al., 2006) ต่อมาในปี ค.ศ. 1940 Shu และ Johnson ได้พัฒนาระบบหมักในสถานะของเหลวโดยใช้ *A. niger* เป็นจุลินทรีย์หลัก ซึ่งเป็นรากฐานของเทคโนโลยีการหมักในของเหลวที่ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน (Shu & Johnson, 1948) เครื่องหมักหลายชนิดได้รับการนำมาใช้ในการผลิตกรดซิตริก เช่น ถาดหมัก (tray fermenters) ตู้ปัมเชื้อ ขวดเออร์เลนเมเยอร์ (Erlenmeyer flasks) ไบโอรี่แอกเตอร์ แบบถังหมุนและถังแนวนอน (rotating and horizontal drum bioreactors) รวมถึงไบโอรี่แอกเตอร์แบบถังบรรจุเดี่ยวและหลายชั้น (single- and multi-layer packed bed bioreactors)

การผลิตกรดซิตริกในเชิงพาณิชย์มีหลายวิธี ได้แก่ การสกัดจากผลไม้ การสังเคราะห์ทางเคมี และการผลิตโดยการหมัก แต่ในปัจจุบันเกือบ 90 เปอร์เซ็นต์ ของกรดซิตริกที่ใช้ในอุตสาหกรรมโลก มาจากการหมักจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา *A. niger* ซึ่งให้ผลผลิตสูง สามารถหมักอาหารเลี้ยงเชื้อคาร์โบไฮเดรตได้หลากหลาย เช่น อากน้ำตาล แป้งข้าวโพด หรือของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร การหมักกรดซิตริกเป็นกระบวนการชีวภาพซับซ้อนที่ต้องควบคุมเงื่อนไขการหมักอย่างเข้มงวด ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต ได้แก่ ประเภทและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชีตจำกัดของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส การใช้แอลกอฮอล์ต่ำ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ธาตุต่าง ๆ การระบายอากาศ ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อรา และความเข้มข้นของธาตุอาหารรอง เช่น แมงกานีสและทองแดง เชื้อรา *A. niger* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตกรดซิตริกเชิงพาณิชย์ เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตสูง หมักวัสดุราคาถูกได้ง่าย และสามารถปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตผ่านการกลายพันธุ์โดยรังสีหรือสารเคมี เช่น รังสียูวี รังสีแกมมา เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) และไดเอทิลซัลโฟเนต กระบวนการหมักกรดซิตริกมักทำในลักษณะหมักในอาหารเหลว โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในภาชนะปริมาตรเล็ก เช่น ขวดหมักขนาด 250 มิลลิลิตร สัดส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร และเชื้อสปอร์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเขย่าในตู้ปัมเชื้อแบบเขย่า 150 รอบต่อนาที การปรับค่าพารามิเตอร์ เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นของน้ำตาล ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต และการเติมโพแทสเซียมเพอร์ไอโซยาไนต์ช่วยให้ได้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด

2.11.1 การหมักบนพื้นผิว (Surface Fermentation)

การหมักบนพื้นผิว หรือที่รู้จักกันในชื่อ "การเพาะเลี้ยงของเหลวบนพื้นผิว" เป็นเทคนิคการผลิตกรดซิตริกในอุตสาหกรรมที่ใช้ในอดีต แม้ว่าในช่วงหลังๆ การหมักแบบในอาหารเหลวจะได้รับความนิยมมากขึ้น วิธีนี้ยังคงใช้ในอุตสาหกรรมขนาดเล็กและขนาดกลางเนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่



ภาพที่ 7 แผนภาพของการเพาะเลี้ยงเชื้อบนพื้นผิวของเหลว(Ksiażek, 2023)

เรียบง่ายและต้นทุนการผลิตต่ำ (Bauweleers, et al., 2014), (Pietkiewicz, 2015)ในการหมักแบบผิว (surface fermentation) เชื้อราของ *A. niger* จะเจริญเติบโตบนพื้นผิวของวัสดุเพาะเลี้ยงและสร้างชั้นไมซีเลียมที่หนา กระบวนการนี้เกิดขึ้นในห้องหมักที่ทำจากสแตนเลสคุณภาพสูง อะลูมิเนียมหรือถาดโพลีเอธิลีน (ภาพที่ 7) ระบบหมักเหล่านี้มีระบบการระบายอากาศที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น โดยอากาศที่ส่งเข้าไปในห้องหมักจะกรองด้วยตัวกรองจุลชีววิทยาเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อ *Penicillium*, สายพันธุ์อื่นของ *A. niger*, หรือแบคทีเรียกรดแลคติก (Max, et al., 2010; Papagianni, et al., 1999)

การหมักบนพื้นผิว (Surface Adhesion Fermentation, SAF) เป็นกระบวนการหมักรูปแบบใหม่ซึ่งรวมคุณสมบัติของการหมักในสภาพของแข็ง (Solid State Fermentation, SSF) และการหมักในรูปแบบไบโอฟิล์ม (Biofilm Fermentation, BF) เข้าด้วยกัน โดยพื้นฐานแล้ว SAF เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่เน้น การยึดเกาะของเซลล์จุลินทรีย์กับพื้นผิวของวัตถุติดหรือสารรองรับ ไม่ใช่เพียงเพราะปริมาณน้ำต่ำตามที่เคยเข้าใจกันในอดีต (Gutiérrez-Correa & Villena, 2003)

SSF เป็นกระบวนการที่ใช้กันมาช้านานในการผลิตอาหารหมัก อาหารสัตว์เชิงพาณิชย์ เชื้อเพลิง เอนไซม์ และผลิตภัณฑ์เภสัชกรรม โดยอาศัยการเจริญของจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งขึ้นโดยปราศจากน้ำไหลอิสระ กระบวนการ SSF มีข้อดีหลายประการเมื่อ

เทียบกับการหมักในของเหลว (Submerged Fermentation, SF) ได้แก่ การปรับปรุงคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ เพิ่มผลผลิตและความสามารถในการผลิตต่อหน่วยปริมาตร รวมถึงการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่ง่ายขึ้นและการใช้พลังงานต่ำกว่า นอกจากนี้ การใช้ SSF แบบเชื้อหลายสายพันธุ์ (mixed culture) สำหรับการผลิตเอนไซม์ยังให้ผลผลิตสูงกว่าแบบเชื้อสายพันธุ์เดียว (single culture) ซึ่งเกิดจากการเสริมฤทธิ์กันของเอนไซม์และการใช้สารอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Castillo et al., 1994; Dueñas et al., 1995; Gutiérrez-Correa & Tenengerdy, 1997, 1998, 1999) SSF สามารถแบ่งได้ตามชนิดของวัสดุรองรับเป็นสองประเภทหลัก ประการแรกคือ การใช้ วัสดุแข็งตามธรรมชาติ เช่น เศษแป้ง เซลลูโลส หรือวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง ข้าว ถั่ว และกากน้ำตาล ซึ่งในกรณีนี้ วัสดุแข็งทำหน้าที่เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและสารอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ (Ningam & Singh, 1996; Tenengerdy & Szakacs, 2003) ประการที่สองคือ การใช้ วัสดุรองรับเฉื่อยทั้งจากธรรมชาติหรือสังเคราะห์ เช่น กากอ้อย (sugarcane bagasse) เพอร์ไลต์ (perlite) โพลียูรีเทนโฟม ซึ่งในกรณีนี้ วัสดุทำหน้าที่เพียงเป็นโครงสร้างให้จุลินทรีย์เกาะและเจริญ การใช้วัสดุเฉื่อยช่วยให้สามารถควบคุมการถ่ายเทความร้อนและมวลได้ดีขึ้นเนื่องจากโครงสร้างและสมบัติทางกายภาพของวัสดุไม่เปลี่ยนแปลงตามการเจริญของจุลินทรีย์ (Ooijkaas et al., 2000) แม้ว่าการผลิตเอนไซม์โดย SSF จะยังไม่แพร่หลายในอุตสาหกรรมหลักเนื่องจากข้อจำกัดด้านการออกแบบเครื่องหมัก (bioreactor) แต่ข้อดีของวิธีนี้ทั้งในด้านการผลิตและผลผลิตสูงกว่า SF เป็นที่ทราบดี รูปแบบการเจริญของเชื้อราบนวัสดุแข็งสามารถสรุปเป็นสองระยะคือ ระยะเริ่มต้น (germination) ซึ่งสปอร์งอกเป็นท่อเชื้อราและขยายตัวไปทั่วพื้นผิว และระยะเพิ่มความหนาแน่นของเส้นใยเชื้อรา (mycelial density) ซึ่งเกิดการพัฒนากล้ามเนื้อเส้นใยทั้งในแนวตั้งและแนวทะลุวัสดุรองรับ (Mitchell, 1992) อย่างไรก็ตาม ก่อนหน้านี้นักวิจัยมักมองข้าม ระยะการยึดเกาะของสปอร์กับพื้นผิว ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้เกิดการหมักบนพื้นผิวอย่างมีประสิทธิภาพ

ในส่วนของการหมักไบโอฟิล์ม (Biofilm Fermentation, BF) แนวคิดของไบโอฟิล์มหมายถึงชุมชนของจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่บนพื้นผิวไม่ว่าจะเป็นพื้นผิวชีวภาพหรือไม่ใช่ชีวภาพ ซึ่งสามารถเกิดจากเชื้อเดียวหรือหลายชนิดร่วมกัน (David & O'Toole, 2000; Fenchel, 2002) การเจริญบนพื้นผิวทำให้เชื้อราเกิดพฤติกรรมทางสรีรวิทยาแตกต่างจากการหมักในของเหลว เช่น การผลิตเอนไซม์สูงขึ้น การสร้างรูปร่างและโครงสร้างทางสรีรวิทยาที่แตกต่าง ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของจุลินทรีย์ในไบโอฟิล์ม (Akao et al., 2002; Biesebeke et al., 2002) ทั้ง SSF และ BF จึงสามารถพิจารณาเป็นรูปแบบการหมักบนพื้นผิว (Surface Adhesion Fermentation, SAF) ซึ่งเน้นการยึดเกาะของจุลินทรีย์เป็นปัจจัยหลักในการผลิต การยึดเกาะนี้ทำให้จุลินทรีย์เจริญบนวัสดุรองรับได้อย่างมั่นคงและเมื่อเจริญเต็มที่ จะเกิดการสร้างฟิล์มจุลินทรีย์ (biofilm) ทำให้การผลิตเอนไซม์หรือเมแทบอไลต์

สูงขึ้น ตัวอย่างเช่น ไบโอฟิล์มของ *Aspergillus niger* บนผ้าโพลีเอสเตอร์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าการหมักในของเหลว 140% และการใช้ไบโอฟิล์มแบบเชื้อหลายสายพันธุ์ร่วมกับ *Trichoderma reesei* ทำให้ผลผลิตเซลลูเลสเพิ่มขึ้นกว่า 70% เมื่อเทียบกับไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดียว (Villena et al., 2001) ดังนั้น การหมักบนพื้นผิว (Surface Fermentation) ไม่เพียงแต่ให้ผลผลิตสูงและมีประสิทธิภาพ แต่ยังสะท้อนถึงการใช้ประโยชน์จาก พฏิกิริยาทางชีววิทยาและสรีรวิทยาของเชื้อรา ที่แตกต่างจากการหมักในของเหลวอย่างชัดเจน ซึ่ง SAF จึงถือเป็นหมวดหมู่ใหม่ของกระบวนการหมักที่สามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เอนไซม์ สารชีวภาพ และการบำบัดสิ่งปฏิกูลได้ (Gutiérrez-Correa & Villena, 2003; Villena et al., 2001)

การหมักบนพื้นผิว หรือที่เรียกว่า *Surface Fermentation* เป็นเทคนิคการผลิตกรดซิตริกในอุตสาหกรรมที่มีประวัติการใช้งานมายาวนาน ก่อนหน้านั้นถือเป็นวิธีหลักในการผลิตกรดซิตริกเชิงพาณิชย์ แม้ว่าการหมักแบบจุ่ม (Submerged Fermentation) จะเข้ามาแทนที่และได้รับความนิยมสูงในปัจจุบัน แต่เทคนิคการหมักบนพื้นผิวยังคงนำมาใช้ในโรงงานขนาดเล็กและขนาดกลาง เนื่องจากความเรียบง่ายและต้นทุนการลงทุนที่ต่ำ หลักการของการหมักบนพื้นผิวคือการให้เชื้อรา *Aspergillus niger* เจริญเติบโตบนชั้นบาง ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพาะเลี้ยงของเหลว ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื่อนี้มักมีความเข้มข้นของคาร์บอนสูง เช่น น้ำตาลซูโครสหรือโมลาสเชื่อมโยงกับแหล่งไนโตรเจนจำกัด การควบคุมความหนาของชั้นของเหลวและพื้นที่ผิวสัมผัสกับอากาศเป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากการเข้าถึงออกซิเจนมีผลโดยตรงต่ออัตราการเจริญของเชื้อราและผลผลิตกรดซิตริก วิธีนี้ใช้ประโยชน์จากการเจริญของไฮฟาของเชื้อราที่กระจายตัวเป็นเส้นใยบาง ๆ บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งช่วยให้เกิดการผลิตกรดซิตริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ข้อดีของการหมักบนพื้นผิวคือการควบคุมง่าย ไม่ต้องใช้ระบบอากาศหรือเครื่องเขย่าแบบซับซ้อน สามารถผลิตได้ด้วยอุปกรณ์พื้นฐาน เช่น ถาดหรือภาชนะดิน ๆ ซึ่งเหมาะสำหรับการผลิตเชิงอุตสาหกรรมขนาดเล็กถึงกลาง อีกทั้งยังสามารถใช้วัตถุดิบที่หลากหลายและมีต้นทุนต่ำ เช่น น้ำตาลจากอ้อยหรือของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร การหมักบนพื้นผิวยังทำให้การเก็บเกี่ยวกรดซิตริกทำได้ง่าย เนื่องจากผลผลิตสะสมอยู่บนชั้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถแยกกรดซิตริกออกจากเชื้อราและของแข็งอื่น ๆ ได้โดยตรง การหมักบนพื้นผิวมีข้อจำกัดหลายประการ เมื่อเทียบกับการหมักแบบจุ่ม ปริมาณผลผลิตต่อหน่วยปริมาตรมักต่ำกว่า เนื่องจากพื้นที่ผิวจำกัด การกระจายออกซิเจนไม่ทั่วถึง และการควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิและ pH ทำได้ยาก นอกจากนี้ การหมักบนพื้นผิวมักใช้เวลานานกว่าการหมักจุ่มหลายวันจนถึงหลายสัปดาห์ ทำให้ความสามารถในการผลิตต่อหน่วยเวลา (อัตราการผลิต :Productivity) ต่ำกว่าการหมักในระบบจุ่ม แม้จะมีข้อจำกัด แต่การหมักบนพื้นผิวยังมีประโยชน์ในกรณีที่ต้องการเทคโนโลยีง่าย ต้นทุนต่ำ และสามารถใช้อัตราการผลิตที่ทำได้ในท้องถิ่น โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนาที่อุตสาหกรรมขนาดเล็กหรือ

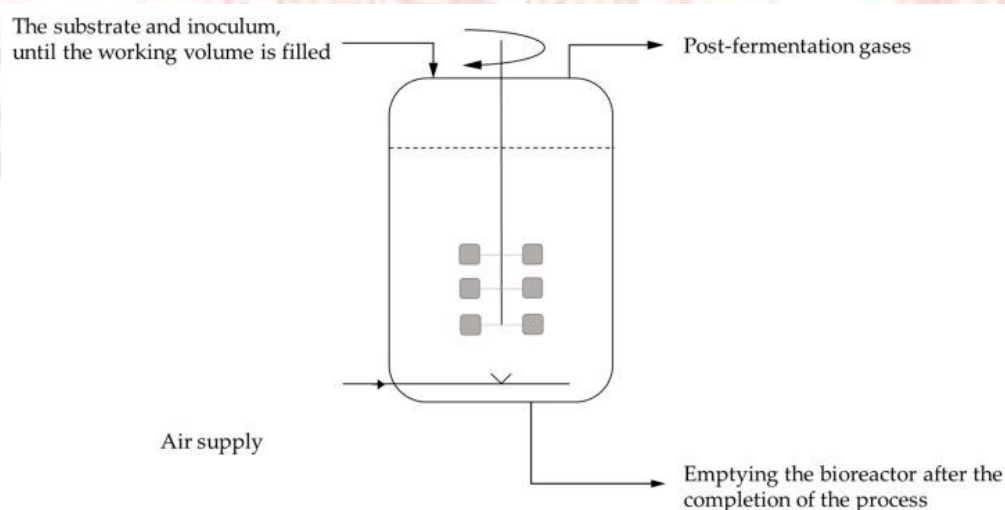
ชุมชนเกษตรต้องการผลิตกรดซิตริกเพื่อใช้เองหรือจำหน่ายในตลาดท้องถิ่น การปรับปรุงเทคนิค เช่น การเพิ่มการระบายอากาศ การปรับความหนาของชั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่เหมาะสม สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตและลดเวลาการหมักได้ ดังนั้น การหมักบนพื้นผิวจึงยังคงเป็นเทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซิตริกในบริบทของอุตสาหกรรมขนาดเล็กและขนาดกลาง แม้ว่าจะไม่ได้แข่งขันในด้านปริมาณผลผลิตเชิงอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ แต่ก็ยังมีบทบาทสำคัญในการสนับสนุนการผลิตกรดซิตริกแบบยั่งยืนและใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า

การเพาะเลี้ยงแบบผิวเกิดความร้อนสูง ซึ่งต้องการอัตราการระบายอากาศที่สูงเพื่อรักษาอุณหภูมิที่เหมาะสม กระบวนการนี้เกิดความร้อนจำนวนมากในระหว่างการหมัก ซึ่งสามารถควบคุมได้โดยการระบายอากาศที่เหมาะสม ห้องหมักต้องมีการระบายอากาศที่เพียงพอ โดยห้องหมักจะมีการหมุนเวียนอากาศอย่างมีประสิทธิภาพผ่านตัวกรองจุลชีววิทยาเพื่อควบคุมอุณหภูมิและความชื้น โดยการทำความเย็น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักมีผลยับยั้งการผลิตกรดซิตริกเมื่อมีความเข้มข้นสูงกว่า 10% (Max et al., 2010) Behera, et al., 2021) การหมักบนพื้นผิวมีข้อดีหลายประการ เช่น ต้นทุนการติดตั้งและพลังงานที่ต่ำ (เนื่องจากไม่ต้องการพลังงานในการอากาศและการกวน) และไม่เกิดฟอง แต่ก็มีข้อเสียเช่นกัน โดยเฉพาะการใช้แรงงานมาก (Drysedale & McKay, 1995) และความไวต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Benghazi et al., 2014) วิธีนี้ประกอบด้วยสองขั้นตอนหลัก: ขั้นตอนแรกคือการพัฒนาเชื้อราให้กลายเป็นพรมของเส้นใยบนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ และขั้นตอนที่สองคือการใช้คาร์โบไฮเดรตโดยการเปลี่ยนให้เป็นกรดซิตริก (Kiel, et al., 1981) กระบวนการนี้มักจะทำในห้องหมัก โดยใช้กรดทำจากวัสดุต่างๆ เช่น สแตนเลสเกรดพิเศษ อะลูมิเนียมบริสุทธิ์สูง หรือโพลีเอทิลีน แต่กรดสแตนเลสจะได้รับความนิยมมากกว่าเนื่องจากทนทานต่อการเสีรูปจากการใช้งานในระยะยาว (Bauweleers et al., 2014) เนื่องจากห้องหมักต้องการการระบายอากาศอย่างมีประสิทธิภาพ อากาศที่ปราศจากเชื้อจะส่งผ่านพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องผ่านตัวกรองแบคทีเรีย ซึ่งอากาศนี้จะช่วยในการจ่ายออกซิเจนที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์เนื่องจากลักษณะการเจริญเติบโตแบบใช้ออกซิเจนสูงของกระบวนการนี้ มันยังช่วยควบคุมความชื้นและอุณหภูมิ (ผ่านการระบายความร้อนด้วยการระเหย) อากาศยังช่วยในการกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นสารยับยั้งการผลิตกรดซิตริกเมื่อมีความเข้มข้นสูงกว่า 10% (Soccol, et al., 2006) การปนเปื้อนเป็นปัญหาสำคัญในวัฒนธรรมบนพื้นผิว ยีสต์ *Penicillium* แบคทีเรียแลคติก และสายพันธุ์ของ *Aspergillus* เป็นแหล่งของการปนเปื้อนที่พบได้บ่อย (Soccol, et al., 2006) หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนที่สอง การเก็บเกี่ยวกรดซิตริกจะทำได้โดยการล้างพรมของเส้นใยและสกัดกรดซิตริกที่ซึมซับ (Max et al., 2010) การวิจัยอื่นๆ เกี่ยวกับการ

เพาะเลี้ยงบนพื้นผิวรวมถึงการศึกษาเกี่ยวกับพฤติกรรมทางจุลนาศาสตร์ในการผลิตกรดซิตริกจาก *A. niger* โดยการหมักบนพื้นผิวของ (Sakurai, et al., 1991)

2.11.2 การหมักแบบในอาหารเหลว (Submerged Fermentation)

การหมักแบบในอาหารเหลว (Submerged Fermentation, SmF) เป็นเทคนิคการหมักที่ได้รับความนิยมสูงสุดในอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริก โดยมีสัดส่วนการผลิตคิดเป็นประมาณร้อยละ 80 ของปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตทั่วโลก (Roukas, 1991) เทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาต่อจากการหมักแบบผิวหน้า โดยถึงแม้ว่าจะมีข้อกำหนดที่ซับซ้อนมากขึ้นในด้านการติดตั้ง การควบคุมสภาวะการหมัก และความต้องการพลังงาน รวมถึงปัญหาเรื่องการเกิดฟองระหว่างกระบวนการ (ซึ่งสามารถแก้ไขได้ด้วยการเติมสารยับยั้งฟอง) แต่กระบวนการหมักแบบในอาหารเหลวยังคงมีข้อได้เปรียบหลายประการ ได้แก่ ประสิทธิภาพการผลิตและผลตอบแทนที่สูง ลดต้นทุนการลงทุนและค่าใช้จ่ายด้านแรงงาน ลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อน ความสามารถในการควบคุมกระบวนการได้อย่างแม่นยำ และความยืดหยุ่นในการใช้วัสดุตั้งต้นที่มีองค์ประกอบเปลี่ยนแปลงได้ เช่น กากน้ำตาล (Max et al., 2010) โดยทั่วไป การหมักแบบในอาหารเหลวมักดำเนินการในระบบแบบเบตช์เสร็จ (batch system) (Kishore et al., 2008) แม้ว่าจะระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous) และแบบป้อน (fed-batch) ก็สามารถนำมาใช้ได้เช่นกัน ทั้งนี้ การใช้ขวดเขย่า (shake flask) ก็ยังคงเป็นเทคนิคพื้นฐานที่ใช้สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการหมัก โดยขวดเออร์เลนเมเยอร์จะถูกลากวางบนเครื่องเขย่าเพื่อให้เกิดการผสมและเติมออกซิเจนอย่างต่อเนื่อง (Ikram-ul et al., 2004)



ภาพที่ 8 แผนภาพการหมักแบบในอาหารเหลว(Książek, 2023)

(Darouneh et al., 2009)ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคการหมักแบบผิวหน้าและแบบในอาหารเหลวโดยพบว่า การหมักแบบผิวหน้าให้ผลผลิตกรดซิตริกที่ดีกว่าในบางกรณี ขณะที่งานวิจัยของ Ali et al. (2002a และ Majumder et al., 2010 แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ของ *A. niger* สามารถใช้กากน้ำตาลจากอ้อยและฟักทองเป็นวัสดุตั้งต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการใช้วัสดุตั้งต้นร่วมกันให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้วัสดุชนิดเดียว Roukas (1991) รายงานความสามารถของกากน้ำตาลบีต (beet molasses) ในการผลิตกรดซิตริกโดยใช้ขวดเขย่า ขณะที่ Anastassiadis et al. (2008) ศึกษาความต้องการออกซิเจนของ *Yarrowia lipolytica* ในการผลิตกรดซิตริก วัสดุที่ใช้สร้างถังหมักในระบบอาหารเหลว เช่น สเตนเลสชนิดออสเทนนิติก (austenitic stainless steel) หรือสเตนเลสชนิด 316L จะต้องมีความทนทานต่อสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ เพื่อหลีกเลี่ยงการกัดกร่อนและป้องกันการยับยั้งการสร้างกรดซิตริกจากโลหะที่ละลายออกมา ข้อดีหลักของการหมักแบบในอาหารเหลวเมื่อเทียบกับการหมักแบบผิวหน้า ได้แก่ ต้นทุนการดำเนินการและแรงงานต่ำกว่า ความเสี่ยงจากการปนเปื้อนน้อย ระบบสามารถควบคุมได้ง่าย และให้ผลผลิตกรดซิตริกที่สูงขึ้น (Angumeenal & Venkappayya, 2013) ระบบหมักแบบเบ็ดเสร็จเป็นรูปแบบที่ใช้บ่อยที่สุดในระดับอุตสาหกรรม ขณะที่การหมักแบบป้อนจะมีการเติมสารอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อเข้าไปในระบบระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ (ภาพที่ 8) เพื่อควบคุมการใช้ซับสเตรตและป้องกันการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ (Show et al., 2015) สำหรับการหมักแบบต่อเนื่อง สารอาหารจะเติมเข้าสู่ถังหมักในอัตราที่เท่ากับการปล่อยน้ำหมักออกจากระบบ ซึ่งช่วยให้รักษาสมดุลในระบบได้ เพื่อให้ได้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดในระบบอาหารเหลว การควบคุมพารามิเตอร์กระบวนการ เช่น อุณหภูมิ pH อัตราการใช้ออกซิเจน และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นสิ่งสำคัญ (Markets, 2023) โดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรมที่ต้องการความแม่นยำและประสิทธิภาพสูง

การหมักแบบในอาหารเหลว หรือ Submerged Fermentation (SF) เป็นกระบวนการหลักที่ใช้ในการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ *A. niger* เป็นจุลินทรีย์หลัก การหมักในของเหลวเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมสูงเนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ง่ายและมีประสิทธิภาพสูงกว่าการหมักในสภาพของแข็งหรือบนพื้นผิว (Gutiérrez-Correa & Villena, 2003; Shu & Johnson, 1948) SF เป็นกระบวนการที่เชื้อราจะเจริญในของเหลวที่อุดมด้วยสารอาหาร โดยเฉพาะน้ำตาลจำพวกเฮกโซส เช่น กลูโคส ฟรุคโตส หรือซูโครส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นหลักในการผลิตกรดซิตริก กระบวนการนี้สามารถแบ่งออกเป็น ระยะเจริญเติบโต (trophophase) และ ระยะสะสมผลิตภัณฑ์ (idiophase) ในระยะเจริญเติบโต เชื้อราจะเน้นการสร้างเส้นใยและเพิ่มมวลชีวภาพ ส่วนระยะสะสมผลิตภัณฑ์เป็นช่วงที่เริ่มมีการผลิตกรดซิตริกอย่างเข้มข้น ซึ่งความสามารถในการผลิตกรดซิตริกสูงสุดจะขึ้นอยู่กับการจัดการสภาพแวดล้อม เช่น ค่า

pH อุณหภูมิ การให้ออกซิเจน และความเข้มข้นของสารอาหาร (Papagianni, 2007; Legiša & Matthey, 2007)

จากงานวิจัยหลายฉบับ การหมักแบบในอาหารเหลว (Submerged Fermentation; SmF) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมชีวภาพอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ง่ายและเหมาะสมต่อการผลิตสารชีวภาพที่ต้องการปริมาณสูง เช่น เอนไซม์ กรดอินทรีย์ และ โปรตีนจากจุลินทรีย์ การหมักชนิดนี้อาศัยการเจริญของจุลินทรีย์ในของเหลวที่มีสารอาหารและความชื้นสูง ทำให้จุลินทรีย์สามารถกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอและเข้าถึงออกซิเจนและสารอาหารได้ง่าย (Couto & Sanromán, 2006; Thomas et al., 2013) และได้รับความนิยมในงานวิจัยและอุตสาหกรรมเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ ประการแรกคือสามารถควบคุมปัจจัยสิ่งแวดล้อมได้อย่างแม่นยำ เช่น pH อุณหภูมิ ความเข้มข้นของออกซิเจน และการกวนของของเหลว ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตเมตาบอไลต์รองของเชื้อราและแบคทีเรีย (Zeng et al., 2012) ประการที่สองคือการผลิตในปริมาณใหญ่สามารถทำได้โดยใช้ไบโอรีแอ็กเตอร์มาตรฐานที่มีการออกแบบระบบควบคุมอัตโนมัติ เช่น การจ่ายออกซิเจน การกวนแบบ variable speed impellers และการควบคุมอุณหภูมิแบบ jacketed vessel ซึ่งช่วยเพิ่มความเสถียรและประสิทธิภาพของกระบวนการ (Kobayashi et al., 2007)

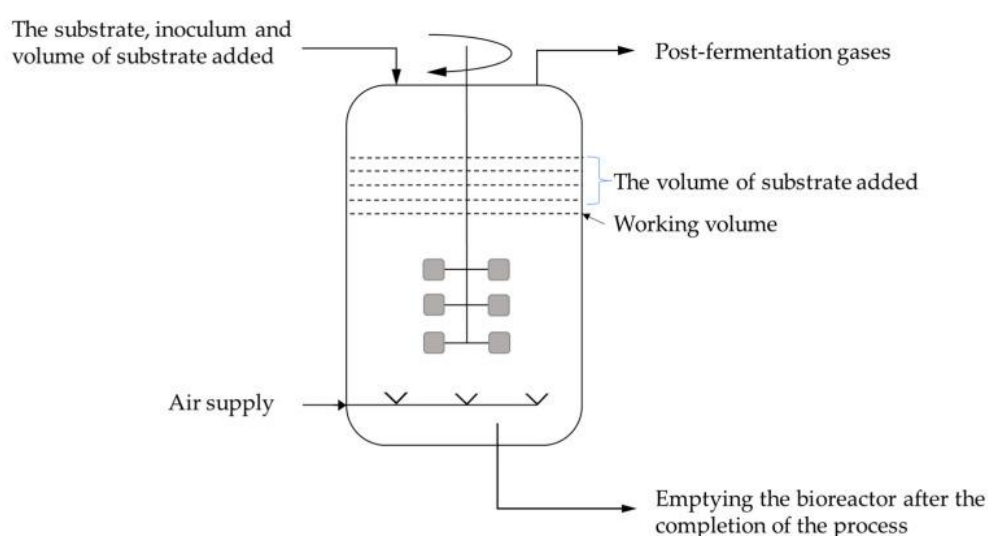
งานวิจัยด้านชีวเคมีของ Submerged Fermentation พบว่ากระบวนการนี้เหมาะสำหรับจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในสภาพน้ำสูง โดยเฉพาะเชื้อราที่ผลิตกรดซิตริกอย่าง *Aspergillus niger* การเจริญของเชื้อราใน SmF จะเริ่มจากการงอกของสปอร์และการสร้าง hyphal tip ที่เจริญในทิศทาง การกระจายตัวของของเหลว ระหว่างกระบวนการ Hyphal pellet formation หรือการจับตัวเป็นก้อนของเส้นใย อาจเกิดขึ้นซึ่งมีผลต่อการถ่ายเทมวลและออกซิเจนภายในไบโอรีแอ็กเตอร์ ดังนั้น การควบคุมการกวนและความหนาแน่นของสปอร์เริ่มต้นเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มผลผลิตของสารชีวภาพ (Nigam & Pandey, 2009; Soccol et al., 2017) อีกทั้งยังเหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ที่ต้องการสภาพ homogenous environment เช่น protease amylase และ lipase เนื่องจากการหมุนเวียนของของเหลวช่วยให้เซลล์เข้าถึงสารอาหารและขจัดของเสียได้อย่างต่อเนื่อง งานวิจัยโดย Papagianni (2007) พบว่าอัตราการกวนและความเร็วในการหมุนเวียนของอากาศมีผลต่อปริมาณ citric acid ที่ผลิตได้จากราชนิดนี้ โดยการปรับอัตราการให้อากาศ และอัตราการกวนสามารถเพิ่มผลผลิตได้มากกว่า 30% นอกจากนี้การหมักในอาหารเหลวยังเหมาะต่อการผลิตเมตาบอไลต์รองที่ต้องการการควบคุมปัจจัยสิ่งแวดล้อมอย่างเคร่งครัด เช่น ค่าพีเอช ค่าศักย์รีดอกซ์ (ORP) และความเข้มข้นอาหาร งานวิจัยของ Thomas et al. (2013) ชี้ให้เห็นว่าการปรับความเข้มข้นของ

แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนใน SmF มีผลโดยตรงต่อการสะสมกรดอินทรีย์และเอนไซม์ โดยสามารถปรับสภาพได้อย่างแม่นยำในไบโอรีแอกเตอร์แบบเบดเสิร์ฟ หรือป้อน แม้ SmF จะมีข้อดีหลายประการ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น การใช้พลังงานสูงในการกวนและระบายความร้อน การเกิด shear stress ที่อาจทำลายโครงสร้างของเส้นใยและการเกิดฟองที่ต้องมีตัวจัดการ (antifoaming agents) ซึ่งงานวิจัยล่าสุดได้มีการพัฒนาเทคนิค microcarrier-based fermentation เพื่อช่วยลดปัญหาเหล่านี้และเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการ (Bandyopadhyay et al., 2015)

หนึ่งในคุณสมบัติสำคัญของ SF คือการควบคุม ค่า pH ต่ำ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นให้ *A. niger* สะสมกรดซิตริกในปริมาณสูงที่สุด โดยทั่วไปค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการสะสมกรดซิตริกอยู่ระหว่าง 2.0–3.0 การควบคุมค่า pH ต่ำช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นและลดการเกิดของผลิตภัณฑ์แทรกซ้อน เช่น กรดกลูโคนิก (gluconic acid) (Soccol et al., 2006) การหมักแบบ SF ยังเน้น การจัดหาออกซิเจนเพียงพอให้แก่เชื้อรา เนื่องจากปฏิกิริยาในการสังเคราะห์กรดซิตริก (TCA cycle) และการผลิตกรดซิตริกต้องการออกซิเจนสูง การใช้เครื่องหมักแบบ ไบโอรีแอกเตอร์แบบถังหมุน (stirred tank bioreactor) หรือ ไบโอรีแอกเตอร์แบบฟองอากาศ (aerated bubble column bioreactor) ช่วยเพิ่มการกระจายออกซิเจนและทำให้การหมักมีประสิทธิภาพสูงขึ้น นอกจากนี้ การกวนของเครื่องหมักช่วยลดการตกตะกอนของเส้นใยเชื้อราและเพิ่มการแลกเปลี่ยนมวลสารและความร้อนภายในระบบ (Shu & Johnson, 1948; Soccol et al., 2006)

จากมุมมองทางชีวเคมี กลูโคสที่เข้าสู่เซลล์ *A. niger* จะถูกฟอสโฟรีเลตเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ hexokinase และ glucokinase กลูโคส-6-ฟอสเฟตจะเข้าสู่เส้นทาง glycolysis เพื่อผลิตพลังงานและพรีคูเซอร์สำหรับการสังเคราะห์กรดซิตริก ในระยะ idiophase การมีส่วนร่วมของเส้นทาง pentose phosphate pathway จะลดลงอย่างมาก ทำให้เส้นทาง glycolysis และ TCA cycle เป็นเส้นทางหลักในการผลิตกรดซิตริก (Legiša & Matthey, 2007; Karaffa & Kubicek, 2003) SF ยังมีข้อดีในเชิงวิศวกรรมและการผลิตเชิงอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถ วิเคราะห์และควบคุมปัจจัยการผลิตอย่างละเอียด เช่น อัตราการให้อากาศ การกวนของของเหลว และอุณหภูมิอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ ยังสามารถปรับเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มผลผลิตหรือเร่งอัตราการผลิตกรดซิตริก โดยใช้เทคนิคการปรับความเข้มข้นของน้ำตาล การเติมสารอาหารรอง หรือการใช้ สารกระตุ้นทางชีวเคมี (metabolic inducers) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเส้นทางการสังเคราะห์กรดซิตริก (Papagianni, 2007; Soccol et al., 2006) การหมักแบบ SF เป็นกระบวนการที่มี ความเสถียรและยืดหยุ่นสูง สามารถใช้ทั้งในห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม การพัฒนาสายพันธุ์ *A. niger* ให้มีผลผลิตสูงและทนต่อความเครียดทางสภาพแวดล้อมเป็นอีกหนึ่งกล

ยุทธ์สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริก และเมื่อเทียบกับการหมักในสภาพของแข็งหรือบนพื้นผิว การหมักแบบ SF ให้ ผลผลิตต่อหน่วยปริมาตรสูงกว่า สามารถควบคุมกระบวนการอย่างแม่นยำ และเหมาะสมสำหรับการผลิตเชิงอุตสาหกรรมในเชิงพาณิชย์ (Shu & Johnson, 1948; Soccol et al., 2006; Papagianni, 2007) ดังนั้น Submerged Fermentation จึงเป็น เทคโนโลยีหลักในการผลิตกรดซิตริก ในปัจจุบัน และเป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับการพัฒนาเทคนิคการหมักขั้นสูง เช่น การควบคุมแบบอัตโนมัติ การปรับสภาพเชิงพลังงาน และการใช้เชื้อปรับปรุงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มผลผลิตและความบริสุทธิ์ของกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม



ภาพที่ 9 แผนภาพการหมักในอาหารเหลวแบบป้อน (Książek, 2023)

2.11.3 การหมักแบบสถานะของแข็ง (Solid-State Fermentation Cultures)

การหมักแบบสถานะของแข็ง (Solid-State Fermentation; SSF) หรือที่รู้จักกันในชื่อ “การหมักโคจิ” (Koji Fermentation) เป็นเทคนิคที่มีต้นกำเนิดจากประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีทรัพยากรของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรจำนวนมาก และได้นำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบหลักในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Kareem et al., 2010) เทคนิคนี้เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ในวัสดุแข็งที่มีความชื้นแต่ไม่มีของเหลวอิสระ โดยวัสดุเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นทั้งแหล่งสารอาหารและตัวรองรับเชิงกายภาพ (Käppeli et al., 1978)

การหมักแบบสถานะของแข็ง (Solid-State Fermentation; SSF) เป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีการเจริญบนวัสดุแข็งที่มีความชื้นเพียงพอแต่ไม่มีของเหลวอิสระ เทคนิคนี้มีประวัติการใช้งานมายาวนาน โดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชีย เช่น ประเทศญี่ปุ่น จีน และอินเดีย ซึ่งใช้วัสดุเหลือใช้จาก

อุตสาหกรรมเกษตร เช่น ข้าวฟ่าง ข้าวโพด กากั่วเหลือง และมันสำปะหลัง เป็นตัวกลางสำหรับการเพาะเชื้อรา เช่น *Aspergillus spp.*, *Rhizopus spp.* และ *Trichoderma spp.* (Kareem et al., 2010; Soccol et al., 2003)

SSF มีข้อได้เปรียบหลายประการเหนือการหมักในของเหลว (Submerged Fermentation; SmF) โดยเฉพาะเมื่อใช้ในเชื้อราชนิด filamentous fungi ข้อได้เปรียบหลัก ๆ ได้แก่ การเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์และเมตาบอไลต์รอง การใช้พลังงานต่ำ เนื่องจากไม่ต้องควบคุมปริมาตรน้ำจำนวนมาก และมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ วัสดุแข็งยังทำหน้าที่เป็นตัวรองรับเชิงกายภาพ (physical support) ช่วยให้เชื้อราสามารถยึดเกาะและขยายเส้นใยได้อย่างเต็มที่ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่เพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตสารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ (Käppeli et al., 1978; Soccol et al., 2003) กระบวนการ SSF เริ่มต้นจากการเตรียมวัสดุแข็งให้มีความชื้นและ pH ที่เหมาะสม จากนั้นจึงเติมเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่วัสดุ กระบวนการเจริญของเชื้อราบนวัสดุแข็งสามารถแบ่งออกเป็นสองระยะหลักคือ ระยะ germination ที่สปอร์ของเชื้อราออกเป็น hyphae และระยะการขยายตัวของ hyphae ที่ครอบคลุมพื้นผิววัสดุ (Mitchell, 1992) ความหนาแน่นของเส้นใยและความสามารถในการสร้างเมตาบอไลต์รองสูงขึ้นในระยะนี้ นอกจากนี้ การกระจายออกซิเจนและความชื้นในวัสดุเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และผลผลิตของเอนไซม์หรือกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก (Raimbault, 1998) SSF ยังมีความเหมาะสมต่อการใช้วัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมเกษตรที่มีองค์ประกอบทางโภชนาการสูง เช่น แป้ง เซลลูโลส และโปรตีน ซึ่งเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เทคนิคนี้จึงเป็นทางเลือกที่ยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมสำหรับการผลิตสารชีวภาพ (Kareem et al., 2010; Soccol et al., 2003)

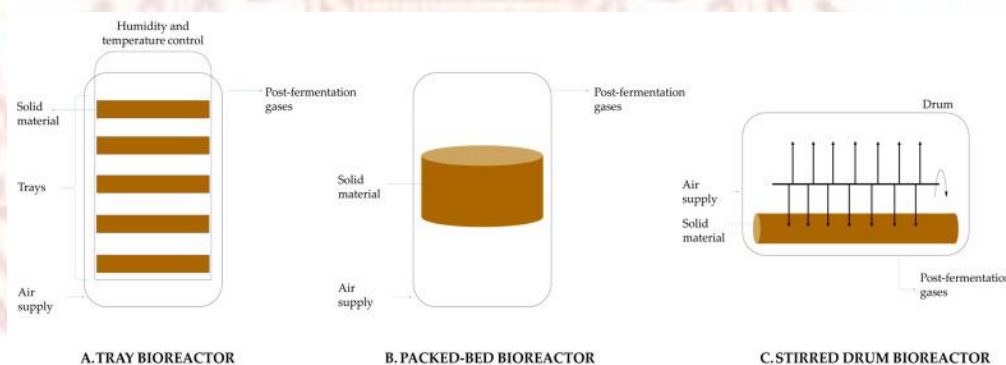
SSF มีความแตกต่างสำคัญจากการหมักในของเหลว (Submerged Fermentation) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเจริญของเชื้อราชนิด filamentous fungi การเติบโตบนพื้นผิวแข็งทำให้จุลินทรีย์สามารถสร้างเครือข่ายเส้นใย (mycelial network) ได้อย่างเต็มที่ ซึ่งส่งผลให้การผลิตเอนไซม์และเมตาบอไลต์รองมีประสิทธิภาพสูงกว่า (Beniwal et al., 2010) นอกจากนี้ การหมักแบบ SSF ยังมีข้อได้เปรียบในด้านพลังงานและต้นทุน เนื่องจากไม่ต้องควบคุมปริมาตรน้ำขนาดใหญ่ การระบายความร้อนและการควบคุม pH ทำได้ง่ายกว่า และสามารถใช้วัสดุเหลือใช้เป็นวัตถุดิบได้เพิ่มประสิทธิภาพ (Soccol et al., 2017)

งานวิจัยด้านชีวเคมีของ SSF พบว่าการเจริญของจุลินทรีย์ในวัสดุแข็งสามารถแบ่งออกเป็นหลายระยะ ระยะแรกเริ่มจากการงอกของสปอร์และการสร้าง germ tube เพื่อยึดเกาะพื้นผิววัสดุ ระยะถัดมาคือการขยายตัวของ hyphae ครอบคลุมพื้นผิวและเพิ่มความหนาแน่นของเส้นใย ซึ่งระยะ

นี้เป็นช่วงที่การผลิตเมตาบอไลต์รองสูงสุด (Mitchell et al., 2006; Pandey, 2003) การกระจายออกซิเจน ความชื้น และปริมาณสารอาหารในวัสดุจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อผลผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ SSF ยังได้รับการพัฒนาให้มีการควบคุมในเชิงวิศวกรรมมากขึ้น การออกแบบไบโอรีแอ็กเตอร์มีหลายรูปแบบ ตั้งแต่ถาดหมักแบบนิ่ง (tray fermenters) ไบโอรีแอ็กเตอร์แบบกึ่งกวน (semi-solid stirred reactors) ไปจนถึงระบบ stacked-bed และ packed-bed bioreactors เพื่อเพิ่มการระบายความร้อนและการกระจายออกซิเจน การปรับรูปแบบวัสดุรองรับให้เหมาะสม เช่น การใช้ inert solid substrates อย่าง perlite หรือ polyurethane foam สามารถช่วยควบคุมสภาพแวดล้อมภายในวัสดุได้ดีขึ้นและลดความไม่สม่ำเสมอของผลผลิต (Khurana et al., 2018; Mitchell et al., 2006) การใช้ SSF ในการผลิตสารชีวภาพยังเปิดโอกาสในการพัฒนาเทคโนโลยีแบบผสมผสาน เช่น การใช้ mixed culture SSF เพื่อเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ cellulase และ pectinase การใช้เชื้อราหลายสายพันธุ์ร่วมกันช่วยเพิ่มการย่อยสลายวัสดุซับซ้อนและสร้างเมตาบอไลต์รองที่หลากหลายมากขึ้น (Singhania et al., 2009; Beniwal et al., 2010) งานวิจัยล่าสุดยังพบว่า SSF เป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการศึกษากระบวนการสร้าง biofilm ของเชื้อราและความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของ hyphae กับการสังเคราะห์เมตาบอไลต์รองเชิงชีวภาพ (Khurana et al., 2018) SSF เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์สูงในอุตสาหกรรมและงานวิจัย ทั้งในแง่ของการใช้วัสดุเหลือใช้ การเพิ่มผลผลิตของสารชีวภาพ และการศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับสรีรวิทยาของเชื้อรา การออกแบบและควบคุมสภาพแวดล้อมใน SSF จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดประสิทธิภาพของกระบวนการ (Pandey, 2003; Soccol et al., 2017)

การหมักแบบสถานะของแข็งถือเป็นกระบวนการที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งมีการถ่ายเทมวลและความร้อนหลายเฟสเกิดขึ้นพร้อมกันในระบบ (Mores et al., 2021; Couto & Sanromán, 2006) ความชื้นในระบบจะควบคุมในช่วงเริ่มต้นจากวัสดุตั้งต้น และต่อมากจะควบคุมโดยอากาศที่ไหลผ่านระหว่างการหมัก ในสภาวะที่เหมาะสม กระบวนการหมักสามารถเสร็จสิ้นภายใน 4 วัน (Drysedale & McKay, 1995) ในระดับห้องปฏิบัติการ มักใช้ภาชนะอย่างเช่น จานเพาะเชื้อหรือขวดโหลในการทดลองคัดกรองสายพันธุ์หรือเงื่อนไขการผลิต ขณะที่ในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้ไบโอรีแอ็กเตอร์หลายประเภท ซึ่งจำแนกตามลักษณะการผสมและการเติมอากาศ ได้แก่ ไบโอรีแอ็กเตอร์แบบถาดวางบนชั้นวาง (Tray-type reactor) วัสดุหมักถูกวางบนถาดโลหะหรือพลาสติก วางในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ไบโอรีแอ็กเตอร์แบบคอลัมน์ (Packed-bed reactor) วัสดุหมักบรรจุในคอลัมน์แนวตั้ง และไบโอรีแอ็กเตอร์แบบกึ่งกวน (Stirred drum reactor) ใช้สำหรับการหมักที่ต้องมีการผสมวัสดุอย่างช้าๆ โดยไม่มีการเติมอากาศแบบบังคับ (ภาพที่ 10) (Mattedi et al., 2023; Vandenberghe et al., 2021)

การหมักแบบสถานะของแข็ง หรือ Solid-State Fermentation (SSF) เป็นกระบวนการหมักที่จุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา filamentous fungi หรือแบคทีเรียเจริญบนวัสดุแข็งที่มีความชื้น แต่ไม่มีน้ำอิสระไหลเวียนอย่างอิสระ วัสดุแข็งเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นทั้ง แหล่งสารอาหารและตัวรองรับเชิงกายภาพ ของจุลินทรีย์ ทำให้กระบวนการหมักแบบ SSF แตกต่างจากการหมักในอาหารเหลว (Submerged Fermentation; SF) อย่างชัดเจน (Käppeli et al., 1978; Kareem et al., 2010) SSF มีต้นกำเนิดทางวัฒนธรรมอาหารในประเทศญี่ปุ่น โดยเฉพาะกระบวนการผลิต Koji ซึ่งใช้เชื้อรา *A. oryzae* บนข้าวหรือถั่วเพื่อผลิตซอสถั่วเหลืองและมิโซะ กระบวนการนี้ถือเป็นหนึ่งในเทคนิคการหมักดั้งเดิมที่สำคัญที่สุด และในปัจจุบันได้ขยายไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น การผลิตเอนไซม์ กรดอินทรีย์ และผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากจุลินทรีย์ (Kareem et al., 2010; Doelle et al., 1992) ลักษณะเฉพาะของ SSF คือ สภาพแวดล้อมจำลองธรรมชาติของจุลินทรีย์ filamentous fungi ซึ่งแตกต่างจากการเจริญในของเหลว เชื้อราที่เจริญในสภาพของแข็งจะสร้างเส้นใยเพื่อแทรกซึมวัสดุรองรับ ทำให้เกิด การกระจายตัวที่สม่ำเสมอและผิวสัมผัสต่ออากาศสูง เส้นใยเชื้อรายังสามารถผลิตเอนไซม์และเมแทบอลิโตนจำนวนมาก เช่น cellulase, pectinase, lipase และกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ซึ่งในหลายกรณีให้ผลผลิตสูงกว่า SF เนื่องจากการกระจายออกซิเจนและความชื้นใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมธรรมชาติของเชื้อรา (Mitchell, 1992; Soccol et al., 2003)



ภาพที่ 10 แผนภาพแสดงกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสถานะของแข็ง (Książek, 2023)

ข้อดีของการหมักแบบนี้คือ ประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริกที่สูง ต้นทุนการดำเนินงานต่ำ ไม่ต้องการระบบควบคุมที่ซับซ้อนและใช้เศษวัสดุเหลือจากอุตสาหกรรมการเกษตรเป็นวัสดุตั้งต้นได้ เช่น เปลือกกล้วย เปลือกกีว เนื้ออินทผลัม กากแอปเปิ้ล รำข้าวสาลี เปลือกส้ม มันหวาน (*Ipomoea batatas*) มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) และเผือก (Max et al., 2010; Show et al., 2015) นอกจากนี้กระบวนการหมักแบบสถานะของแข็งยังใช้ระยะเวลาสั้น (ประมาณ 4 วัน) และไม่ต้องเตรียมวัตถุดิบล่วงหน้ามากนัก ทั้งยังไวต่อความเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของสารอาหารน้อยกว่าการหมักแบบในอาหารเหลว (Berovic & Legisa, 2007) อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ก็มีข้อจำกัดคือ การ

ถ่ายเทความร้อนและออกซิเจนภายในวัสดุหมักไม่ดี ส่งผลให้ไม่สามารถใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่ (Sangsurasak & Mitchell, 1995) ปริมาณจุลินทรีย์ในระบบจำกัด และไม่เหมาะสมกับสายพันธุ์ที่ต้องการไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสในปริมาณมาก แม้ว่าการหมักแบบสถานะของแข็งโดย *A. niger* จะได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นในงานวิจัยช่วงหลัง แต่ในระดับอุตสาหกรรม กระบวนการนี้ยังคงมีข้อจำกัดในด้านระดับการอัตโนมัติที่ต่ำ และความจำเป็นในการออกแบบเครื่องหมักเฉพาะ ทำให้การใช้งานในอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริกยังมีอยู่อย่างจำกัด (Dhillon et al., 2013)

2.12 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดซิตริกสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ ปัจจัยด้านกระบวนการ (operational factors) และปัจจัยทางเคมี (chemical factors) งานวิจัยหลากหลายฉบับได้มุ่งเน้นไปที่การปรับแต่งองค์ประกอบที่จำเป็นต่อกระบวนการหมัก เพื่อเพิ่มผลผลิตของกรดซิตริก โดยเฉพาะองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (media composition) หรือที่เรียกว่าพารามิเตอร์ทางเคมี ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดปริมาณผลผลิตของกรดซิตริก Currie (1917) ได้ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมัก และพบว่า บางองค์ประกอบจำเป็นต้องใช้ในปริมาณมาก เช่น น้ำตาล ออกซิเจน และโปรตอน ในขณะที่องค์ประกอบอื่น เช่น ฟอสฟอรัสและไนโตรเจน ต้องการในปริมาณน้อย และธาตุอีกบางชนิด เช่น แมงกานีสและธาตุรอง (trace elements) ใช้ในปริมาณที่น้อยมากแต่มีบทบาทสำคัญ การผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อรา *A. niger* เป็นกระบวนการชีวภาพที่ซับซ้อนซึ่งควบคุมโดยปัจจัยหลายประการ ทั้งด้านชีวเคมี ชีววิทยาของจุลินทรีย์ และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม การเข้าใจปัจจัยเหล่านี้เป็นสิ่งสำคัญในการเพิ่มผลผลิตและประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก โดยปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริกสามารถแบ่งได้เป็นปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ

สารตั้งต้นและแหล่งคาร์บอน มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตกรดซิตริก เนื่องจากกรดซิตริกเป็นผลิตภัณฑ์ของการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ชนิดและความเข้มข้นของคาร์บอนที่ใช้มีผลต่ออัตราการเจริญและการสะสมกรดของเชื้อรา กลูโคสเป็นคาร์บอนหลักที่นิยมใช้ในกระบวนการหมัก และพบว่า การให้กลูโคสในปริมาณสูงจะกระตุ้นให้เกิดการสะสมกรดซิตริกมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การให้กลูโคสมากเกินไปอาจทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อราจากความดันออสโมติกสูง (Soccol et al., 2006; Papagianni, 2007) การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนอื่น ๆ เช่น ฟรุคโตส ซูโครส หรือมอลโตส อาจมีผลต่อความเร็วในการผลิตกรดและโปรไฟล์ของเมแทบอลิซึม แต่กลูโคสยังคงเป็นตัวเลือกที่ดีที่สุด เนื่องจากกระบวนการเผาผลาญของ *A. niger* สามารถเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดซิตริกได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

แหล่งไนโตรเจนและธาตุอาหารรอง ก็มีความสำคัญต่อการกระตุ้นหรือยับยั้งการผลิตกรดซิตริก *A. niger* ต้องการไนโตรเจนในปริมาณต่ำเพื่อให้เกิดสภาวะที่ส่งเสริมการสะสมกรดซิตริก หากมีไนโตรเจนมากเกินไปเชื้อราจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วแต่ผลิตกรดซิตริกในปริมาณต่ำ นอกจากนี้การปรับสมดุลของฟอสฟอรัส กำมะถัน และธาตุอาหารรอง เช่น แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี ก็มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริก โดยเฉพาะแมกนีเซียมและเหล็กที่มีบทบาทสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ aconitase และ citrate synthase ซึ่งเกี่ยวข้องกับวงจร TCA (Papagianni, 2007; Karaffa & Kubicek, 2003)

ปัจจัย pH ของอาหารเพาะเลี้ยง เป็นอีกปัจจัยสำคัญในการหมักกรดซิตริก *A. niger* สามารถเจริญได้ในช่วง pH กว้างตั้งแต่ 1.5 ถึง 9.8 แต่ค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดซิตริกอยู่ที่ประมาณ 2.0–3.5 การควบคุม pH ในระดับต่ำจะช่วยลดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นและยับยั้งเอนไซม์ aconitase ทำให้เกิดการสะสมกรดซิตริกมากขึ้น นอกจากนี้ pH ยังส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์และการละลายของแร่ธาตุต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Legiša & Matthey, 2007; Soccol et al., 2006)

อุณหภูมิและการระบายอากาศก็มีบทบาทสำคัญต่อการหมัก กรดซิตริกการเจริญเติบโตของ *A. niger* จะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 25–30°C หากอุณหภูมิต่ำเกินไปกระบวนการเผาผลาญจะชะลอตัว ส่วนอุณหภูมิสูงเกินไปอาจทำให้เกิดความเครียดต่อเซลล์และลดผลผลิตของกรด นอกจากนี้การระบายอากาศมีผลต่อการให้สารออกซิเจนเพียงพอสำหรับกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ซึ่งมีผลต่อการผลิต ATP และ cofactors ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดซิตริก โดยเฉพาะ NADH/NAD⁺ balance ซึ่งเป็นตัวกำหนดทิศทางการเผาผลาญของวงจร TCA (Papagianni, 2007; Legiša & Matthey, 2007) ความหนาแน่นของเชื้อเริ่มต้นและเทคนิคการเพาะเชื้อก็เป็นปัจจัยที่สำคัญ การให้ปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมช่วยให้เกิดการเจริญและการสะสมกรดซิตริกอย่างสม่ำเสมอ การใช้กล้าเชื้อที่มีความหนาแน่นสูงเกินไปอาจทำให้เกิดการแข่งขันภายในเชื้อราและลดประสิทธิภาพการผลิต (West, 2023)

2.13 พารามิเตอร์ทางเคมี

2.13.1. แหล่งคาร์บอน (Carbon Source)

มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาการเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดซิตริก โดยพบว่า การใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลในระดับสูงในกระบวนการหมักร่วมกับเชื้อราในรูปแบบเม็ด (pellets) สามารถส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -ketoglutarate dehydrogenase

ซึ่งทำให้วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) ผิดปกติ แต่กลับเพิ่มการสะสมของกรดซิตริกได้อย่างมีนัยสำคัญ (Abonama et al., 2014) น้ำตาลที่เหมาะสมกับการหมัก คือ น้ำตาลที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ง่ายและให้ผลผลิตกรดซิตริกในระดับสูง (Mattey, 1992) จากรายงานหลายฉบับพบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับกลูโคส ฟรุคโตส และแลคโตส เนื่องจากเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) สามารถย่อยซูโครสได้อย่างรวดเร็วในสภาวะที่มี pH ต่ำ (Gupta et al., 1976; Hossain et al., 1984; Kubicek et al., 2016; Kubicek-Pranz et al., 1990; Xie & West, 2009) นอกจากนี้ ด้วยน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำ ซูโครสสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้ง่ายและถูกย่อยโดยเอนไซม์ภายในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว (El-Holi & Al-Delaimy, 2003) ในขณะที่แหล่งคาร์บอนอื่นๆ เช่น ไซโลส แป้ง ซอร์บิทอล อาราบิโนส และกรดไพรูวิก พบว่าไม่เหมาะสำหรับการผลิตกรดซิตริก เนื่องจากส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราและลดการสะสมของกรดซิตริก (Gil, 2014)

คาร์บอนถือเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญที่สุดต่อการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อรา *A. niger* เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงานและวัสดุตั้งต้นสำหรับการสร้างเมตาบอไลต์และกรดอินทรีย์ต่าง ๆ กระบวนการผลิตกรดซิตริกส่วนใหญ่เกิดขึ้นผ่านการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตในเส้นทางไกลโคไลซิสและวงจร TCA ทำให้คาร์บอนที่ใช้มีผลโดยตรงต่ออัตราการสะสมกรดซิตริกและประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก (Papagianni, 2007; Soccol et al., 2006) กลูโคสถือเป็นแหล่งคาร์บอนหลักที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการหมักกรดซิตริก เนื่องจากเชื้อรา *A. niger* สามารถเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดซิตริกได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดยกระบวนการนี้เริ่มจากการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่เซลล์ผ่านตัวพา (glucose transporter) และฟอสโฟริเลตเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ hexokinase หรือ glucokinase ก่อนเข้าสู่เส้นทางไกลโคไลซิสและเส้นทางพอนโตสฟอสเฟต (Pentose Phosphate Pathway) (Legiša & Mattey, 2007) ปริมาณกลูโคสที่สูงสามารถกระตุ้นให้เกิดการสะสมกรดซิตริก แต่หากความเข้มข้นสูงเกินไปจะเกิดผลกระทบทางออสโมติกที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราและลดประสิทธิภาพการผลิต (Papagianni, 2007) นอกจากกลูโคสแล้ว แหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ก็สามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มความหลากหลายในการผลิตกรดซิตริก เช่น ซูโครส มอลโตส ฟรุคโตส และแป้งที่ย่อยแล้ว (hydrolyzed starch) ซึ่งแต่ละชนิดของคาร์บอนจะมีผลต่ออัตราการเผาผลาญและโปรไฟล์ของเมตาบอไลต์รอง แตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น ฟรุคโตสจะเปลี่ยนเป็นฟรุคโตส-6-ฟอสเฟตและเข้าสู่เส้นทางไกลโคไลซิสโดยตรง ทำให้กระบวนการผลิตกรดซิตริกมีความเร็วสูงขึ้น แต่ในบางกรณี การใช้มอลโตสหรือซูโครสอาจทำให้เกิดระยะการปรับตัว (lag phase) ในการสะสมกรดซิตริก เนื่องจากต้องมีการย่อยสลายเป็นกลูโคสก่อนเข้ากระบวนการเมแทบอลิซึม (Karaffa & Kubicek, 2003)

อีกแง่มุมหนึ่งที่สำคัญคือ การเลือกใช้วัตถุดิบที่มาจากแหล่งของเสียทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง อ้อย ข้าวโพด หรือผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งมีทั้งความเหมาะสมทางเศรษฐกิจและความยั่งยืน วัตถุดิบเหล่านี้มักเป็นแหล่งของคาร์บอนเชิงซับซ้อน เช่น แป้งหรือเซลลูโลส ซึ่งจำเป็นต้องผ่านกระบวนการย่อยก่อนจะใช้โดย *A. niger* การใช้แหล่งคาร์บอนเหล่านี้สามารถลดต้นทุนการผลิตและยังสนับสนุนการหมุนเวียนทรัพยากรในอุตสาหกรรม (Kareem et al., 2010; Soccol et al., 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการควบคุมการผลิตกรดซิตริกในระดับโมเลกุล กลูโคสความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ phosphofructokinase และ aconitase ซึ่งเป็นตัวควบคุมสำคัญในวงจร TCA การยับยั้งนี้ทำให้เกิดการสะสม citric acid ภายในเซลล์และขับออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น ปัจจัยเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการเลือกชนิดและความเข้มข้นของคาร์บอนเป็นปัจจัยหลักในการเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกอย่างมีประสิทธิภาพ (Papagianni, 2007; Legiša & Matthey, 2007)

ปริมาณของคาร์บอนในกระบวนการหมักถือเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลโดยตรงต่อการผลิตกรดซิตริก โดยจำเป็นต้องมีในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม หากมีในปริมาณต่ำเกินไป จะทำให้ขนาดของเส้นใยลดลงและมีผลต่อรูปร่างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา (Papagianni et al., 1999) งานวิจัยระบุว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลในช่วง 10–14 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริก และความเข้มข้นต่ำกว่า 2.5 เปอร์เซ็นต์ จะไม่มีการผลิตกรดซิตริก (Xu et al., 1989) ขณะที่หลายรายงานแนะนำให้ใช้ความเข้มข้นระหว่าง 14–22 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่เหมาะสม (Hossain et al., 1984) อย่างไรก็ตาม Honecker et al. (1989) พบว่า การใช้เซลล์เชื้อรา *A. niger* แบบตรึง (immobilized cells) ต้องการน้ำตาลในความเข้มข้นที่ต่ำกว่า สำหรับในระดับอุตสาหกรรม แม้ว่าซูโครสและกลูโคสจะให้ผลผลิตสูง แต่ก็มีต้นทุนที่สูง จึงไม่นิยมใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก ซึ่งโมลาสจากอ้อยและหัวบีตยังคงเป็นวัสดุตั้งต้นที่ดีและคุ้มค่าในทางเศรษฐศาสตร์ (Cevrimli et al., 2009; Ikram-UL et al., 2004)

2.13.2 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen Source)

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญทั้งต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริก โดยสารประกอบไนโตรเจนที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ ยูเรีย เปปโตเน สารสกัดจากมอลต์ และเกลียวแอมโมเนียม เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต (Grewal & Kalra, 1995) เนื่องจากไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีน จึงมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างเซลล์และกระบวนการเจริญของเชื้อรา (Ali et al., 2002) จากการศึกษาพบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถยับยั้งการผลิตรดอกซากาซึ่งมีผลทำให้ค่าพีเอช ของอาหารเลี้ยง

เชื้อลดลงในระยะเวลาการหมัก หากใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีไนโตรเจนอยู่ในปริมาณมากอยู่แล้ว การเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมจึงไม่จำเป็น อย่างไรก็ตาม ควรควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจนไม่ให้เกิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากจะส่งเสริมการผลิตรกรดออกซาลิกและลดการผลิตกรดซิตริก (Gupta et al., 1976; Hang et al., 1977) การศึกษาหลายฉบับระบุว่า ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตรกรดซิตริกควรอยู่ในช่วง 0.1–0.4 กรัมต่อลิตร (Kubicek et al., 2016; Soccol et al., 2006) หากมีไนโตรเจนในปริมาณสูง จะเร่งการเจริญของเชื้อราแต่จะลดการผลิตกรดซิตริกในทางตรงกันข้าม เมื่อระดับไนโตรเจนลดลงจนถึงจุดจำกัด (limiting level) จะเป็นจุดเริ่มต้นของการผลิตรกรดซิตริกในกระบวนการหมักแบบอิมเมอร์ชันของเชื้อรา (Ramesh & Kalaiselvam, 2011)

จากงานวิจัยของ Luciana Arantes (2021) พบว่าการเลือกแหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตรกรดซิตริกของ *A. niger* เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน โปรตีน เอนไซม์ และสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ซึ่งทั้งหมดมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเผาผลาญและเส้นทางการผลิตรกรดซิตริก (Papagianni, 2007; Karaffa & Kubicek, 2003) เชื้อราสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate), โซเดียมไนเตรต (sodium nitrate), ยูเรีย (urea), กรดอะมิโน และสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนสูงอย่าง peptone และ yeast extract การเลือกชนิดไนโตรเจนมีผลต่อความเร็วของการเจริญของเชื้อรา รูปแบบของการเจริญเป็นเส้นใย และการสะสมกรดซิตริก โดยทั่วไป แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ช่วยเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกได้สูงกว่าไนเตรตและยูเรียในสภาวะการหมักแบบ submerged fermentation (SF) (Parapouli et al., 2019)

จากงานวิจัยของ Papagianni (2007) พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญกรดซิตริก เช่น เอนไซม์ phosphofructokinase และ citrate synthase ซึ่งเป็นตัวควบคุมเส้นทาง glycolysis และ TCA cycle การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณที่เหมาะสมสามารถเร่งการสังเคราะห์ ATP และ NADH ทำให้เชื้อรามีพลังงานเพียงพอในการสร้างกรดซิตริกในปริมาณสูง อย่างไรก็ตาม การให้ไนโตรเจนมากเกินไปอาจทำให้เกิดการสะสมของโปรตีนและมวลเซลล์มากเกินไป ส่งผลให้ผลผลิตกรดซิตริกลดลง (Legiša & Matthey, 2007) นอกจากนี้ชนิดของไนโตรเจนแล้ว อัตราส่วน C/N (carbon to nitrogen ratio) ในอาหารเลี้ยงเชื้อก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการสะสมกรดซิตริก การมีอัตราส่วน C/N สูง (เช่น 100:1) จะช่วยให้เชื้อราเข้าสู่ระยะ idiophase ซึ่งเป็นระยะเริ่มสะสมกรดซิตริกได้เร็วขึ้น ในขณะที่อัตราส่วน C/N ต่ำจะกระตุ้นการเจริญเป็น biomass มากกว่าและลดประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริก (Soccol et al., 2006) งานวิจัยโดย

Karaffa และ Kubicek (2003) แสดงให้เห็นว่า *A. niger* มีความสามารถในการปรับตัวต่อแหล่งไนโตรเจนหลายชนิดได้ แต่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมและความสามารถในการเผาผลาญ ทำให้บางสายพันธุ์เหมาะกับการใช้ในโตรเจนอินทรีย์ บางสายพันธุ์ตอบสนองดีกับไนโตรเจนอินทรีย์ โดยเฉพาะ yeast extract และ peptone ที่ให้กรดอะมิโนและวิตามินซึ่งช่วยเสริมการเจริญและเพิ่มผลผลิตกรดซิตริก งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการเลือกแหล่งไนโตรเจนและการปรับอัตราส่วน C/N เป็นกลยุทธ์สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก (Papagianni & Mattey, 2006) นอกจากนี้ปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับไนโตรเจน เช่น pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อและการเติมไนโตรเจนแบบต่อเนื่องหรือเป็นครั้ง ๆ ก็มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก งานวิจัยโดย Parapouli et al. (2019) แสดงให้เห็นว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตแบบเบ็ดเสร็จ หรือป้อนสามารถปรับสมดุลระหว่างการเจริญและการสะสมกรดซิตริกได้อย่างเหมาะสม ทำให้ได้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดและลดการสะสมของมวลเซลล์

2.13.3 แหล่งแมกนีเซียม (Magnesium Source)

แหล่งแมกนีเซียมมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. niger* ผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะสัญญาณวิทยาของเส้นใย (mycelia) โดยทั่วไป $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ เป็นแหล่งที่ให้แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งนอกจากจะช่วยในการเจริญของเส้นใย *A. niger* แล้ว ยังช่วยลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของเหล็กไอออน Fe^{2+} ได้อีกด้วย Fe^{2+} มีบทบาทในการกระตุ้นเอนไซม์ mitochondrial aconitase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนซิเตรต (citrate) เป็นไอโซซิเตรต (isocitrate) ส่งผลให้ปริมาณการสะสมของกรดซิตริกลดลง อย่างไรก็ตาม กิจกรรมดังกล่าวสามารถลดลงได้เมื่อมีการเติมสารจับเหล็ก (iron chelator) เช่น เดสเฟอริออกซามีน (desferrioxamine) นอกจากนี้ เหล็กยังส่งผลทางบวกต่อการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดในวัฏจักรเครบส์ เช่น citrate synthase, isocitrate dehydrogenase และ succinate dehydrogenase อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการเติมสารจับเหล็ก จะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ (Sanjay & Sharma, 1994) ในสถานการณ์เช่นนี้ แมกนีเซียมมีบทบาทสำคัญในการลดผลกระทบจาก Fe^{2+} โดยการสร้างพันธะเชิงซ้อนกับไอออนของ Fe^{2+} ทำให้เกิดการตกตะกอนในระหว่างกระบวนการหมัก (Shoukat et al., 1997) ยังมีรายงานว่าลักษณะของเชื้อรา *A. niger* ในรูปแบบเม็ด (pellets) ที่มีขนาด รูปร่าง และลักษณะสัญญาณวิทยาที่เหมาะสม จะช่วยเพิ่มผลผลิตของกรดซิตริกได้อย่างมีนัยสำคัญ (Sanjay & Sharma, 1994) โดยความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกคือระหว่าง 0.02–0.025% (Kappoor et al., 1982)

2.13.4 แหล่งฟอสฟอรัส (Phosphorus Source)

ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดนิวคลีอิก ได้แก่ DNA และ RNA ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริก (Max et al., 2010) อย่างไรก็ตาม แม้จะมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต แต่การใช้ฟอสเฟตในความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลต่อการผลิตกรดซิตริกได้ โดยอาจนำไปสู่การผลิตกรดน้ำตาลอื่นๆ เช่น gluconic acid, glucuronic acid และ saccharic acid (Ozdağ & Kurbanoglu, 2019) จากการศึกษาของ Shu & Johnson (1948) พบว่า ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ที่เหมาะสมต่อการหมักควรอยู่ในช่วง 0.5–5 กรัมต่อลิตร ขณะที่งานวิจัยของ Kubicek & Röhr (1977) แสดงให้เห็นว่าการจำกัดปริมาณฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตของกรดซิตริกได้ ทั้งนี้ การควบคุมระดับฟอสเฟตในระดับที่จำกัดยังช่วยลดการสร้างกรดอินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ ซึ่งจะเป็นผลดีต่อกระบวนการผลิตกรดซิตริกในเชิงอุตสาหกรรม

การเลือกแหล่งฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิตริกของ *Aspergillus niger* เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่ใช้ในการสังเคราะห์ ATP, DNA, RNA และสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ซึ่งทั้งหมดมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเผาผลาญและเส้นทางการผลิตกรดซิตริก (Papagianni, 2007; Karaffa & Kubicek, 2003) *A. niger* สามารถใช้แหล่งฟอสฟอรัสทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) โพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) แคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) และฟอสเฟตจากแร่ธาตุ (rock phosphate) การเลือกชนิดฟอสฟอรัสมีผลต่อความเร็วของการเจริญของเชื้อรา รูปแบบของการเจริญเป็นเส้นใย และการสะสมกรดซิตริก โดยทั่วไป แหล่งฟอสฟอรัสอนินทรีย์ เช่น KH_2PO_4 พบว่าช่วยเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกได้สูงกว่าแคลเซียมฟอสเฟตและฟอสเฟตจากแร่ธาตุในสภาวะการหมักแบบ submerged fermentation (SF) (Parapouli et al., 2019)

จากงานวิจัยของ Papagianni (2007) พบว่าแหล่งฟอสฟอรัสมีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญกรดซิตริก เช่น เอนไซม์ phosphofructokinase และ citrate synthase ซึ่งเป็นตัวควบคุมเส้นทาง glycolysis และ TCA cycle การใช้ KH_2PO_4 ในปริมาณที่เหมาะสมสามารถเร่งการสังเคราะห์ ATP และ NADH ทำให้ *A. niger* มีพลังงานเพียงพอในการสร้างกรดซิตริกในปริมาณสูง อย่างไรก็ตาม การให้ฟอสฟอรัสมากเกินไปอาจทำให้เกิดการสะสมของโปรตีนและมวลเซลล์มากเกินไป ส่งผลให้ผลผลิตกรดซิตริกลดลง (Legiša & Matthey, 2007) นอกจากชนิดของฟอสฟอรัสแล้ว อัตราส่วน C/P (carbon to phosphorus ratio) ในอาหารเลี้ยงเชื้อก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการสะสมกรดซิตริก การมีอัตราส่วน C/P สูง (เช่น 100:1) จะช่วยให้เชื้อราเข้าสู่ระยะ

idiophase ซึ่งเป็นระยะเริ่มสะสมกรดซิตริกได้เร็วขึ้น ในขณะที่อัตราส่วน C/P ต่ำจะกระตุ้นการเจริญเป็นมวลเซลล์มากกว่าและลดประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริก (Soccol et al., 2006)

2.13.5 ธาตุรอง (Trace Elements)

ธาตุโลหะหนักและธาตุรอง เช่น ทองแดง (Cu) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) และเหล็ก (Fe) เป็นองค์ประกอบที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการหมักและการผลิตกรดซิตริก โดยจะต้องมีอยู่ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อส่งเสริมการเจริญของ *A. niger* (Mattey, 1992; Shu & Johnson, 1948) แมงกานีสถือเป็นธาตุรองที่ใช้ในปริมาณน้อยมาก โดยมีระดับที่เหมาะสมไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อลิตร ($\mu\text{g/L}$) ซึ่งมีผลต่อการสร้างสปอร์และการทำงานของตัวขนส่งสารในเซลล์ (Shu & Johnson, 1948; Tomlinson & Campbell, 1950) อย่างไรก็ตาม Mattey & Bowes (1978) รายงานว่าการเติม Mn^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) จะทำให้อัตราการผลิตกรดซิตริกลดลงถึงครึ่งหนึ่ง Tomlinson et al. (1950) แสดงให้เห็นว่าค่าที่เหมาะสมของ Fe และ Zn คือ 1.3 และ 0.3 ppm ตามลำดับ Rohr (1983) พบว่า Cu^{2+} สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ Fe^{2+} ได้ที่ระดับสูงสุด ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตของกรดซิตริกในวัฏจักรเครบส์ นอกจากนี้ ความเข้มข้นของ Cu^{2+} ที่สูงยังสามารถยับยั้งผลกระทบที่เป็นอันตรายของ Fe^{2+} ได้อีกด้วย Benuzzi และ Segovia (1996) ยังได้เน้นย้ำว่า ความเข้มข้นของ Cu ที่เหมาะสมมีความสำคัญต่อการสร้างโครงสร้างของเส้นใยเชื้อรา ซึ่งมีผลต่อสรีรวิทยาของเซลล์ และเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริกอย่างมีนัยสำคัญ

2.13.6 ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ (Alcohols Concentration)

อัตราการผลิตกรดซิตริกสามารถเพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการเติมแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากแอลกอฮอล์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งส่งผลให้ การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane permeability) เพิ่มขึ้น ส่งเสริมให้กระบวนการเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดซิตริกมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น (Moyer, 1953) จากรายงานของ Ingrain และ Buttke (1984) พบว่า การเติมแอลกอฮอล์ส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และกระบวนการสร้างสปอร์ โดยผ่านกลไกการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane lipid composition) ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตของกรดซิตริกได้ ในทำนองเดียวกัน Moyer (1953) พบว่าการเติมเอทานอลสามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์

aconitase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการเปลี่ยนซิเตรตเป็นไอโซซิเตรตในวัฏจักรเครบส์ ขณะเดียวกันกลับเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ citrate synthase ถึง 2 เท่า ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของกรดซิตริก ในแง่ของความเข้มข้น พบว่า การเติมแอลกอฮอล์ในช่วง 1–5 เปอร์เซ็นต์ สามารถช่วยลดผลกระทบเชิงลบของโลหะไอออน (Mn^{2+} , Fe^{2+}) ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลยับยั้งการผลิตกรดซิตริกได้ (Moyer, 1953) ทั้งนี้ El-Gamal et al. (2018) รายงานว่าความเข้มข้นของเมทานอลที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นค่าที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตของกรดซิตริกเมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Candida parapsilosis* NH-3 ในกระบวนการหมัก

พารามิเตอร์เชิงกระบวนการ (Operational Parameters)

การผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมได้รับอิทธิพลอย่างมากจากปัจจัยด้านกระบวนการ (operational parameters) โดยเฉพาะ ค่า pH อุณหภูมิ และ อัตราการเติมอากาศ (aeration) ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ รวมถึงการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle)

2.13.7 ค่า pH

ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญทั้งในช่วงเริ่มต้นและช่วงสิ้นสุดของกระบวนการหมัก เนื่องจากมีผลต่อการเจริญและการทำงานของระบบเมตาบอลิซึมในจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดซิตริก เช่น *A. niger* เอนไซม์สำคัญอย่าง aconitase, citrate synthase และ isocitrate dehydrogenase จะแสดงกิจกรรมสูงสุดในช่วงค่า pH ที่เหมาะสม กระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เนื่องจากการปลดปล่อยกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก ซึ่งส่งผลให้ค่า pH ลดลงอย่างต่อเนื่อง ในระยะเริ่มต้นของการหมัก ควรปรับค่า pH ให้อยู่เหนือ 5.0 เพื่อเอื้อต่อการงอกของสปอร์ของ *A. niger* จากนั้นจุลินทรีย์จะใช้แอมโมเนียในอาหารเลี้ยงเชื้อ และปล่อยโปรตอนออกมา ส่งผลให้เกิดการผลิตกรดซิตริกในปริมาณสูง (Takatsuji & Yoshida, 1998; Berry et al. 1977) รายงานว่าค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอนคือ 6.0–7.5 ในขณะที่การใช้โมลาสจากหัวบีตควรมี pH อยู่ที่ประมาณ 3.0 เพื่อให้เหมาะสมกับการหมัก (Roukas & Alichanidis, 1991) และในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลผลิต ควรควบคุมค่า pH ให้น้อยกว่า 2.0 เพื่อยับยั้งการผลิผลพลอยได้ เช่น กรดออกซาลิกและกรดกลูโคนิก ซึ่งเอื้อต่อการสกัดกรดซิตริกให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น (Max et al., 2010)

ค่า pH เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริกจากการหมักโดย *Aspergillus niger* และจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรมชีวภาพ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดซิตริก และการสะสมของผลิตภัณฑ์ที่ได้ การควบคุมค่า pH อย่างเหมาะสมสามารถเพิ่มผลผลิตและความบริสุทธิ์ของกรดซิตริกได้อย่างมาก ในกระบวนการหมัก ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมักปรับให้อยู่ในช่วง 2.0–3.5 ซึ่งถือว่าเป็นสภาวะเหมาะสม (Papagianni, 2007) เนื่องจากในสภาวะ pH ต่ำ การสร้างกรดซิตริกจะมีประสิทธิภาพสูงสุด เพราะเอนไซม์ citrate synthase จะทำงานได้ดีและยับยั้งการสร้างกรดอื่น ๆ เช่น กรดกลูโคนิกหรือออกซาลิก นอกจากนี้ ค่า pH ต่ำยังช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่พึงประสงค์ เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตในสภาวะเป็นกรดได้ดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ค่า pH มีผลต่อ เมตาบอลิซึมของคาร์บอน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการ Krebs cycle ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสะสมของกรดซิตริก การปรับค่า pH ให้เหมาะสมจะช่วยเพิ่มความเข้มข้นของ citric acid ในของเหลวหมัก ในทางตรงข้าม หากค่า pH สูงเกินไป (มากกว่า 4.0) การสะสมกรดซิตริกจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และมีการสร้างกรดอื่น ๆ เช่น กรด oxalic หรือ gluconic ซึ่งทำให้ผลผลิตลดลงและเกิดปัญหาต่อกระบวนการเก็บเกี่ยว การควบคุมค่า pH สามารถทำได้โดยการ เติมสารละลายกรดหรือเบส ในระหว่างการหมัก เช่น การเติมกรดซิตริกหรือกรดกำมะถันเพื่อปรับ pH ให้คงที่ หรือการเติม แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) เพื่อป้องกันการลดลงของ pH มากเกินไป (Soccol et al., 2006) การควบคุม pH อย่างต่อเนื่อง (pH-stat) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด

ในเชิงปฏิบัติ ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถควบคุมได้ทั้งแบบเบ็ดเสร็จ adjustment และ continuous adjustment ใน batch adjustment การปรับค่า pH จะทำเพียงครั้งเดียวก่อนหรือระหว่างเริ่มกระบวนการหมัก ส่วน continuous adjustment จะใช้ระบบควบคุมอัตโนมัติ เช่น การเติมกรดซิตริกเข้าหรือเบส เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อรักษาค่า pH ให้คงที่ตลอดกระบวนการหมัก การใช้วิธี continuous adjustment จะช่วยลดความผันผวนของ pH ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการสะสมกรดซิตริกและลดการผลิตของกรดรอง (Fang et al., 2011; Pandey et al., 2020) การวิจัยล่าสุดยังชี้ให้เห็นว่า ค่า pH ส่งผลต่อความสัมพันธ์เชิงโมเลกุลของเอนไซม์และตัวกลางหมัก โดยค่า pH ที่เหมาะสมจะทำให้โปรตีนและเอนไซม์คงสภาพโครงสร้างสามมิติได้ดี ทำให้การเร่งปฏิกิริยาเคมีเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยของ Rodrigues et al. (2019) พบว่าการควบคุมค่า pH ที่เหมาะสมสามารถเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกได้มากกว่า 20–

30% เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH ไม่เหมาะสม นอกจากผลต่อเอนไซม์และจุลินทรีย์ ค่า pH ยังมีผลต่อ การตกผลึกและการฟุ้งฟูกรดซิตริก หลังการหมัก การฟุ้งฟูกรดซิตริกโดยใช้เทคนิค ตกตะกอน (Precipitation) เช่น การเติมปูนขาว (Ca(OH)_2) ต้องอาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เหมาะสมเพื่อให้ชีเตรตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ การตั้งค่า pH สูงหรือต่ำเกินไปอาจทำให้ ประสิทธิภาพการตกตะกอนลดลงและเพิ่มการปนเปื้อนของสารอื่น ๆ ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Sun et al., 2017; Widiassa et al., 2004)

2.13.8 อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิเป็นอีกหนึ่งพารามิเตอร์ที่สำคัญในการผลิตกรดซิตริก เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรเครบส์ เช่น aconitase, acetyl-CoA และ coenzyme A ซึ่งล้วนเป็นเอนไซม์ที่มีความไวต่ออุณหภูมิ เนื่องจากเป็นโปรตีน เมื่ออุณหภูมิสูงเกินจุดที่เหมาะสม เอนไซม์จะเสื่อมสภาพหรือสูญเสียการทำงาน (Prescott & Dunn, 1959) Prescott et al. พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. niger* อยู่ในช่วง 25–30°C ซึ่งให้ทั้งอัตราการผลิตที่เร็วและผลผลิตของกรดซิตริกในระดับสูง หากอุณหภูมิเกินกว่าช่วงดังกล่าว จะเพิ่มการผลิตกรดออกซาลิก ในขณะที่อุณหภูมิต่ำเกินไปจะทำให้การเจริญของจุลินทรีย์ช้าลง (Prescott & Dunn, 1959) ทั้งนี้ การควบคุมอุณหภูมิทำได้ง่ายกว่าในกระบวนการหมักในอาหารเหลว (เมื่อเทียบกับการหมักในสภาพของแข็ง (Kappoor et al., 1982) อุณหภูมิเป็นหนึ่งในตัวแปรสำคัญที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตกรดซิตริกในกระบวนการหมัก อุณหภูมิที่เหมาะสมช่วยเพิ่มอัตราการสังเคราะห์เอนไซม์และการทำงานของระบบเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์หลักที่ใช้ในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม (Kirk et al., 2002; Razzaghi et al., 2015)

กรดซิตริกเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมแบบแอแนพลีโรติก (Anaplerotic Reactions) และวงจรเครบส์ (Krebs Cycle) ของจุลินทรีย์ อุณหภูมิมีผลต่อความเร็วปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น แอคโนเนส (Aconitase) และไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate Dehydrogenase) ซึ่งเป็นตัวควบคุมการสะสมของกรดซิตริก หากอุณหภูมิต่ำเกินไป จะทำให้เอนไซม์ทำงานช้าลงและอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลง ส่งผลให้ผลผลิตกรดซิตริกต่ำกว่าที่คาดการณ์ (Dhillon et al., 2011) ในทางตรงกันข้าม หากอุณหภูมิสูงเกินไป จะทำให้โปรตีนและเอนไซม์เกิดการ denaturation หรือสูญเสียโครงสร้างสามมิติ ส่งผลให้จุลินทรีย์ตายหรือหยุดการสังเคราะห์กรดซิตริกอย่างมีประสิทธิภาพ (Papagianni, 2007) งานวิจัยหลายชิ้นชี้ให้เห็นว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักกรดซิตริกอยู่ระหว่าง 28–32°C โดยเฉพาะ 30°C ถือเป็นอุณหภูมิเชิงมาตรฐานที่ใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถรักษาความสมดุลระหว่างอัตราการเจริญเติบโต

ของจุลินทรีย์และอัตราการสะสมกรดซิตริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ อุณหภูมิยังมีผลต่อ รูปร่างและสภาพ morphology ของเส้นใยเชื้อรา (Hyphal morphology) ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการดูดซับน้ำตาลและสารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้การผลิตกรดซิตริกสูงสุดต้องควบคุมอุณหภูมิให้สอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Vijayalakshmi & Palaniappan, 2015)

นอกจากผลต่อจุลินทรีย์และเอนไซม์แล้ว อุณหภูมิยังส่งผลต่อ การละลายออกซิเจนและการกวนของอาหารเลี้ยงเชื้อ การหมักในระบบ submerged fermentation ต้องมีการเติมอากาศและการกวนเพื่อเพิ่มการละลายออกซิเจนสูงสุด การที่อุณหภูมิสูงเกินไปอาจลดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ทำให้จุลินทรีย์ได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอและลดประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริก ในขณะที่อุณหภูมิต่ำเกินไปอาจทำให้ความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ทำให้การกวนและการกระจายตัวของออกซิเจนไม่ทั่วถึง (Karaffa & Kubicek, 2003; Contreras et al., 2018) นอกจากนี้ อุณหภูมิยังมีความสัมพันธ์ กับ ปริมาณและความเข้มข้นของสารอาหาร เช่น น้ำตาลและแร่ธาตุ การศึกษาโดย Singh et al. (2019) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซึมกลูโคสและลดการเกิด by-products เช่น กรดกลูโคนิก ทำให้เพิ่มผลผลิตกรดซิตริกบริสุทธิ์สูงสุด การปรับอุณหภูมิอย่างละเอียดร่วมกับการควบคุมค่า pH และอัตราเติมสารอาหาร จึงเป็นกลยุทธ์สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักในระดับอุตสาหกรรม การควบคุมอุณหภูมิสามารถทำได้หลายวิธีในระบบอุตสาหกรรม เช่น การใช้ เครื่องแลกเปลี่ยนความร้อน (Heat Exchangers) ระบบระบายความร้อนด้วยน้ำ (Cooling Jackets) และ ระบบตรวจวัดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Automated Temperature Controllers) ซึ่งสามารถปรับอุณหภูมิให้คงที่ในช่วงที่เหมาะสมตลอดกระบวนการหมัก งานวิจัยโดย Contreras et al. (2018) แสดงให้เห็นว่าการรักษาอุณหภูมิคงที่สามารถเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกได้ถึง 25–30% เมื่อเทียบกับการหมักที่มีอุณหภูมิผันผวน

2.13.9 การเติมอากาศ (Aeration)

การผลิตกรดซิตริกเกิดขึ้นในสภาวะแอโรบิก (aerobic fermentation) ดังนั้น ออกซิเจนจึงเป็นองค์ประกอบที่ขาดไม่ได้ในกระบวนการหมัก โดยมีผลอย่างมากต่อทั้งอัตราการผลิตและผลผลิตรวมของกรดซิตริก (Soccol et al., 2006) ประสิทธิภาพของการผลิตขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยต้องมีปริมาณออกซิเจนละลายไม่ต่ำกว่า 25% ของค่าความอิ่มตัว เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด ค่าออกซิเจนขั้นต่ำ (threshold oxygen) ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตอยู่ที่ประมาณ 9–12% และ 12–13% ตามลำดับ (Grewal & Kalra, 1995) ในระหว่างช่วงการผลิต ควรใช้เชื้อ *A. niger* ในรูปแบบเม็ดที่มีลักษณะกะทัดรัดและหนาแน่น เพื่อ

ช่วยคงระดับออกซิเจนในระบบ เนื่องจากเมื่อเชื้อราเปลี่ยนรูปร่างเป็นเส้นใย (filamentous) จะทำให้ระดับออกซิเจนในระบบลดลงอย่างรวดเร็วถึงครึ่งหนึ่ง (Soccol et al., 2006)

หลักการของการเติมอากาศในการหมักนั้นเกี่ยวข้องกับ การละลายออกซิเจนในของเหลว (Dissolved Oxygen, DO) และการสร้าง Gradient ของออกซิเจน ภายในถังหมัก การละลายออกซิเจนมีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์กรดซิตริก เนื่องจากเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับวงจรเครบส์ (Krebs Cycle) ต้องการออกซิเจนในการทำงาน เช่น ซิเตรตซินเทตส (Citrate Synthase) และไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate Dehydrogenase) การขาดออกซิเจนจะทำให้เกิดการเปลี่ยนเส้นทางเมแทบอลิซึมไปยัง by-products เช่น กรดแลกติกหรือกรดกลูโคนิก ส่งผลให้ผลผลิตกรดซิตริกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Hossain et al., 2013)

ในเชิงเทคนิค อัตราการเติมอากาศ (Aeration Rate) มักวัดเป็นปริมาตรอากาศต่อน้ำหมักต่อนาที (vvm – volume of air per volume of medium per minute) การปรับอัตราการเติมอากาศให้เหมาะสมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด งานวิจัยโดย Xie et al. (2016) แสดงให้เห็นว่าการใช้ Aeration Rate ประมาณ 1.0–1.5 vvm สามารถเพิ่มปริมาณ DO ให้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของ *A. niger* และทำให้ผลผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นถึง 15–20% เมื่อเทียบกับการเติมอากาศน้อยเกินไป นอกจากปริมาณอากาศแล้ว อัตราการกวน (Agitation Rate) ในถังหมักก็มีบทบาทสำคัญต่อการกระจายออกซิเจน การกวนช่วยเพิ่มการสัมผัสระหว่างฟองอากาศและน้ำหมัก ทำให้การละลายออกซิเจนดีขึ้นและลดการเกิด Dead Zone ที่มีออกซิเจนต่ำ การผสมผสานระหว่างการเติมอากาศและการกวนอย่างเหมาะสมจึงเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในการเพิ่มผลผลิตและความสม่ำเสมอของกรดซิตริกในระบบ submerged fermentation (Soccol & Vandenberghe, 2003)

ในงานวิจัยล่าสุด การเติมอากาศยังถูกใช้ร่วมกับ การควบคุมค่า pH และอุณหภูมิอัตโนมัติ เพื่อสร้างสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการสังเคราะห์กรดซิตริกอย่างต่อเนื่อง การควบคุม Aeration Rate อย่างละเอียดยังช่วยลดการเกิดฟองอากาศที่มากเกินไป ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาการฟองแตก (Foaming) และลดประสิทธิภาพการผลิต (Kowalska et al., 2017) นอกจากนี้ การเติมอากาศยังมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยเชื้อราที่มีการกระจายตัวดีและมีโครงสร้างเป็น Pellet ขนาดเหมาะสมสามารถเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสและการดูดซับสารอาหารได้สูง ทำให้การผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยของ Rodrigues et al. (2020) พบว่า Pellet ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2–3 มม. ภายใต้สภาวะ aeration และ agitation ที่เหมาะสมสามารถเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกได้มากกว่า 25% เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เชื้อรากระจายตัวแบบ Filamentous นอกจากนี้ควรควบคุมอัตราการเติมอากาศใน

ระยะเริ่มต้นของกระบวนการให้ต่ำ เพื่อลดการเกิดฟองในระบบ (Vandenbergh et al., 1999) อย่างไรก็ตาม การเติมอากาศในอัตราที่สูงมากเกินไปจะสร้างความดันบางส่วนของคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของเชื้อ *A. niger* เนื่องจาก CO₂ มีความจำเป็นในการรักษาสมดุลของออกซิเจนในระบบหมัก การควบคุมระดับ CO₂ อย่างเหมาะสมจึงมีผลทางบวกต่อการผลิตกรดซิตริก (Vandenbergh, 2000)

2.14 การเก็บเกี่ยวกรดซิตริก (Recovery of citric acid)

ในการผลิตกรดซิตริก เชื้ออุตสาหกรรม กระบวนการหลังการผลิต (downstream) คิดเป็น 30-40% ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด (Straathof, 2011) การแยกกรดซิตริกจากสารละลายหมักตามวิธีดั้งเดิมจะทำได้โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแคลเซียม ตามด้วยการเก็บเกี่ยวด้วยกรดซัลฟูริก ซึ่งกระบวนการนี้ต้องใช้หลายขั้นตอนและแรงงานจำนวนมาก รวมทั้งสารเคมีในปริมาณมากและก่อให้เกิดของเสียในปริมาณสูงที่ต้องกำจัด ซึ่งทำให้ต้นทุนด้านสิ่งแวดล้อมคิดเป็นสูงถึง 85% ของต้นทุนรวม (Harrison, et al., 2015) ด้วยเหตุนี้ จึงมีความพยายามในการพัฒนาเทคนิคการแยกกรดซิตริกที่มีความยั่งยืนมากขึ้น บทความนี้จะนำเสนอการทบทวนความก้าวหน้าในการเก็บเกี่ยวและทำให้กรดซิตริกบริสุทธิ์ การเก็บเกี่ยวกรดซิตริกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการผลิตเชื้ออุตสาหกรรม เนื่องจากหลังจากการหมักกรดซิตริกในอาหารเหลว หรือการหมักในอาหารแข็ง อาหารเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วยกรดซิตริกในรูปละลายอยู่ในน้ำ (aqueous solution) พร้อมกับจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ สารอาหารที่ยังเหลือ และสารประกอบรอง (by-products) เช่น กรดกลูโคนิก น้ำตาล และโปรตีน การเก็บเกี่ยวกรดซิตริกจึงเป็นการแยกกรดซิตริกบริสุทธิ์ออกจากของเหลวหมักอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้เหมาะสำหรับการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเคมี (Dhillon et al., 2011; Papagianni, 2007) วิธีการตกตะกอนด้วยปูนขาวเป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยการเติมปูนขาว (Ca(OH)₂) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดซิตริกอยู่ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยากับกรดซิตริกและทำให้เกิดเกลือแคลเซียมซิเตรต (calcium citrate) ซึ่งไม่ละลายในน้ำ จากนั้นสามารถกรองแยกซิเตรตออกจากของเหลวได้ (Handojo et al., 2019) สารตกค้างคือ แคลเซียมซัลเฟต (Gypsum) ซึ่งสามารถแยกออกได้โดยการกรองอีกครั้ง กระบวนการนี้ช่วยให้ได้กรดซิตริกบริสุทธิ์ประมาณ 90–95% และสามารถปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์โดยการทำซ้ำกระบวนการตกตะกอนหลายครั้ง

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีที่ใช้สารละลายอินทรีย์เพื่อแยกกรดซิตริกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีความสามารถในการละลายกรดซิตริกสูง เช่น อีเทอร์ หรืออะซิโตน หลังจากนั้นสามารถนำกรดซิตริกที่สกัดได้มาผ่านกระบวนการกลั่นหรือการตกผลึกเพื่อให้ได้กรด

ชิตริกบริสุทธ์ (Mahato et al., 2019) การแลกเปลี่ยนไอออนเป็นวิธีที่ใช้เรซิน (resin) ที่มีคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนไอออน เพื่อดักจับกรดชิตริกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกรดชิตริกที่จับอยู่กับเรซินจะปล่อยออกโดยใช้สารละลายกรดหรือเบส ทำให้ได้กรดชิตริกบริสุทธ์ (Li et al., 2016)

2.14.1 ขั้นตอนแรกของการเก็บเกี่ยวกรดชิตริก

ในการเก็บเกี่ยวกรดชิตริก (CA) โดยการหมักในอาหารเหลว SF หลังจากระบายของเหลวออกจากถาดแล้วไมซีเลียมจะล้างด้วยน้ำเพื่อสกัดกรดที่ค้างอยู่ ในการหมักในสถานะของแข็ง SSF การเก็บเกี่ยวเริ่มต้นด้วยการสกัดกรดที่เกาะติดกับวัสดุแข็งโดยใช้น้ำร้อนใน SmF กรดชิตริกจะละลายอยู่ในน้ำหมักแล้ว ดังนั้นขั้นตอนการละลายจึงไม่จำเป็น อย่างไรก็ตาม น้ำหมักสามารถอุ่นเพื่อกระตุ้นให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนบางส่วน ซึ่งช่วยอำนวยความสะดวกในการกำจัดไมซีเลียในขั้นตอนถัดไป การกำจัดชีวมวลออกจากสารละลายในน้ำหมักทำได้โดยการปั่นเหวี่ยงหรือการกรอง จากนั้นสามารถใช้กระบวนการต่าง ๆ เพื่อแยกและทำให้กรดชิตริกบริสุทธ์ (Berovic & Legisa, 2007; Ruiz-Caldas et al., 2023) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจมในอุตสาหกรรมโดยใช้ *A. niger* ความเข้มข้นของกรดชิตริกในน้ำหมักจะอยู่ที่ประมาณ 150 กรัม/ลิตร และมี pH ต่ำที่ 2 (ตารางที่ 2) (Max et al., 2010) การมีอยู่ของสารประกอบอื่นๆ จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของคาร์บอน ไนโตรเจน แร่ธาตุและสารประกอบหรือส่วนประกอบของตัวกลางอื่นๆ ที่เติมลงในน้ำหมัก วัสดุของเสียจากการเกษตรและอุตสาหกรรมอาหารมีอยู่ทั่วไปและการใช้วัสดุเหล่านี้ในการผลิตกรดชิตริกช่วยลดต้นทุน ซึ่งเป็นเหตุผลว่าทำไมมันถึงใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการหมัก (Amato et al., 2020; Show et al., 2015) อย่างไรก็ตาม วัสดุเหล่านี้มีความซับซ้อนและประกอบไปด้วยส่วนประกอบหลายชนิด ซึ่งต้องการการแยกหลังการหมัก ส่งผลให้เกิดกระบวนการที่ซับซ้อนในขั้นตอนหลังการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์สูง (Hu et al., 2017; Pais et al., 2016) น้ำตาลที่เหลือ โปรตีน และเกลืออนินทรีย์เป็นส่วนประกอบหลักของน้ำซุพหมักที่จำเป็นต้องแยก (Wu et al., 2009) การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นเทคนิคที่ใช้ ความแตกต่างในการละลายของสาร เพื่อแยกกรดชิตริกออกจากของเหลวหมัก ขั้นแรกคือการเลือกตัวทำละลายที่มีความสามารถละลายกรดชิตริกสูง เช่น อีเทอร์ อะซิโตน หรือแอลกอฮอล์บางชนิด หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้เข้าสู่กระบวนการ การแยกแบบ countercurrent extraction เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการฟื้นฟู หลักการทำงานคือตัวทำละลายจะทำปฏิกิริยากับกรดชิตริกในของเหลวหมัก ทำให้กรดชิตริกดึงเข้าสู่ชั้นตัวทำละลาย ส่วนของเหลวที่เหลือจะถูกนำกลับไปหมักใหม่หรือทำการบำบัดต่อ หลังจากสกัดแล้ว กรดชิตริกในตัวทำละลายจะต้องผ่านขั้นตอน distillation หรือ crystallization เพื่อนำตัวทำละลายออกและให้กรด ชิตริกบริสุทธ์ วิธีนี้

มีข้อดีคือสามารถฟื้นฟูกรดซิตริกในความเข้มข้นสูงและลดการปนเปื้อน แต่ข้อเสียคือใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก ต้องควบคุมความปลอดภัยและการจัดการของเสียอย่างเหมาะสม (Mahato et al., 2019)

2.14.2 การตกตะกอน (Precipitation)

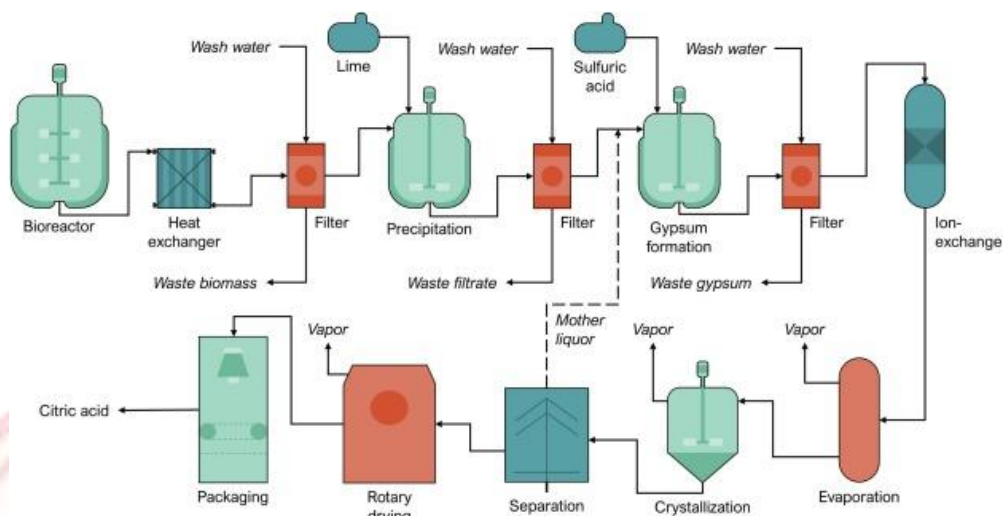
เทคนิคการตกตะกอนแบบดั้งเดิมยังคงเป็นหนึ่งในวิธีการฟื้นฟูกรดซิตริก (CA) ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิต (Sun, et al., 2017; Widiasa, et al., 2004) เทคนิคนี้ (ภาพที่ 11) ประกอบด้วยการใช้ปูนขาวที่อุณหภูมิสูง (85 ถึง 90 °C) เพื่อให้กรดซิตริกในน้ำหมักตกตะกอนในรูปของซิเตรต (แคลเซียม โพแทสเซียม หรือโซเดียม) จากนั้นซิเตรตที่ไม่ละลายน้ำจะถูกแยกออกจากของเหลวด้วยการกรองและล้างหลายครั้งเพื่อกำจัดสิ่งเจือปน เช่น น้ำตาลและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อการหมักอื่นๆ จากนั้นจึงทำการบำบัดสารแขวนลอยในน้ำด้วยกรดซัลฟิวริก เพื่อแยกกรดซิตริกออกจากแคลเซียมซัลเฟตโดยขั้นตอนการกรองใหม่ (López-Garzón & Straathof, 2014) Sun, et al., 2017) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น จำเป็นต้องมีขั้นตอนเพิ่มเติม เช่น การดูดซับด้วยเรซินและถ่านกัมมันต์ การระเหย การตกผลึก และการอบแห้ง (Li et al., 2016; Max et al., 2010)

การตกตะกอนถือเป็นหนึ่งในเทคนิคดั้งเดิมและมีการใช้แพร่หลายที่สุดในการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก จากน้ำหมักในอุตสาหกรรมการผลิต กรดซิตริกที่ได้จากกระบวนการหมักโดยเชื้อรา *A. niger* หรือยีสต์มักมีความเข้มข้นต่ำและปนเปื้อนด้วยโปรตีน สารอินทรีย์อื่น ๆ รวมถึงน้ำตาลและแร่ธาตุต่าง ๆ การตกตะกอนจึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการแยกกรดซิตริกออกจากของเหลวหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงและเหมาะสมต่อการใช้งานเชิงพาณิชย์ (Sun et al., 2017; Widiasa et al., 2004)

หลักการของการตกตะกอนขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างกรดซิตริกกับไอออนโลหะที่สามารถสร้างเกลือที่ไม่ละลายน้ำได้ เช่น แคลเซียม (Ca^{2+}) โพแทสเซียม (K^+) หรือโซเดียม (Na^+) ในกระบวนการผลิตอุตสาหกรรม ปูนขาว ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) มักใช้เป็นตัวกลางเพื่อให้กรดซิตริกตกตะกอนเป็นแคลเซียมซิเตรต โดยทั่วไปกระบวนการจะดำเนินการที่อุณหภูมิสูงประมาณ 85–90 °C เพื่อเร่งปฏิกิริยาการตกตะกอนและลดความหนืดของน้ำหมัก ทำให้การกระจายตัวของปูนขาวและการรวมตัวของอนุภาคซิเตรตมีประสิทธิภาพสูงสุด (Sun et al., 2017) หลังจากเกิดการตกตะกอน ซิเตรตที่ไม่ละลายน้ำจะแยกออกจากของเหลวโดยการกรอง ซึ่งอาจใช้เครื่องกรองแบบแรงดันหรือเครื่องกรองแรงโน้มถ่วง ขึ้นอยู่กับขนาดและความเข้มข้นของมวลตะกอน การกรองนี้ช่วยแยกอนุภาคของซิเตรตออกจากของเหลวหมักที่ยังมีน้ำตาล โปรตีน และสารอินทรีย์อื่น ๆ ปนอยู่ จากนั้นตะกอนซิเตรตจะ

ล้างหลายครั้งด้วยน้ำบริสุทธิ์เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนเพิ่มเติม เช่น น้ำตาลส่วนเกินหรือเกลือของอาหาร เลี้ยงเชื้อที่ยังคงตกค้าง การล้างอย่างละเอียดนี้มีความสำคัญต่อการเพิ่มความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ และลดการปนเปื้อนที่จะส่งผลต่อคุณภาพของกรดซิตริกเชิงพาณิชย์ (Widiasa et al., 2004) หลังจากการล้าง ตะกอนซีเตรตจะเข้าสู่ขั้นตอนการแปรรูปเพื่อให้ได้กรดซิตริกบริสุทธิ์ ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้วิธีการสกัดกรดซิตริกจากเกลือแคลเซียมซีเตรตด้วยกรดกำมะถัน (H_2SO_4) หรือกรดอื่น ๆ เพื่อสร้าง กรดซิตริกบริสุทธิ์และปูนขาวตกค้างเป็นกากแคลเซียมซัลเฟต กระบวนการนี้ไม่เพียงแต่ช่วยให้ได้กรด ซิตริกบริสุทธิ์สูง (มากกว่า 99%) แต่ยังเป็นวิธีที่มีความเสถียรและคุ้มค่าในเชิงอุตสาหกรรม การ ควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ pH อัตราการกวน และปริมาณปูนขาว มีผลโดยตรงต่อ ประสิทธิภาพการตกตะกอนและคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Sun et al., 2017; Widiasa et al., 2004)

ข้อดีของการตกตะกอนคือการใช้เทคนิคง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องจักรซับซ้อน และสามารถจัดการ ในปริมาณมากได้ เหมาะสำหรับการผลิตเชิงอุตสาหกรรมที่ต้องการมาตรฐานผลิตภัณฑ์สูง อีกทั้ง สามารถรวมกับเทคนิคการฟื้นฟูอื่น ๆ เช่น การตกผลึกหรือการกรองแบบแรงดันสูง เพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพในการฟื้นฟูกรดซิตริกอย่างเต็มที่ ข้อจำกัดของวิธีนี้คือการใช้วัตถุดิบโลหะ (เช่น ปูนขาว) ในปริมาณมาก และต้องจัดการกากแคลเซียมซัลเฟตที่เกิดขึ้นหลังการทำปฏิกิริยา ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ ต้องใช้การวางแผนและการจัดการของเสียที่เหมาะสมเพื่อความยั่งยืนทางอุตสาหกรรม ดังนั้น การ ตกตะกอนยังคงเป็นเทคนิคหลักในการฟื้นฟูกรดซิตริกเชิงอุตสาหกรรม ทั้งในแง่ของความคุ้มค่า การ ทำงานง่าย และความสามารถในการได้กรดซิตริกบริสุทธิ์สูง งานวิจัยหลายชิ้นชี้ให้เห็นว่าการปรับปรุง ขั้นตอน เช่น การควบคุมอุณหภูมิ ปริมาณปูนขาว และอัตราการกวน สามารถเพิ่มผลผลิตและลดของ เสีย รวมถึงปรับปรุงความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Sun et al., 2017; Widiasa et al., 2004)

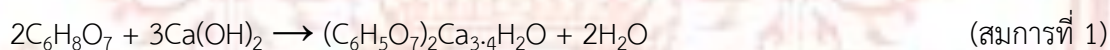


ภาพที่ 11 แผนภาพเชิงสัญลักษณ์สำหรับการเก็บเกี่ยวกรดซิตริกโดยกระบวนการตกตะกอน

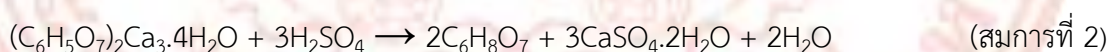
(Saeed, et al., 2020)

ขั้นตอนแรกในการตกตะกอนคือการเปลี่ยน CA (ละลายได้) ให้เป็นแคลเซียมซิเตรต (ไม่ละลายน้ำ)

โดยการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ สมการที่ 1



ในขั้นตอนที่สอง สมการที่ 2 ปฏิกริยาระหว่างกรดซัลฟิวริกกับแคลเซียมซิเตรต (ไม่ละลายน้ำ) ส่งผลให้เกิด CA (ละลายได้) และแคลเซียมซัลเฟต (ไม่ละลายน้ำ)



สำหรับกรดซิตริกที่ประมวลผล 1 กิโลกรัม จะต้องใช้ปูนไฮดรอกไซด์แคลเซียม ($Ca(OH)_2$) 0.58 กิโลกรัม และกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) 0.76 กิโลกรัม ในตอนท้ายจะได้ยิปซัม (แคลเซียมซัลเฟต) 1.3 กิโลกรัมและใช้น้ำประมาณ 18 ลิตร สำหรับลดปริมาณเหล่านี้ จึงจำเป็นต้องใช้วิธีการเก็บเกี่ยวแบบอื่น แม้ว่าจะสามารถบำบัดยิปซัม (แคลเซียมซัลเฟต) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมก่อสร้างได้ แต่ค่าใช้จ่ายในการบำบัดนั้นสูงเกินไปเมื่อเทียบกับมูลค่าผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วยเหตุนี้ ด้วยเหตุนี้ ยิปซัมจึงมักจะทิ้งในหลุมฝังกลบ ซึ่งทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Kristiansen, et al., 1998) ตามที่ (Harrison, et al., 2015) ระบุ สารเคมี เช่น กรดซัลฟิวริกและแคลเซียมซัลเฟต ที่ใช้ในกระบวนการตกตะกอนคิดเป็น 11.4% ของต้นทุนการดำเนินงานทั้งหมดของการผลิตกรดซิตริก นอกจากนี้ การกำจัดยิปซัม (แคลเซียมซัลเฟต) ที่เกิดขึ้นหลังจากการตกตะกอนยังคิดเป็น 85% ของต้นทุนสิ่งแวดล้อม

ปัจจัยในการประมวลผล เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช และเวลาปฏิกิริยา ล้วนส่งผลต่อการตกตะกอน (Heding & Gupta, 1975) ได้ทำการตกตะกอนกรดซิตริกด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตที่ พีเอช 5 และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่าที่อุณหภูมิสูง (80 °C และ 100 °C) จะสามารถเก็บเกี่ยวกรดซิตริกได้เกือบทั้งหมดและปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นทันที อย่างไรก็ตาม ตะกอนที่เกิดขึ้นนั้นกรองได้ยากและมีลักษณะเป็นกลุ่มหลังจากการอบแห้ง ซึ่งทำให้การจัดการในกระบวนการถัดไปยากขึ้น เมื่ออุณหภูมิที่ต่ำกว่า 50 °C พบว่าเวลาในการปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นอย่างมากและอัตราการฟื้นฟูกระบวนการกรดซิตริกลดลง ในทางตรงกันข้าม การตกตะกอนที่อุณหภูมิ 50 °C ใช้เวลาในการปฏิกิริยาประมาณ 20 นาที และฟื้นฟูกระบวนการกรดซิตริกได้เกือบทั้งหมด ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเหมาะสมสำหรับการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนถัดไป การควบคุมอุณหภูมิในกระบวนการตกตะกอนมีความสำคัญเป็นพิเศษ เนื่องจากมันกำหนดลักษณะของชีตเรต ซึ่งจะต้องเกิดการสร้างอนุภาคนาขนาดเล็กในตะกอนที่มีพื้นที่ผิวขนาดใหญ่ที่พร้อมสำหรับปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริก ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกกรดซิตริก (Wang, et al., 2013) ได้เก็บเกี่ยวกรดซิตริกจากน้ำหมักโดยใช้ขั้นตอนการปั่นเหวี่ยง การตกตะกอน (CaCO_3 ที่ 85 °C) การทำละลาย (H_2SO_4 10% v/v) และการตกผลึก (60 และ 80 °C) ผลผลิตจากกระบวนการหลังการผลิตอยู่ที่ 67.2% โดยมีความบริสุทธิ์ของกรดซิตริก 96% สิทธิบัตรของ Bayer Corp และ Tate and Lyle Citric Acid Inc ได้อธิบายกระบวนการตกตะกอนโดยมีเป้าหมายเพื่อลดการเกิดของเสียและต้นทุนการดำเนินงาน รวมถึงเพิ่มผลผลิตและคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Felman et al., 1998) กระบวนการนี้ประกอบด้วยการเติมสารละลายกรดเข้มข้นหรือเกลืออย่างช้าๆ เช่น กรดซัลฟูริก กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ หรือ โซเดียมซัลเฟต ลงในน้ำหมัก กรดซิตริกจะตกผลึกอย่างรวดเร็วในส่วนผสมซึ่งจะถูกคนและค่อยๆ เย็นลงที่อุณหภูมิ 30 °C แล้วกรอง ด้วยกระบวนการนี้ ทำให้สามารถเก็บเกี่ยวกรดซิตริกได้อย่างน้อย 80% และลดสิ่งเจือปนลงได้ 90%

วิธีการตกตะกอนแบบดั้งเดิมต้องการการลงทุนทางการเงินและต้นทุนการดำเนินงานสูงเนื่องจากประเภทและจำนวนของการดำเนินการที่จำเป็นสำหรับการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่ตั้งที่แสดงในภาพที่ 11 การดำเนินการเหล่านี้ต้องใช้แรงงาน สารเคมี พลังงาน น้ำในปริมาณมาก และก่อให้เกิดขยะจำนวนมาก (ทั้งของเหลวและยิปซัม) ที่ต้องได้รับการบำบัดก่อนการกำจัด (Delgado Dobladez et al., 2019; Shishikura et al., 1992; Wang et al., 2020) แม้จะมีข้อเสียหลายประการ แต่เทคนิคนี้ยังคงได้รับการใช้อย่างแพร่หลายในการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก เพราะไม่ต้องการเทคโนโลยีและอุปกรณ์ที่ซับซ้อน และลักษณะของกระบวนการก็เป็นที่ยอมรับกันดี ซึ่งช่วยให้สามารถนำไปใช้และใช้งานได้สะดวกยิ่งขึ้น

2.14.3 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีการที่แตกต่างจากวิธีการตกตะกอนอย่างชัดเจน โดยในกระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลายนั้นจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงสถานะรวมของผลิตภัณฑ์ จึงไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการแยกและการละลายซ้ำ รวมทั้งไม่มีการผลิตยิปซัมเป็นผลพลอยได้ ดังนั้นการสกัดด้วยตัวทำละลายจึงมีจุดเด่นที่สำคัญ คือ มีประสิทธิภาพสูง ใช้ทรัพยากรในปริมาณต่ำ และสามารถดำเนินการได้ทั้งแบบเบ็ดเสร็จและแบบต่อเนื่อง (Cheng et al., 2012; Li, et al., 2016; Wennersten, 1983) แม้ว่าจะมีสารประกอบหลายชนิดที่สามารถใช้เป็นตัวทำละลายในกระบวนการสกัด แต่ตัวทำละลายจะต้องมีคุณสมบัติเฉพาะบางประการที่มีความจำเป็นต่อประสิทธิภาพของกระบวนการ ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเกี่ยวกรดอินทรีย์ควรสามารถสกัดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้มากที่สุดและสารปนเปื้อนน้อยที่สุด ตัวทำละลายแต่ละชนิดมีลักษณะเฉพาะด้วยค่าสัมประสิทธิ์การกระจายสมดุล (distribution coefficient) ซึ่งหมายถึงอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของกรดในสารสกัดต่อความเข้มข้นของกรดในเฟสของเหลวที่มีน้ำในสถานะสมดุล (Kristiansen, et al., 1998; Wennersten, 1983) ตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป เช่น แอลกอฮอล์และคีโตนที่มีสายโซ่ยาว มักมีค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวต่ำเนื่องจากกรดมีแนวโน้มที่จะเกิดความสัมพันธ์กับน้ำได้ดีกว่า อย่างไรก็ตาม ตัวทำละลายบางชนิด เช่น บิวทานอล แม้จะมีค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวสูง แต่สามารถผสมกับน้ำได้ จึงต้องใช้ขั้นตอนการฟื้นฟูตัวทำละลายเพิ่มเติม เมื่อกรดซिटริกมีความเข้มข้นต่ำ เช่น ในของเหลวหมักที่มีกรดซिटริกต่ำกว่าร้อยละ 15 ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวจะขึ้นอยู่กับประเภทของตัวทำละลายอย่างมาก และจำเป็นต้องมีขั้นตอนการเพิ่มความเข้มข้นก่อนการสกัด (Apelblat, 2014; Kristiansen, et al., 1998; Wennersten, 1983) ดังนั้นค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวที่ต่ำจะบ่งชี้ถึงความจำเป็นในการใช้ตัวทำละลายปริมาณมากในการป้อนกลับและการเพิ่มจำนวนขั้นตอนในการแยกกรดซिटริก เนื่องจากประสิทธิภาพการสกัดของเหลวด้วยตัวทำละลายทั่วไปค่อนข้างต่ำ จึงมีการพัฒนาเทคนิคทางเลือกที่สามารถดำเนินการได้อย่างคุ้มค่าในการเก็บเกี่ยวกรดอินทรีย์จากของเหลวหมัก เช่น การสกัดแบบปฏิกิริยา (reactive extraction) (Kristiansen, et al., 1998; Rani, et al., 2010; Thakre et al., 2016) ในการสกัดแบบปฏิกิริยาจะเกิดทั้งปรากฏการณ์ทางเคมี ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างตัวถูกละลายและสารสกัด และปรากฏการณ์ทางกายภาพ ได้แก่ การแพร่และการละลายของสารประกอบที่เกิดขึ้น (Rani, et al., 2010) เทคนิคการสกัดแบบปฏิกิริยาประกอบด้วยสองขั้นตอนหลัก คือ การสกัด (extraction) และการสกัดย้อนกลับ (back-extraction) ในขั้นตอนแรก น้ำหมักจะถูกผสมกับตัวทำละลาย/ตัวเจือจางเพื่อส่งเสริมการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างสารสกัดและกรดคาร์บอกซิลิก และเกิดสารละลายน้ำที่มีความเข้มข้นต่ำของกรดคาร์บอกซิลิก จากนั้นการสกัดคาร์บอกซิเลตที่มีอยู่ในสารเชิงซ้อนอินทรีย์จะดำเนินการไปยังเฟสของเหลว ขณะเดียวกันตัวทำละลายจะได้รับการฟื้นฟูและนำกลับมาใช้ใหม่ในกระบวนการสกัดอีกครั้ง การสกัดย้อนกลับสามารถทำได้โดยใช้วิธีการต่าง ๆ เช่น การเปลี่ยนอุณหภูมิ การปรับพีเอช การเปลี่ยนแปลง

ส่วนประกอบของตัวเจือจาง เป็นต้น (Datta, et al., 2015; Hong, et al., 2001; López-Garzón & Straathof, 2014) การเก็บเกี่ยวตัวทำละลายสามารถทำได้เพราะปฏิกิริยาการสร้างสารเชิงซ้อนเป็นปฏิกิริยาที่สามารถย้อนกลับได้ ควรเลือกตัวทำละลายเพื่อให้ได้สารเชิงซ้อนที่มีความเสถียรพอที่จะเอาชนะความสัมพันธ์ที่ต่ำของสารละลายในเฟสของเหลวที่มีน้ำ แต่ไม่ควรมีความแรงจนทำให้การฟื้นฟูเป็นไปอย่างยากลำบากหรือเป็นไปได้ (Hong, et al., 2001; Magalhães, et al., 2016) ตัวทำละลายต่าง ๆ ที่สามารถใช้ในกระบวนการสกัดแบบปฏิกิริยาสามารถแบ่งออกเป็นสามประเภท ได้แก่ อะมีนที่มีพันธะกับคาร์บอน อะมีนที่มีพันธะกับฟอสฟอรัส และอะลิฟาติกเอมีน ในจำนวนนี้อะลิฟาติกเอมีน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอะมีนในกลุ่มตติยภูมิ มีประสิทธิภาพที่โดดเด่นในการเก็บเกี่ยวกรดซิตริกจากสารละลายน้ำเจือจาง (Daniel & Gonen, 1991; Bizek, et al., 1993; Datta et al., 2015; Verser et al., 2014; Wennersten, 1983)

โดยปกติแล้วจะมีการใช้การผสมผสานของตัวทำละลายหลายชนิด หรือผสมตัวทำละลายกับสารเจือจางเพื่อลดต้นทุนและปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี (Thakre et al., 2016) ตัวอย่างเช่น อะมีนตติยภูมิมีความหนืดสูง มีการกัดกร่อน และมีแรงตึงผิวที่ไม่พึงประสงค์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ไม่เหมาะสมในกระบวนการสกัด ดังนั้นจึงมักใช้ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์อื่น (Hong, et al., 2001) สารเจือจางสามารถแบ่งออกเป็นสองประเภท ได้แก่ สารเจือจางที่ไม่มีปฏิกิริยา (inactive diluents) และสารเจือจางที่มีปฏิกิริยา (active diluents) สารเจือจางที่มีปฏิกิริยาเป็นสารที่มีขั้วและมีกลุ่มฟังก์ชันหลายกลุ่มที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของสารเชิงซ้อนสารสกัด-สารละลาย เช่น ไฮโดรคาร์บอนคลอรีน น้ำมันพืช และเคโรซีน ส่วนสารเจือจางที่ไม่มีปฏิกิริยาจะเป็นสารที่ไม่มีขั้ว เช่น อัลเคน เบนซีน และสารอะโรมาติกที่มีหมู่อัลคิล ซึ่งให้ความสามารถในการละลายสารประกอบในระดับที่ต่ำ (Djas & Henczka, 2018; Thakre et al., 2016) ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด ได้แก่ จำนวนสิ่งเจือปน ความเข้มข้นของกรด ชนิดของตัวทำละลายและสารเจือจางที่ใช้ รวมทั้งคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของระบบ (Araújo, et al., 2017; Rani, et al., 2010) การศึกษาของ Thakre et al. (2016) ได้ประเมินการสกัดแบบปฏิกิริยาของกรดซิตริกจากสารละลายน้ำเจือจาง โดยทดสอบตัวทำละลาย tri-n-butyl phosphate (TBP), tri-n-octylamine (TOA) และ Aliquat 336 (A336) ที่ผสมในตัวเจือจาง 3 ชนิด ได้แก่ บิวทิลอะซิเตท เดคาโนล และเบนซีน ผลการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพการสกัดสูงสุดที่ร้อยละ 95.5 ได้มาจากระบบ TOA ที่ผสมกับบิวทิลอะซิเตทความเข้มข้นร้อยละ 20 (v/v) ซึ่งส่งผลให้มีค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวเท่ากับ 21.25

การสกัดด้วยตัวทำละลายถือเป็นเทคนิคการแยกสารที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยเชิงอุตสาหกรรมและเคมีวิเคราะห์ โดยอาศัยความสามารถของตัวทำละลายอินทรีย์ในการละลายสารเฉพาะเจาะจงจากสารผสม การเลือกตัวทำละลายและการพิจารณาความเข้ากันได้ของสารทั้งในด้าน

ความเป็นขั้ว (Polar) หรือไม่เป็นขั้ว (Non-polar) มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของกระบวนการวิจัยอย่างยิ่ง (Lende et al., 2021)

การเลือกตัวทำละลายเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งในการทำให้กระบวนการสกัดมีประสิทธิภาพ ตัวทำละลายหลายชนิดสารพิษ ซึ่งทำให้ยากต่อการใช้เทคนิคนี้ในสถานะต่างๆ เนื่องจากตัวทำละลายเหล่านี้สามารถยับยั้งเอนไซม์ เปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ และขัดขวางการแพร่กระจายของสารอาหาร (Keshav, et al., 2012) นอกจากนี้ในการใช้งานในอุตสาหกรรม การใช้ตัวทำละลายที่อาจเป็นพิษอาจเพิ่มต้นทุน เนื่องจากจำเป็นต้องมีมาตรการความปลอดภัยในกระบวนการที่สูงขึ้นและต้องกำจัดการอย่างถูกต้องตามหลักสิ่งแวดล้อม (Choi & Verpoorte, 2019) เมื่อมุ่งหวังที่จะได้ กรดซิตริกที่มีคุณภาพสำหรับการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร ตัวเลือกตัวทำละลายจึงมีข้อจำกัดมากขึ้น ในการค้นหาทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้น (Djas, et al., 2016) ได้ศึกษาการสกัดด้วยปฏิกิริยาของสารละลายกรดซิตริกในน้ำโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในสถานะซูเปอร์คริติคัลและ (tri- *n* -octylamine, TOA) สามารถได้รับประสิทธิภาพสูง (96.9%) โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะวิกฤตที่อิ่มตัวด้วย TOA ที่ความดันสูง (16 MPa) และอุณหภูมิต่ำ (35 °C) และสรุปว่าเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการฟื้นฟูกระบวนการกรดอินทรีย์จากสารละลายน้ำ แม้ว่าล่าสุด เทคโนโลยีการสกัดในสถานะซูเปอร์คริติคัลจะแสดงให้เห็นถึงต้นทุนการดำเนินงานที่ลดลงและการใช้อุปกรณ์ที่ลดลง แต่เทคนิคนี้ยังคงจำกัดเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงในเชิงพาณิชย์ (Djas, et al., 2018; Keshav, et al., 2012) ทดสอบการใช้สารเจือจางจากธรรมชาติที่ไม่เป็นพิษชนิดต่างๆ (น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันงา) ร่วมกับเอนติติงกูมิ (tri- *n* -octylamine, TOA) เพื่อเก็บเกี่ยวกรดซิตริกจากสารละลายน้ำ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การกระจายลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการสกัดด้วยปฏิกิริยาโดยใช้ TOA อาจเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการขจัดกรดซิตริกจากสารละลายน้ำที่เจือจาง ผู้เขียนสามารถสกัดได้ในระดับสูงเมื่อใช้ TOA 30% (v/v) กับสารเจือจางเหล่านี้ สารเจือจางมีค่าสัมประสิทธิ์การกระจายมากกว่า 12 โดยสารเจือจางตามลำดับของระดับการสกัดที่ลดลง ได้แก่ น้ำมันรำข้าว (95%) น้ำมันถั่วเหลือง (94%) น้ำมันงา (94%) และน้ำมันดอกทานตะวัน (93%) (Liu, et al., 2020) ได้เสนอวิธีใหม่ในการแยกกรดซิตริกจากน้ำหมักโดยใช้สารสกัดแบบไดอัลคิลอะไมด์ 10 ชนิดที่แตกต่างกันร่วมกับไอโซสเตียริลแอลกอฮอล์เป็นตัวเจือจาง วิธีนี้ได้ศึกษาการใช้ไดอัลคิลอะไมด์เป็นตัวรับพันธะไฮโดรเจนและกรดซิตริกเป็นตัวให้พันธะไฮโดรเจนสำหรับการสร้าง ตัวทำละลายยูเทกติกแบบไฮโดรโฟบิก ในระยะเวลาการสัมผัส 20 นาทีที่อุณหภูมิ 30 °C สามารถสกัดกรดซิตริกได้ถึง 75% ด้วยความบริสุทธิ์ระดับสูง (99.8%) นอกจากนี้ยังสามารถเก็บเกี่ยวตัวทำละลายได้อย่างรวดเร็วและง่ายตายด้วยการ

เพิ่มอุณหภูมิ (75 °C) การใช้ไซเคิลตัวทำละลายทำได้โดยไม่มีการสูญเสียความสามารถอย่างมีนัยสำคัญ ในระยะเวลาอย่างน้อย 5 รอบ

กระบวนการอื่นสำหรับการฟื้นฟูกระบวนการกรดซิตริกโดยใช้การสกัดด้วยปฏิกิริยาอริบาย โดย (Rongjie et al., 2017) วิธีการนี้เสนอให้ผสมสารละลายกรดซิตริก (น้ำหมัก) กับตัวทำละลาย อินทรีย์ จากนั้นจึงทำให้ส่วนผสมระเหยในสุญญากาศเป็นผลให้กรดอินทรีย์เข้มข้นในเฟสอินทรีย์ ในขณะที่เกลืออินทรีย์ส่วนใหญ่และสิ่งเจือปนอื่นๆ ยังคงอยู่ในเฟสน้ำ หลังจากนั้นจะมีการเติมน้ำลงในตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อให้กรดซิตริกกลับเข้าสู่เฟสน้ำอีกครั้งเพื่อให้ได้สารละลายน้ำที่ประกอบด้วย กรดอินทรีย์ ผู้เขียนได้ทำการทดลองกับสารละลายที่มีกรดซิตริก 50% (ตามเปอร์เซ็นต์มวล) ด้วย ส่วนผสมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ประกอบด้วยไตรเอทิลแอมโมเนียม-อีทิลเดคานอลโอคตาเดคานอล และเคโรซีน ผลผลิตของกรดซิตริกและความบริสุทธิ์ได้ถึง 99.0% เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการ ตกตะกอนแบบคลาสสิก การสกัดแบบปฏิกิริยาจะมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่า เนื่องจาก สามารถนำสารเคมีมาใช้ซ้ำได้ ลดการเกิดของเสียที่เป็นของแข็ง ลดการใช้พลังงาน และสามารถนำสารเจือจางจากธรรมชาติที่ไม่เป็นพิษได้ แม้จะเป็นเช่นนั้น เทคนิคนี้ยังคงมีข้อจำกัดในด้าน ต้นทุนของสารสกัดและสารเจือจาง ยังคงมีอีกมากที่ต้องสำรวจ โดยเฉพาะการค้นหาตัวทำละลาย ใหม่ๆ สำหรับการพัฒนาระบวนการที่มีประสิทธิภาพและคุ้มทุนทางเศรษฐกิจ

2.14.4. การดูดซับ

การดูดซับเป็นกระบวนการที่สามารถใช้ได้ในระดับขนาดใหญ่ในการเก็บเกี่ยวและการทำให้ บริสุทธิ์ของไบโอโมเลกุล คุณสมบัติของสารดูดซับที่แตกต่างกันถูกนำมาใช้ประโยชน์โดยความสามารถ มีปฏิสัมพันธ์กับสารประกอบที่สนใจหรือกับสิ่งเจือปนที่มีอยู่ในน้ำหมัก โดยขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทาง เคมี-ฟิสิกส์ เช่น ประจุและความเป็นขั้ว ตัวดูดซับสามารถมีปฏิสัมพันธ์อย่างเข้มข้นกับไบโอโมเลกุลที่ เป็นเป้าหมายและดูดซับมัน จากนั้นสารที่ดูดซับจะถูกปลดปล่อยออกโดยการผ่านสารปลดปล่อย (Eluent) เพื่อให้ได้สารละลายของไบโอโมเลกุลที่มีสิ่งเจือปนเข้มข้นน้อยลง สารดูดซับเป็นวัสดุอนุภาค ของแข็งที่สามารถใช้ในถังที่มีการกวน ปีบอัดในคอลัมน์ หรือใช้ในระบบเตียงเคลื่อนที่ (De Carvalho, et al., 2017) เทคนิคการดูดซับสามารถทำได้ในรูปแบบต่อเนื่องโดยใช้คอลัมน์เตียงคงที่ที่เชื่อมต่อ กับไบโอรีแอคเตอร์ เนื่องจากคอลัมน์บรรจุสารดูดซับไว้จะทำให้การทำงานสะดวกขึ้นและสูญเสียตัว ทำละลายมีน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิคการสกัด อย่างไรก็ตามอาจมีปัญหาเรื่องการอุดตันและอายุ การใช้งานของสารดูดซับที่สั้นลง (López-Garzón & Straathof, 2014) การศึกษาหลายชิ้นระบุถึง การใช้การดูดซับเพื่อการเก็บเกี่ยวกรดซิตริกหลังขั้นตอนการหมักโดยใช้ตัวดูดซับต่างๆ โดยส่วนใหญ่

มักเป็นสารที่สังเคราะห์ด้วยวัสดุโพลีเมอร์ ในกลุ่มของเรซิน ตัวที่มีการแลกเปลี่ยนประจุลบแบบเบสที่เคลือบด้วยเอมีนในระดับตติยภูมิและควอเตอร์นารี หรือไพรีดิน ได้รับความสนใจเนื่องจากความสามารถในการเลือกสรรและความชอบในกรดซิตริก (Dobladez et al., 2019; Gluszc et al., 2004; Kulprathipanja, 1989, 1991; Van den Bergh et al., 2017; Wu et al., 2009) ความสามารถในการดูดซับและการคัดเลือกที่สูงของการดูดซับต่อไปโอโมเลกุลเป้าหมายเป็นปัจจัยสำคัญที่จำเป็นเพื่อให้กระบวนการมีประสิทธิภาพสูงขึ้น นอกจากนี้การสามารถฟื้นฟูได้อย่างง่ายดายด้วยตัวทำละลายที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำและเอทานอล เป็นคุณสมบัติที่พึงประสงค์

Van Den Bergh, et al., 2017 ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเรซินสามชนิด (PVP, IRA-900 และ IRA-67) ในการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก โดยเรซิน PVP มีความสามารถในการดูดซับสูง (0.9 g g^{-1}) และการคัดเลือกสำหรับกรดซิตริกในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ เช่นเดียวกับในสารละลาย pH ปานกลางที่มีซัลเฟต ดังนั้นการใช้เรซิน PVP จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวกรดซิตริกจากน้ำหมัก (pH ต่ำ) อีกการใช้งานหนึ่งคือหลังจากกระบวนการตกตะกอนที่มีสารละลายที่มีซัลเฟตสูงและ pH ปานกลาง เรซิน PVP สามารถสร้างฟื้นฟูได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยเมทานอลหรือเอทานอลที่อุณหภูมิสูง ซึ่งหลีกเลี่ยงการเกิดของเสียที่มีมูลค่าต่ำ ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้กรดหรือเบสในการสร้างใหม่

ในช่วงทศวรรษ 1980 บริษัท UOP ได้ยื่นขอสิทธิบัตรฉบับแรกสำหรับการเก็บเกี่ยวกรดซิตริกจากน้ำหมักด้วยเทคโนโลยีเตียงเคลื่อนที่จำลอง (SMB) ในกระบวนการนี้ ค่า pH ของน้ำหมักจะถูกปรับให้ต่ำกว่าค่าคงที่การแตกตัวของของกรดซิตริกแรก (pK_{a1}) ซึ่งการปรับค่านี้เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อรักษาการคัดเลือกของตัวดูดซับ โดยใช้คีโตนหรือกรดอนินทรีย์ใช้เป็นตัวชะ (Eluent) (Kulprathipanja, 1988, 1989; Wu et al., 2009) เสนอขั้นตอนการเก็บเกี่ยวกรดซิตริกจากน้ำหมักโดยใช้เทคโนโลยี SMB และใช้เรซินโพลี (4-ไวนิลไพรีดิน) ตติยภูมิ (PVP) เป็นเฟสคงที่ (ตัวดูดซับ) ได้ดำเนินการทดสอบในระดับนำร่อง (อัตราการไหลสูงสุดถึง 150 มล./นาที่) และจำลองกระบวนการที่มีความต้องการการแยกสารที่มีความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.8% และอัตราการการฟื้นฟูกระบวนการกรดซิตริกได้มากกว่า 90% ในกระแสการสกัด เมื่อกำหนดพารามิเตอร์ของกระบวนการแล้ว สามารถฟื้นฟูกระบวนการกรดซิตริกได้ 97.2% และผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์ 99.8% โดยความเข้มข้นของกรดซิตริกในสารสกัดลดลงครึ่งหนึ่งจากความเข้มข้นในน้ำหมักที่ผ่านการบำบัดล่วงหน้า กระบวนการ

นี้มีความน่าสนใจในแง่ของสิ่งแวดล้อมเนื่องจากมีของเสียเกิดขึ้นน้อยที่สุด โดยจะมีเพียงน้ำที่เติมเข้าระบบ และน้ำที่เหลือหลังจากการแยกกรดซิตริกสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ในการหมัก

Dobladez, et al., 2018 ได้พัฒนารูปแบบทฤษฎีในการอธิบายการดูดซับและการปลดปล่อยกรดซิตริกจากสารละลาย aqueous (10% w/w) โดยใช้เทคโนโลยี SMB เดียวกันที่มีเรซินเชิงพาณิชย์ (Reillex® 425) เป็นตัวดูดซับและเมทานอลเป็นตัวชะ ความบริสุทธิ์ของ CA สูงกว่า 99% และการฟื้นตัวสูงกว่า 95% พร้อมความสามารถในการดูดซับของเรซินที่ 0.57 g g^{-1} ในการฟื้นฟูกระบวนการกรดซิตริกและเมทานอลจากสารสกัด ได้ออกแบบกระบวนการระเหย-ผลึกที่อุณหภูมิ 60°C ในตอนท้ายของกระบวนการ กระแสที่หมดไป (raffinate) สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยไม่สูญเสียกรดซิตริกในสตรีมน้ำและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ทั้งน้ำและส่วนประกอบที่ละลายในกระบวนการหมัก

การดูดซับถือเป็นหนึ่งในขั้นตอนสำคัญในกระบวนการผลิตกรดซิตริก โดยเฉพาะในส่วนของ การแยกและเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์หลังการหมัก (*product recovery*) กระบวนการนี้มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มความบริสุทธิ์ของกรดซิตริก ลดปริมาณสิ่งเจือปน และเตรียมกรดซิตริกให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการใช้งานเชิงอุตสาหกรรม (Raimbault, 1998; Soccol et al., 2006) หลักการพื้นฐานของการดูดซับอาศัยการดึงดูดระหว่างโมเลกุลของกรดซิตริกกับวัสดุที่มีความสามารถในการดูดซับ เช่น เรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange resins) คาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon) และวัสดุซิลิกาเจล (silica gel) วัสดุเรซินแลกเปลี่ยนไอออนถือเป็นเทคโนโลยีที่นิยมใช้มากที่สุดในอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถแยกกรดซิตริกจากของเหลวหมักได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำกรดซิตริกกลับออกมาได้โดยการล้างด้วยกรดหรือเบสบางชนิด งานวิจัยโดย Stamenković และคณะ (2007) แสดงให้เห็นว่า การเลือกชนิดของเรซินแลกเปลี่ยนไอออน เช่น แบบอนุมูลบวก (cation-exchange) หรืออนุมูลลบ (anion-exchange) มีผลต่อความสามารถในการจับและปลดปล่อยกรดซิตริก โดยเรซินแบบแลกเปลี่ยนแคตไอออนสามารถดูดซับกรดซิตริกในรูปของซิเตรตแอนไอออนได้ดี ในขณะที่การปลดปล่อยกรดสามารถทำได้โดยการปรับ pH ของสารละลายให้เหมาะสม การดูดซับด้วยคาร์บอนกัมมันต์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีการนำมาใช้ โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการกำจัดสีหรือสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่ปนอยู่ในของเหลวหมัก งานวิจัยของ Demain และ Fang (2000) ระบุว่า คาร์บอนกัมมันต์สามารถจับโมเลกุลของกรดซิตริกผ่านแรงดึงดูดแบบฟานเดอร์วาลส์ (van der Waals forces) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) ทำให้สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของกรดซิตริกได้อย่างมี

ประสิทธิภาพ นอกจากนี้ การปรับขนาดอนุภาคของคาร์บอนและการควบคุมเวลาในการสัมผัสมีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับ

ในเชิงกลไกทางเคมี การดูดซับกรดซิตริกมักเกิดขึ้นจากการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างโมเลกุลของกรดซิตริกและตำแหน่งแอคทีฟบนพื้นผิววัสดุดูดซับ งานวิจัยของ Ozilgen และ Demirci (2006) พบว่า อุณหภูมิและ pH มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับ เนื่องจากความเป็นกรด-ด่างสามารถเปลี่ยนรูปประจุของซิตริกและตำแหน่งแอคทีฟบนวัสดุได้ การปรับ pH ของสารละลายให้เหมาะสมกับค่าพีเคเอของกรดซิตริก ($pK_{a1} \approx 3.1$, $pK_{a2} \approx 4.7$, $pK_{a3} \approx 6.4$) จะช่วยเพิ่มการแลกเปลี่ยนไอออนและการดูดซับได้สูงสุด นอกจากนี้ งานวิจัยโดย Soccol และคณะ (2006) ยังชี้ให้เห็นว่า การดูดซับสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักหมยและรีไซเคิลของวัตถุดิบและตัวเร่งการผลิต การใช้วัสดุดูดซับซ้ำหลายรอบสามารถลดต้นทุนการผลิตได้โดยไม่ลดประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวกรดซิตริก

กระบวนการที่โมเลกุลของสารหนึ่ง เช่น กรดซิตริก ดึงหรือยึดติดบนพื้นผิวของวัสดุอีกชนิดหนึ่ง เช่น เรซินแลกเปลี่ยนไอออน คาร์บอนกัมมันต์ หรือซิลิกาเจล โดยไม่เกิดปฏิกิริยาเคมีถาวร การดูดซับเป็นกระบวนการทางกายภาพและเคมีที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น พื้นผิวของวัสดุ ความเข้มข้นของสาร pH อุณหภูมิ และแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล กระบวนการนี้มีประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรม เช่น การเก็บเกี่ยวกรดซิตริกจากของเหลวหมัก การทำความสะอาดน้ำ หรือการแยกสารออกจากสารละลายที่ซับซ้อน (Raimbault, 1998; Soccol et al., 2006) การดูดซับถือเป็นกระบวนการสำคัญในวิศวกรรมชีวเคมีและอุตสาหกรรมชีวภาพ โดยเฉพาะในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและทำให้บริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ เช่น กรดซิตริกหลังการหมัก การดูดซับแตกต่างจากการละลายและการตกผลึกตรงที่โมเลกุลของสารเป้าหมายจะยึดติดกับพื้นผิวของตัวกลางดูดซับโดยไม่เปลี่ยนโครงสร้างเคมีของสารนั้น กระบวนการนี้สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งโดยแรงฟิสิกส์ (physical adsorption) ซึ่งอาศัยแรงดึงดูดแบบ van der Waals หรือแรงไฮโดรเจน และโดยแรงเคมี (chemisorption) ที่เกิดจากการสร้างพันธะเคมีชั่วคราวระหว่างสารและตัวดูดซับ (Raimbault, 1998; Soccol et al., 2006)

ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริก การดูดซับถือเป็นขั้นตอนสำคัญในการแยกกรดซิตริกออกจากของเหลวหมักซึ่งมักประกอบด้วยสารละลายซับซ้อน เช่น น้ำตาลที่เหลือ สารอินทรีย์อื่น และ

เกลือแร่ การใช้วัสดุดูดซับที่เหมาะสม เช่น เรซินแลกเปลี่ยนไอออน คาร์บอนกัมมันต์ หรือซิลิกาเจล ช่วยให้สามารถดักจับโมเลกุลกรดซิตริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในกรณีของเรซินแลกเปลี่ยนไอออน โมเลกุลกรดซิตริกที่อยู่ในรูปแอนไอออนจะจับกับตำแหน่งแอ็กทีฟของเรซิน และสามารถปลดปล่อยได้โดยการเปลี่ยนค่า pH หรือใช้สารละลายเฉพาะ เช่น กรดหรือเบสเจือจาง (Stamenković et al., 2007) การดูดซับเป็นขั้นตอนสำคัญในการเพิ่มความบริสุทธิ์และประสิทธิภาพของการผลิตกรดซิตริก เทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุดูดซับ (เรซิน คาร์บอนกัมมันต์ ซิลิกาเจล) เงื่อนไขทางเคมี (pH อุณหภูมิ) และเวลาการสัมผัส การปรับพารามิเตอร์เหล่านี้อย่างเหมาะสมสามารถเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของกรดซิตริกเชิงอุตสาหกรรมได้อย่างมีนัยสำคัญ

Wang, et al., 2019 เปรียบเทียบผลกระทบทางเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อมของการเก็บเกี่ยวกรดซิตริกโดยใช้กระบวนการสามชนิดที่ใช้การตกตะกอน การสกัดเชิงปฏิกิริยา หรือการดูดซับ สรุปว่าเทคนิคการดูดซับเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากที่สุด โดยมีผลกระทบต่อการเกิดกรดต่ำที่สุด ยูโทรฟิเคชัน ความเป็นพิษต่อระบบนิเวศ และศักยภาพในการทำให้โลกร้อนต่ำที่สุด พวกเขาประเมินต้นทุนการดำเนินงานประจำปีของการดูดซับที่สูงกว่า (61 ล้านดอลลาร์) เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย (54 ล้านดอลลาร์) และต่ำกว่าการตกตะกอน (70 ล้านดอลลาร์) รวมถึงการลงทุนในโครงการทั้งหมดซึ่งอยู่ที่ 35.1 ล้านดอลลาร์ 32.6 ล้านดอลลาร์ และ 41.5 ล้านดอลลาร์ ตามลำดับ สำหรับอัตราการผลิต CA เชิงพาณิชย์ 6,400 กก./ชม. แม้ว่าวิธีการดูดซับจะช่วยลดการใช้พลังงานและสารเคมี แต่การสร้างใหม่และการแลกเปลี่ยนเรซินเป็นระยะก็มีค่าใช้จ่ายเนื่องมาจากอายุการใช้งานที่จำกัด

ตารางที่ 2 วิธีการแยกกรดซิตริก (Saeed et al., 2020)

Methods	CA solution (%)	CA recovery	Purity (%)	Temperature (°C)	Reaction time (min)	Processing time (min)	Reference
Precipitation + Crystallization	Fermentation broth (5%)	>75	-	60-130	105	-	Annadurai et al. (1996)
Precipitation + Crystallization	Fermentation broth	>80	>90	30	-	120	Felman et al. (1998)
Precipitation + Crystallization	Fermentation broth (6.8%)	67.2	96	60-85	105	205	Wang et al. (2013)
Extraction + Precipitation with high pressure	Dry fermented grain	92.2-99.3	99.1-99.9	40	30	120-180	Shishikura et al. (1992)
Extraction + Precipitation with high pressure	Aqueous solution (56.8%)	32.9-98.2	97.6-99.8	40	-	-	Shishikura et al. (1992)
Extraction + Precipitation with high pressure	Aqueous solution (56.4%)	92.4	99.8	35	-	-	Shishikura et al. (1992)
Reactive extraction	Fermentation broth	90	-	50-65	-	-	Baniel and Gonen (1991)
Reactive extraction	Aqueous solution (4.2%)	93	-	RT	240	-	Keshav et al. (2012)
Reactive extraction	Aqueous solution (4.2%)	94	-	RT	240	-	Keshav et al. (2012)

Reactive extraction	Aqueous solution (4.2%)	95	-	RT	240	-	Keshav et al. (2012)
Reactive extraction	Aqueous solution (10%)	98	-	25	15	-	(Araújo et al., 2017)
Reactive extraction	Aqueous solution (50%)	99	99	80	-	-	Rongjie et al. (2017)
Reactive extraction	Fermentation broth (12%)	75.3	99.8	30	20	35	Liu et al. (2020)
Adsorption	Fermentation broth (70%)	97.2	99.8	80	25	-	Wu et al. (2009)
Adsorption	Aqueous solution (0.5%)	99	-	60	120	240	Van den Bergh et al. (2017)
Adsorption	Aqueous solution (1%)	95.7	99.4	25	30	-	Delgado Dobladez et al. (2019)
Electrodialysis	Aqueous solution (5%)	97	-	33	-	-	Moresi and Sappino (1998)
Electrodialysis	Aqueous solution (3.3%)	97.1	-	RT	-	140	Sun et al. (2017)
Electrodialysis	Aqueous solution (1.92%)	8.8-23.4	-	25	-	250	Chandra et al. (2018)
Electrodialysis	Aqueous solution (1.92%)	50.4	-	25	-	250	Chandra et al. (2018)
Electrodialysis	Fermentation broth	60-80	-	25	-	-	Brichant et al. (2018)
Electrodeionization	Fermentation broth (0.2%)	50	-	RT	-	-	Widiasta et al. (2004)

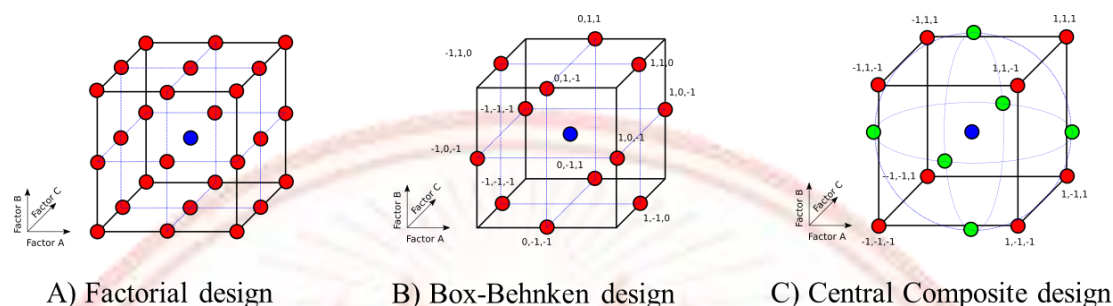
2.15 การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (box - behnken design)

การศึกษาสภาวะเหมาะสมสูงสุดในการผลิตสามารถทำได้ผ่านการออกแบบการทดลอง โดยความแปรผันของการออกแบบการทดลองแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับจุดการทดลอง (experimental points) และจำนวนชุดการทดลอง โดยการออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์ - เบห์นเคนเป็นการออกแบบการทดลองแบบสามระดับสำหรับพื้ผิวตอบสนองสามารถสร้างสมการความสัมพันธ์เมื่อชนิดของปัจจัยเป็นเชิงปริมาณ การออกแบบการทดลองนี้อาศัยหลักการของการทดลองชนิดแฟคทอเรียลเต็มรูปแบบ (full factorial design) ผสมกับพหุคูณจุดกึ่งกลาง (Central Points) จากการออกแบบส่วนประสมกลาง (central composite design) (สิน, 2014) การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลเต็มรูปแบบในกรณีที่มี 3 ระดับ พารามิเตอร์จะเปลี่ยนแปลงใน 3 ระดับคือ +1, 0, และ -1 ซึ่งแสดงถึงค่าสูงสุด ค่าเฉลี่ย และค่าต่ำสุดตามลำดับจำนวนการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองในลักษณะนี้คือ 3^K โดย K คือ จำนวนตัวแปร ดังนั้นในกรณีที่มีตัวแปร 3 ตัว จำนวนการทดลองจึงมีทั้งหมด 27 การทดลอง

การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์ - เบห์นเคนเป็นการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete factorial design) ซึ่งเป็นที่นิยมในงานวิจัยระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากแต่ละปัจจัยประกอบไปด้วย 3 ระดับ และไม่มีจุดทดลองที่มุมของพื้นผิวลูกบาศก์ ทำให้จำนวนชุดการทดลองลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนชุดการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองชนิดแฟคทอเรียลเต็มรูปแบบและการออกแบบส่วนประสมกลาง จำนวนการทดลองที่ได้จากการออกแบบชนิดนี้จะเท่ากับ $N = 2k(k - 1) + C_0$ โดยที่ k คือ จำนวนปัจจัยของการทดลอง และ C_0 คือจำนวนจุดกึ่งกลาง ดังนั้นในการออกแบบการทดลองที่มีสามปัจจัย และมีจำนวนจุดกึ่งกลาง 5 จุด จึงมีจำนวนการทดลองเท่ากับ 17 การทดลอง โดยจุดการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ BBD จะไม่พบจุดบริเวณขอบของลูกบาศก์ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการทดลองที่ต้องการประหยัดงบประมาณในการทดลองหรือการออกแบบการทดลองเพื่อตัดสภาวะที่ไม่จำเป็นออกไป

การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลางจะประกอบด้วย 2^k factorial และ 2K Runs ใน แนวแกน (axial Point) ที่เรียกว่า star Runs และ center Runs (n_0) ที่จุดศูนย์กลาง การออกแบบการทดลองแบบ CCD จะมี การกำหนดจุดนอกเหนือจากขอบลูกบาศก์ ทำให้สภาวะที่ได้จากการทดลองกว้างกว่าจุดที่กำหนดไว้ โดยจำนวนการทดลองที่ได้จากการออกแบบในลักษณะนี้จะเท่ากับ $N = n_0 + 2K + 2^k$ โดยที่ n_0 คือ จำนวนจุดกึ่งกลาง และ K คือจำนวนตัวแปร (Breig & Luti, 2021) ดังนั้นในการออกแบบการทดลองที่มีสามปัจจัยและมีจำนวนจุดกึ่งกลาง 5 จุด จึงมีจำนวนการ

ทดลองเท่ากับ 19 การทดลอง โดยจุดการทดลองที่เกิดขึ้นของการออกแบบการทดลองแต่ละรูปแบบ แสดงดังในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 การออกแบบการทดลองสำหรับการทดลองที่มี 3 ตัวแปร (a) การออกแบบการทดลองชนิดแฟคทอเรียลเต็มรูปแบบ (b) การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (c) การออกแบบส่วนประสมกลาง (Breig & Luti, 2021)

การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์ – เบห์นเคนจึงเป็นการออกแบบการทดลองที่ให้จำนวนชุดการทดลองที่น้อยที่สุดเมื่อกำหนดให้มีตัวแปร 3 ตัวแปรและแต่ละตัวแปร มี 3 ระดับ ทำให้สามารถศึกษาภาวะเหมาะสมในการทดลองได้โดยมีการออกแบบการทดลองในช่วงที่เหมาะสมและประหยัดงบประมาณในการทดลอง

2.16 แบบจำลองजनพลศาสตร์ในการผลิตกรดซิตริก

กระบวนการผลิตกรดซิตริกจะมีการใช้งานอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม แต่การทำความเข้าใจในเชิงजनพลศาสตร์ของกระบวนการหมักยังคงเป็นความท้าทายที่สำคัญ เนื่องจากความซับซ้อนของระบบหมัก ซึ่งเกิดจากความหลากหลายของสารตั้งต้นที่สามารถนำมาใช้ได้ ปฏิสัมพันธ์เชิงพลวัตระหว่างเชื้อรา *A. niger* กับสารตั้งต้นเหล่านั้น รวมถึงผลยับยั้งที่เกิดจากทั้งสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ของกระบวนการ ทั้งหมดนี้ล้วนเป็นอุปสรรคต่อการพัฒนาแบบจำลองजनพลศาสตร์สากลที่สามารถอธิบายการหมักกรดซิตริกได้อย่างถูกต้อง อย่างไรก็ตาม การใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ในการทำนายพฤติกรรมของระบบ ค้นหาเงื่อนไขที่เหมาะสมของกระบวนการ ออกแบบกระบวนการชีวภาพ และกำหนดพารามิเตอร์การดำเนินการที่สำคัญ ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพโดยรวมของการผลิต (Woinaroschy et al., 2010) ในการสนับสนุนแนวทางนี้ Woinaroschy และคณะ ได้ทำการศึกษาและปรับปรุงแบบจำลองजनพลศาสตร์ของการหมักกรดซิตริกจากกากน้ำตาลและหางนม โดยเปรียบเทียบแบบจำลองต่างๆ กับผลการทดลอง พบว่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นและผลยับยั้งของสารต่างๆ มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อประสิทธิภาพการหมัก (Woinaroschy et al., 2010; Książek, E. (2023) Sharifzadeh Baei และคณะ ได้นำ

แบบจำลอง Logistic มาใช้อธิบายการเจริญของจุลินทรีย์ พร้อมทั้งใช้สมการ Luedeking-Piret ในการจำลองการผลิตกรดซิตริกจากกากแอปเปิลโดย *A. niger* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์กรดซิตริกในระบบดังกล่าวมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการเจริญของจุลินทรีย์ (Baei et al., 2008) นอกจากนี้ Baei และนักวิจัยอื่นๆ ยังได้รายงานค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ที่สำคัญ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ค่าสัมประสิทธิ์ผลผลิต (Yield coefficients) และค่าคงที่ความชอบของสารตั้งต้น (Substrate affinity constants) ภายใต้สภาวะต่างๆ ของสายพันธุ์จุลินทรีย์และสภาพการหมัก (Baei et al., 2008; Amenaghawon et al., 2014) ข้อมูลเหล่านี้ช่วยเพิ่มความเข้าใจเชิงลึกสำหรับการปรับเทียบแบบจำลองการหมักให้มีความแม่นยำมากขึ้น การใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ยังช่วยลดความจำเป็นในการทดลองเชิงประจักษ์ซ้ำซ้อนภายใต้สภาวะต่างๆ ทำให้สามารถประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในกระบวนการพัฒนาได้อย่างมีนัยสำคัญ

2.17 การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (Mathematical Modeling)

การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เป็นเครื่องมือที่มีบทบาทสำคัญในการศึกษากระบวนการหมักจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถอธิบายพฤติกรรมของระบบที่ซับซ้อนให้อยู่ในรูปของสมการ แบบจำลองช่วยให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การใช้สารอาหาร และการสร้างผลิตภัณฑ์ ทำให้สามารถทำนายผลการหมักได้แม่นยำมากขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยการทดลองจริงทุกครั้ง นอกจากนี้ยังช่วยในการวิเคราะห์เชิงกลไกเพื่อให้เข้าใจปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิต รวมถึงใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงสภาวะการหมักให้เหมาะสม ช่วยลดต้นทุน และเพิ่มผลผลิตในเชิงอุตสาหกรรม (Dulf et al., 2022) เพื่อให้สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณการเจริญของเชื้อราและการสร้างเมตาโบไลต์ได้อย่างแม่นยำ จึงมีการนำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์หลายแบบมาใช้

การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มีความสำคัญในการอธิบายกระบวนการผลิตกรดซิตริกผ่านการหมักโดยจุลินทรีย์ *Aspergillus* การประยุกต์ใช้แบบจำลองเหล่านี้ช่วยในการคำนวณและวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ การใช้น้ำตาล และการผลิตผลิตภัณฑ์ ซึ่งช่วยให้ นักวิจัยสามารถกำหนดพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตของการหมัก ในการศึกษาี้มีการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์สามแบบ ได้แก่ แบบจำลอง Monod, Logistic และ Gompertz โดยแบบจำลอง Monod ใช้กันอย่างแพร่หลายในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น โดยมักใช้ในการคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ที่สำคัญ เช่น อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด และค่าคงที่ความชอบของสารตั้งต้น (Pagarra, H. 2016; Amenaghawon et al., 2014) แบบจำลอง Logistic เหมาะสำหรับอธิบายลักษณะการเจริญแบบซิก

มอยด์ (sigmoidal growth) ของ *A. niger* โดยเฉพาะภายใต้สภาวะจำกัดสารอาหาร และมีประสิทธิภาพในการคาดการณ์ค่าความเข้มข้นของมวลชีวภาพสูงสุดทั้งในระบบการหมักแบบของเหลวและของแข็ง (Saithi et al., 2016) แบบจำลอง Gompertz มีความสามารถในการอธิบายช่วงต่างๆ ของการเจริญ ได้แก่ ระยะปรับตัว (lag phase) ระยะเพิ่มขึ้นแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล และระยะชะลอตัว ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้กับข้อมูลการสะสมชีวมวลและการผลิตกรดซิตริกภายใต้สภาวะที่แสดงพฤติกรรมการเจริญแบบ S-shape (Chen and Gullo et al., 2015) การเปรียบเทียบแบบจำลองแสดงให้เห็นว่า Gompertz และ Logistic มีความเหมาะสมโดยเฉพาะกับเชื้อราชนิดเส้นใย เช่น *A. niger* มากกว่าแบบจำลองอื่น ทั้งนี้ นักวิจัยบางส่วนยังได้พัฒนาแบบจำลองทางเลือกหรือแบบจำลองลูกผสม เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคาดการณ์ภายใต้เงื่อนไขพิเศษของการหมัก (Amenaghawon et al., 2014) การใช้แบบจำลองจลนพลศาสตร์มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการหมักอย่างมีประสิทธิภาพ เพิ่มความแม่นยำในการพยากรณ์ผลผลิต และลดภาระในการทดลองซ้ำซ้อนในระดับอุตสาหกรรม โดยพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ได้รับการกำหนดจากการตรวจสอบโปรไฟล์การทดลองและการผลิตที่เกี่ยวข้อง ความถูกต้องของแบบจำลองได้รับการยืนยันโดยการใช้ชุดข้อมูลการทดลองอิสระสามชุด ซึ่งรวมถึงการผลิตชีวมวล สมการสำหรับแบบจำลองการผลิตชีวมวลได้กำหนดไว้ในสมการ 3-5

สมการแบบจำลอง Monod มีดังนี้ในสมการที่ 3

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S} \quad (\text{สมการที่ 3})$$

โดยที่: μ คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (h^{-1})

μ_{max} คือ อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด (h^{-1})

S คือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (กรัมต่อลิตร)

K_S คือ ค่าคงที่ของโมโนด ซึ่งแสดงถึงความเข้มข้นของซับสเตรตที่อัตราการเจริญเติบโตจะลดลงครึ่งหนึ่งจากอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด

สมการแบบจำลอง Logistic มีดังนี้ในสมการที่ 4

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \frac{a}{1 - \exp(b - cx)} \quad (\text{สมการที่ 4})$$

โดยที่: X คือ ขนาดของประชากรหรือความเข้มข้นของเซลล์ในเวลา (t)

X_0 คือ ขนาดของประชากรเริ่มต้น (ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น)

a คือ ค่าคงที่ที่สะท้อนความแตกต่างระหว่างขนาดประชากรสูงสุดและประชากรเริ่มต้น

b คือ ค่าคงที่ที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญเติบโตเริ่มต้น (h^{-1})

c คือ ค่าคงที่ที่เกี่ยวข้องกับอัตราการชะลอการเจริญเติบโต (h^{-1})

t คือ เวลา (h)

สมการแบบจำลอง Gompertz จะแสดงในสมการที่ 5

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = a \exp[-\exp(b - ct)] \quad (\text{สมการที่ 5})$$

โดยที่: X คือ ความเข้มข้นของเซลล์ในเวลา (t)

X_0 คือ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น

a คือ ค่าคงที่ที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด

b คือ ค่าคงที่ที่กำหนดจุดเริ่มต้นของการเจริญเติบโต (h^{-1})

c คือ ค่าคงที่ที่เกี่ยวข้องกับอัตราการชะลอการเจริญเติบโต (h^{-1})

t คือ เวลา (h)

การใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ช่วยในการวิเคราะห์พฤติกรรมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ พารามิเตอร์ที่ได้จากแบบจำลองเหล่านี้สามารถช่วยทำนายและควบคุมกระบวนการหมักได้ ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตชีวมวลและการผลิตสารเมตาบอไลต์

2.17 ลิขสิทธิ์และอนุสิทธิ์ที่เกี่ยวข้อง

อนุสิทธิ์บัตรเลขที่ 9200 ผลิตภัณฑ์ไมโครคริสตัลไลน์เซลลูโลสจากกากปาล์มน้ำมัน โดยการทำ ความสะอาดกากปาล์มน้ำมันและนำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บดให้ละเอียดและน มา กรองด้วยตะแกรงขนาดไม่เกิน 30 เมช สกัดเซลลูโลสได้ด้วยกรดไนตริกเข้มข้น ร้อยละ 5 ถึง 12 โดย น้ำหนัก นำไปให้ความร้อนจนเดือดเป็นเวลา 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง หรือสามารถสกัดได้ด้วย การใช้ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยการต้มที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 -180 นาที กรองและล้างสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่นจนมีความเป็นกลาง และล้างตะกอนด้วย เอทานอล โดย อัตราส่วนระหว่างตะกอนกับเอทานอลเท่ากับ 1:2 นำตะกอนเซลลูโลสที่ได้ไปผ่าน กระบวนการฟอกสี

ด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 – 20 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 70 -100 องศาเซลเซียส ระยะเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ซึ่งอัตราส่วน ระหว่างตะกอนเซลล์ูโลสและสารละลาย คือ 1:4 นำตะกอนที่ได้มาสกัดไมโครคริสตัลไลน์เซลล์ูโลส ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ภายใต้สภาวะ การให้ความร้อนที่ไม่เกิดการระเหยเป็นเวลา 90 – 120 นาที นำไมโครคริสตัลไลน์เซลล์ูโลสที่ได้ ไปทำแห้งด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดย ผลผลิตของไมโครคริสตัลไลน์เซลล์ูโลส จากกากปาล์มน้ำมันเท่ากับร้อยละ 95.50 – 99.72 ซึ่งมีดัชนี ความเป็นผลึกเท่ากับ 74.25 – 82.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำและช่วยกระจายตัวใน อาหาร (ไทย เลขที่สิทธิบัตร 9200, 2557)

สิทธิบัตรเลขที่ 40384 กระบวนการสำหรับการผลิตกรดซิตริกจากวัตถุดิบที่มีน้ำตาลสูงด้วย เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ โดยการเตรียมวัตถุดิบที่มีน้ำตาลสูง เช่น กากน้ำตาลจากอ้อย หรือ ผลไม้ที่มีน้ำตาลสูง ผ่านกระบวนการปรับสภาพก่อนการหมัก ด้วยการเติมแร่ธาตุที่จำเป็น เช่น แมงกานีส (Mn^{2+}) และสังกะสี (Zn^{2+}) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริก จากนั้นทำการ หมักด้วยเชื้อรา *A. niger* ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีการควบคุมค่า pH ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม เช่น pH 3.0 และอุณหภูมิที่ 30°C เพื่อส่งเสริมการผลิตกรดซิตริกที่มีคุณภาพสูง กระบวนการนี้ยังใช้ เทคนิคการหมักในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนละลายสูงเพื่อเพิ่มผลผลิตกรดซิตริก ในที่สุดกรดซิตริก ที่ได้จากกระบวนการนี้จะมีคุณภาพสูงและใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยผลผลิตกรดซิตริกจาก กระบวนการนี้มีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งสามารถลดต้นทุนการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ไทย เลขที่ สิทธิบัตร 40384, 2000)

อนุสิทธิบัตรเลขที่ 15565 กรรมวิธีการผลิตกรดซิตริกโดยใช้มันสำปะหลัง น้ำมันสำปะหลังสด และมันสำปะหลังแห้งมาทำการบด เสร็จแล้วนำทั้งสองอย่างมาผสมกัน เติมน้ำลงถังเพื่อปรับความ เข้มข้นให้อยู่ที่ 20-30 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าพีเอชให้อยู่ที่ 7.0 เติม เติมเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส เพื่อทำ การเปลี่ยนแปลงน้ำตาล โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส และรักษาระดับอุณหภูมิ 30 นาที แล้วส่งน้ำวัตถุดิบที่เปลี่ยนจากแป้งเป็นน้ำตาลแล้วเข้าถังหมัก 70-80 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรถัง แล้วเติมสารอินทรีย์ไนโตรเจน 0.1-10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรถัง หรือ สารอินทรีย์ไนโตรเจน 0.01- 2.0 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรถัง แล้วเพิ่มอุณหภูมิของถังที่ 85-100 องศาเซลเซียส แล้วรักษาระดับ อุณหภูมิและแรงดัน 0.1-0.15 เมกะปาสคาล 30 นาที แล้วนำการลดอุณหภูมิลงเหลือ 38 องศา

เซลเซียส แล้วเติมเชื้อราชนิดแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ ลงถัง แล้วทำตามขั้นตอนการหมักปกติ ควบคุมระดับอุณหภูมิการหมักให้อยู่ที่ 33-38 องศาเซลเซียส ทำการหมักไว้ 57.5 ชั่วโมงกรดที่ได้ออกมาประมาณ 13.77 เปอร์เซ็นต์ ประสิทธิภาพที่ได้มาคือ 93.75 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำการหมักเสร็จแล้ว จึงเตรียมส่งน้ำวัตถุดิบต่อไปยังกระบวนการสกัด (จีน เลขที่สิทธิบัตร 15565, 2562)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์เลขที่ 87922 วิธีการของการทำให้กรดซิตริกบริสุทธิ์จากน้ำหมัก ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนของ: การเติมแคลเซียม คาร์บอเนต หรือแคลเซียม ไฮดรอกไซด์เข้าไปในสารละลายส่วนบนตะกอนที่ได้มาโดยการเอาแบคทีเรีย ออกจากน้ำหมักที่มีกรดซิตริก สำหรับการทำให้เป็นกลาง จนกระทั่งพีเอชสุดท้ายมีค่า 2.0-4.0 ดังนั้นจึงทำให้เกิดสารละลายที่เป็นผลลัพธ์ที่มีอย่างน้อยที่สุดหนึ่งในตะกอนแคลเซียม ไดไฮโดรเจน ซิเตรท และ ตะกอนแคลเซียม ไฮโดรเจน ซิเตรท แล้วทำการแยกเฟสของแข็งออกจากสารละลายและทำการสร้าง และ ดำเนินการแยกด้วยกรดกับเฟสของแข็งที่ได้รับในขั้นตอนข้างต้น จนกระทั่งพีเอชสุดท้ายมีค่า 1.5-2.5 และทำการแยกเฟสของแข็งที่เป็นผลลัพธ์ออกจากสารละลายและทำการสร้าง เพื่อจัดให้มีเกลือแคลเซียม และ สารละลายของการแยกสลายด้วยกรดที่มีความเข้มข้นของกรดซิตริกอยู่ในช่วง 20-45 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักนอกจากนี้ แคลเซียม คาร์บอเนต หรือ แคลเซียม ไฮดรอกไซด์สามารถเติมเข้าไปในเฟสของเหลวที่ได้รับในขั้นตอนแรกเพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยา จนกระทั่งพีเอชสุดท้ายมีค่า 5.0-7.0 ดังนั้นจึงทำให้เกิดสารละลายที่เป็นผลลัพธ์ที่มีอย่างน้อยที่สุดหนึ่งใน ตะกอนแคลเซียม ไฮโดรเจน ซิเตรท และตะกอนแคลเซียม ซิเตรท เฟสของแข็งแยกออกจากสารละลาย ล้าง และทำให้กลับไปสู่ขั้นตอนที่ (1) เพื่อทำปฏิกิริยาอีกครั้ง วิธีการนี้มีข้อดีของค่าใช้จ่ายในการผลิตต่ำ ผลผลิตสูง และของเสียน้อย (จีน เลขที่สิทธิบัตร 87922, 2565)

อนุสิทธิบัตรเลขที่ US2970084 กรรมวิธีการผลิตกรดซิตริกโดยการหมักแบบดำนํ้าด้วย *A. niger* จากวัสดุที่เตรียมด้วยสารอาหารจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ไม่บริสุทธิ์ โดยมีธาตุเหล็กไม่น้อยกว่า 0.2 ส่วนต่อหนึ่งล้านส่วนของวัสดุ การควบคุมการเผาผลาญของเซลล์ *A. niger* นี้จะทำโดยการเติมทองแดงในรูปแบบไอออนลงในวัสดุในปริมาณ 0.1 ถึง 500 ส่วนต่อหนึ่งล้านส่วนของวัสดุทั้งหมด ซึ่งทองแดงนี้จะต้องเติมลงไปก่อนที่จะระยะเวลาการเจริญเติบโตเริ่มต้นของ *A. niger* จะสิ้นสุดลง สำหรับการเติมทองแดงสามารถทำได้ก่อนการฉีดเชื้อ *A. niger* ลงในวัสดุหรือในช่วงเวลาที่ฉีดเชื้อ เช่นเดียวกัน ในการปรับปรุงวิธีการนี้ การเติมทองแดงจะช่วยควบคุมลักษณะเซลล์ของ *A. niger* โดย

จะทำการเติมทองแดงในช่วงเวลาประมาณ 50 ชั่วโมงหลังจากการฉีดเชื้อ เพื่อกระตุ้นให้เกิดโครงสร้างเซลล์ที่สามารถผลิตกรดซิตริก โดยลักษณะของเซลล์นั้นประกอบด้วยเส้นใยที่สั้น แข็ง กระดิก มีปลายหนา และเซลล์ที่บวมมีรูปร่างกลมถึงวงรี กระจายอยู่ทั่วโครงสร้างเส้นใย การเติมทองแดงไอออนจะทำได้เป็นระยะๆ โดยหากพบว่าโครงสร้างเส้นใยยังหลวมและยาว ไม่มีการแตกแขนงหลังจาก 12 ชั่วโมง จะต้องเติมทองแดงเพิ่มเติมจนกว่าโครงสร้างเซลล์ที่ผลิตกรดซิตริกจะเกิดขึ้น ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ไม่บริสุทธ์ เช่น กลูโคส สตาร์ชไฮโดรไลเซต น้ำตาลผสม และซูโครสที่ผ่านการขัดสภาพบางส่วน โดยทองแดงจะเติมลงในวัสดุในรูปแบบของสารละลายทองแดงที่ละลายน้ำได้ ทั้งนี้ การเติมทองแดงไอออนในวัสดุจะช่วยขจัดผลกระทบจากธาตุเหล็กที่มีต่อการผลิตกรดซิตริกจาก *A. niger* (อเมริกา เลขที่สิทธิบัตร US2970084, 2501)



บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 เชื้อ *A. niger* TISTR 3063 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (ปทุมธานี, ประเทศไทย)

3.1.2 เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ลูชูเอนซิส (*A. luchuensis* SK01) ที่คัดแยกได้จากมะม่วงในประเทศไทย

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อโปเตโตเดกซ์โทรสอะการ์ Potato Dextrose Agar (PDA) (Himedia, India)

3.2.2 กรดซิตริก ($C_6H_8O_7$) (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., Taloja, India)

3.2.3 กรดซิตริกเกรดอาหาร ($C_6H_8O_7$) (Tokyo Chemical Industry, India)

3.2.4 กรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India)

3.2.5 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) (KemAus™, Australia)

3.2.6 น้ำปราศจากไอออน (DI water)

3.2.7 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง

3.2.7.1 กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India)

3.2.7.2 โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India)

3.2.7.3 ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India)

3.2.7.4 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India)

3.2.7.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (KemAus™, Australia)

3.2.7.6 กรดไฮโดรคลอริก 37% (HCl) (QReC™, New Zealand)

3.2.7.7 กรดซัลฟิวริก 98% (H₂SO₄) (QreC™, New Zealand)

3.2.7.8 แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 หลอดทดลอง

3.3.2 ขวดรูปชมพู่ 50 mL

3.3.3 ขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร

3.3.4 ขวดรูปชมพู่ 500 มิลลิลิตร

3.3.5 ขวดดูแรน 200 มิลลิลิตร

3.3.6 ขวดดูแรน 1000 มิลลิลิตร

3.3.7 ปีกเกอร์ 250 มิลลิลิตร

3.3.8 ปีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร

3.3.9 ปีกเกอร์ 1000 มิลลิลิตร

3.3.10 จานเพาะเชื้อ

3.3.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.3.12 ลูบเปียเชื้อ

3.3.13 แท่งแก้วสามเหลี่ยม

3.3.14 แท่งแก้วคนสาร

3.3.15 ซ้อนตักสาร

3.3.16 ไมโครปิเปต

3.3.17 กระดาษห่ออาหาร

3.3.18 หลอดปั่นเหวี่ยง 15 มิลลิลิตร

3.3.19 หลอดปั่นเหวี่ยง 50 มิลลิลิตร

3.4 เครื่องมือการวิเคราะห์

3.4.1 ตู้บ่มเชื้อ (BIOBASE, รุ่น BJPX-H50, Chian)

3.4.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 L (Eppendorf BioFlo 120, Germany)

3.4.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 3 L (MARUBISHI MDFT, Japan)

3.4.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Medium centrifuge, CN-350, Denmark)

3.4.5 เครื่องปั่นกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน (Magnetic hotplate stirrer) (DLAB, MS7-H550-S, USA)

3.4.6 Fourier transform infrared spectroscope (Tensor 27, Bruker, Germany)

3.4.7 Scanning electron microscope (JEOL JSM-IT500HR, Japan)

3.4.8 เตาอบ (Oven dryer) (Mettler, UF30, Germany)

3.4.9 เครื่องชั่งแบบละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Balance) (Sartorius, PRACTUM313-1S, Germany)

3.4.10 เครื่องเขย่าตะแกรงร่อน (Sieve shaker) (Endecotts, Minor 200, UK)

3.4.11 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) (Mettler, WNB22, Germany)

3.4.12 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH meter) (Consort, C1010, Belgium)

3.4.13 Microplate reader (Spectramax iD3, USA)

3.4.14 UV-VIS spectrophotometer (PerkinElmer, LAMBDA 950, USA)

3.4.15 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (BIOBASE, DM-300M, China)

3.4.16 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) (Alltech ELSD 2000ES, USA)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063

เชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 หลอดแอมพูลละลายเชื้อราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 1 มิลลิลิตร จะถ่ายเชื้อราที่ได้ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงแบบเหลวปริมาตร 4 มิลลิลิตร และการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อราฟุ้งตัวและเจริญเติบโต แล้วนำไมซีเลียมของเชื้อราบริสุทธิ์ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้าไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโปเตโตเดกโตรสอาร์การ์ (Potato Dextrose Agar, PDA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จนได้เชื้อราที่เจริญเติบโตสมบูรณ์เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น กระบวนการเตรียมสปอร์ สำหรับการเพาะเลี้ยงจะดำเนินการโดยการเทน้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 10 มิลลิลิตรลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อเกลี่ยผิวหน้าอาหารอย่างระมัดระวังและสม่ำเสมอเพื่อให้สปอร์หลุดออกจากโครงสร้างของเชื้อรา ในขั้นตอนนี้จะมีการเติมสารลดแรงตึงผิวทวิน 80 (Tween 80) จำนวน 1 หยดเพื่อช่วยเพิ่มความสามารถในการเข้ากับน้ำของสปอร์เชื้อราและสร้างสารแขวนลอยสปอร์ที่มีความเสถียร การปรับความเข้มข้นของสปอร์จะใช้เครื่องมือฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) ในการนับจำนวนและปรับให้ได้ความเข้มข้น 3×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.5.2 คัดแยกเชื้อราเพื่อผลิตกรดซิตริก

การศึกษานี้ดำเนินการโดยใช้เชื้อราที่คัดแยกได้จากผลมะม่วงในประเทศไทยเป็นเชื้อราดังกล่าวได้รับการเพาะเลี้ยงและเตรียมไมซีเลียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อโปเตโตเดกโตรสอาร์การ์ (Potato Dextrose Agar, PDA) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากการบ่มเพาะดังกล่าว เชื้อราที่เจริญเติบโตสมบูรณ์แล้วจะนำมาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น โดยกระบวนการเตรียมสปอร์เพื่อการเพาะเลี้ยงจะดำเนินการผ่านการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตรลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อเกลี่ยผิวหน้าอาหารอย่างระมัดระวังเพื่อให้สปอร์หลุดออกมาจากโครงสร้างของ

เชื้อรา ในขั้นตอนนี้จะมีการเติมสารลดแรงตึงผิวทวิน 80 (Tween 80) จำนวน 1 หยดเพื่อช่วยให้สปอร์ของเชื้อราสามารถแขวนลอยในน้ำได้อย่างสม่ำเสมอ การเตรียมความเข้มข้นของสปอร์เพื่อการเพาะเลี้ยงจะดำเนินการโดยการนับจำนวนสปอร์ด้วยเครื่องมือฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) ในการนับจำนวนและปรับให้ได้ความเข้มข้น 3×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสโดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันการเสียหายจากการแช่แข็ง

3.6 ศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) ต่อการผลิตกรดซิตริก

3.6.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอน

ใส่กล้าเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ความเข้มข้น 3×10^8 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส (Glucose) ซูโครส (Sucrose) และกลูโคสผสมกับซูโครสในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปรับความเข้มข้น 130 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.3 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลอง คือ ยูเรีย (Urea) 0.1 กรัมต่อลิตร ปริมาตรที่ใช้เพาะเลี้ยง 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 144 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน เพื่อวิเคราะห์มวลเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ไดโนโทรซาลิไซลิก (Miller, 1959) และปริมาณกรดซิตริกตามวิธีตามวิธีของ AOAC (2000)

3.6.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจน

ใส่กล้าเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ความเข้มข้น 3×10^8 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ยูเรีย (Urea) เปปโตน (Peptone) และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) กำหนดให้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเป็น 0.1 กรัมต่อลิตร และแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ กลูโคส 130 กรัมต่อลิตร กำหนดองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงตามข้อที่ 3.6.1 ปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อที่ 3.6.1

3.6.3 ศึกษาหาความเข้มข้นของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N)

ศึกษาหาความเข้มข้นของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) โดยการแปรผันความเข้มข้นของสารจาก 70, 100 และ 130 กรัมต่อลิตร โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ กลูโคส

และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ ยูเรีย และ เปปโตน กำหนดองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงตามข้อที่ 1 ปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อที่ 3.6.1 นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้ไปใช้ในการวางแผนการทดลองเพื่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบบล็อก – เบห์นเคน

3.6.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 โดยใช้อาหารดัดแปรด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง

วางแผนการทดลองเพื่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบบล็อก – เบห์นเคน ด้วยโปรแกรม Expert Design Version 13 (Minneapolis, USA.) โดยกำหนดสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 ปัจจัยดังนี้ 1. อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) 2. ความเร็วรอบในการเขย่า (Shaking Speed) และ 3. ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการหมักเบ็ดเสร็จ (Batch fermentation) แบ่งอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 70, 85, 100 กรัมต่อกรัม ความเร็วรอบในการเขย่า ได้แก่ 200, 250, 300 รอบต่อนาที และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ ได้แก่ 0.01, 0.05, 0.1 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 3 และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเพาะเลี้ยงได้ทั้งหมด 17 สภาวะ ตามตารางที่ 4 โดยผลตอบสนองเป็นปัจจัยประเมินสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกของเชื้อราที่เตรียมได้ ดังนี้

ผลตอบสนองที่ 1 ปริมาณกรดซิตริก (Citric acid ; กรัมต่อลิตร)

ผลตอบสนองที่ 2 ผลได้ (Yield ; กรัมต่อกรัม)

ตารางที่ 3 ตัวแปรปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาสภาวะเหมาะสมสูงสุด

ปัจจัย	ระดับของตัวแปร			หน่วย
	-1	0	1	
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	70	85	100	กรัมต่อกรัม
ความเร็วรอบในการเขย่า	200	250	300	รอบต่อนาที
ปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์	0.01	0.05	0.1	กรัมต่อลิตร

3.6.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงจะดำเนินการในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะต่างๆ จะเป็นไปตามที่กำหนดไว้ในตารางที่ 4 ตัวแปรควบคุมที่สำคัญสำหรับการทดลองนี้ประกอบด้วย โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร และความเป็นกรดต่างเริ่มต้น pH 4 อาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงที่ปรับแต่ละค่าต่างๆ แล้วจะบรรจุในขวดพลาสติกอย่างละ 1 ขวด กระบวนการหมักจะดำเนินการโดยถ่ายเชื้อราจากการทดลอง 3.5.1 ที่มีความเข้มข้น 3×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นดำเนินการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะต่างๆ จะเป็นไปตามที่กำหนดไว้ในตารางที่ 4 ในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงจะมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารหมักหลังจากการหมักดำเนินไปแล้วเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้ว จะดำเนินการบ่มภายใต้สภาวะการเขย่าตามที่กำหนดไว้ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 144 ชั่วโมง (6 วัน) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ต่างๆ ในระหว่างกระบวนการหมัก

ตารางที่ 4 ชุดการทดลองสำหรับการศึกษาสภาวะเหมาะสมสูงสุดในการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา

การทดลองที่	ปัจจัยที่ 1	ปัจจัยที่ 2	ปัจจัยที่ 3
	อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	ความเร็วรอบในการเขย่า	ปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์
	(กรัมต่อกรัม)	(รอบต่อนาที)	(กรัมต่อลิตร)
1	100	200	0.055
2	85	200	0.1
3	85	250	0.055
4	100	250	0.01
5	85	200	0.01

6	85	250	0.055
7	70	300	0.055
8	100	300	0.055
9	70	200	0.055
10	85	300	0.1
11	100	250	0.1
12	85	250	0.055
13	85	250	0.055
14	85	250	0.055
15	70	250	0.01
16	85	300	0.01
17	70	250	0.1

3.6.6 การยืนยันสภาพการณ์ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ

วิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกและผลได้ (Yield) ของการผลิตกรดซิตริกของเชื้อราที่ได้จากการเตรียมทั้ง 17 สภาวะ สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ให้ปริมาณกรดซิตริกและผลได้ (Yield) มากที่สุดมายืนยันสภาพการณ์ผลิตในห้องปฏิบัติการ โดยการเตรียมสภาวะการเพาะเลี้ยงดังกล่าวอีกครั้งทั้งหมด 3 ข้าง เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของกระบวนการเตรียมและยืนยันสภาพการณ์ผลิตในห้องปฏิบัติการ

3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อราสายพันธุ์แอสเพอร์จิลลัส ลูซูเอนซิส (*Aspergillus luchuensis*) และเพื่อการยืนยันสภาพการณ์ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ

การศึกษานี้ดำเนินการโดยใช้เชื้อรา *A. luchuensis* SK01 ที่เตรียมกล้าเชื้อราและความเข้มข้นของเชื้อราตามการทดลองที่ 3.5.2 เชื้อราที่มีความเข้มข้นตามที่กำหนดจะถ่ายเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อแล้ว โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะเป็นสูตรที่ได้รับ การดัดแปลงและเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสูงสุดเช่นเดียวกับที่ใช้สำหรับเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ตามการทดลองที่ 3.6.5 โดยมีการเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 336 ชั่วโมง (14 วัน) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ต่างๆ ในระหว่างกระบวนการหมัก โดยการเตรียมสภาวะการเพาะเลี้ยงดังกล่าวอีกครั้ง

ทั้งหมด 3 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของกระบวนการเตรียมและยืนยันสภาวะการผลิตในห้องปฏิบัติการ

3.8 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อราในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จในอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลวสูตรดัดแปร

3.8.1 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จในอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารเหลวสูตรดัดแปร

ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อรา

นำไมซีเลียมของเชื้อราบริสุทธิ์มาเพิ่มปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเชื้อราเจริญเติบโตอายุได้ 7 วัน มาเป็นเชื้อตั้งต้น โดยเทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้เข็มเย็บเชื้อเกลี่ยผิวหน้าอาหารเพื่อให้สปอร์หลุดออก หลังจากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิวทวิน 80 (Tween 80) จำนวน 1 หยด เพื่อให้สปอร์ของเชื้อราสามารถเข้ากับน้ำได้ดีจะได้สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา จากนั้นปรับความเข้มข้นให้ได้ 3×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยไฮโซไทมิตอร์ เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายใต้กลีเซอรอล หลังจากนั้นนำเชื้อที่เจริญเติบโตแล้ว 7 วันมาเป็นเชื้อตั้งต้น โดยทำการเทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้เข็มเย็บเชื้อเกลี่ยผิวหน้าอาหารเพื่อให้สปอร์หลุดออก หลังจากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิวทวิน 80 (Tween 80) จำนวน 1 หยด ทำให้สปอร์ของเชื้อราแขวนลอย จากนั้นนับจำนวนสปอร์ด้วยไฮโซไทมิตอร์และเตรียมความเข้มข้นให้ได้ 3×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำเชื้อที่ความเข้มข้น 3×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารที่ใช้หมัก ปริมาตรที่ใช้หมัก 300 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.8.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงประกอบไปด้วย กลูโคส จำนวน 97.83 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 1 กรัมต่อลิตร โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.3 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.3 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.3 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) 0.1 กรัม/ลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) 1 เปอร์เซ็นต์ โดยปรับค่า pH ของสารละลายให้ได้ pH 4 หลังจากเตรียมอาหารดัดแปลงและ

ปรับค่า pH แล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงจะถ่ายลงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ (batch bioreactor) ปริมาตรที่ใช้ 3 ลิตร กระบวนการฆ่าเชื้อจะดำเนินการที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (15 lb/in²)

3.8.3 การศึกษาการผลิตกรดซิตริกและการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อรา *A.niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ

เตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามคู่มือที่มาพร้อมกับตัวถังพร้อมกับต่อถังปฏิกรณ์ชีวภาพเข้ากับอุปกรณ์ต่างๆ และเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราโดยกำหนดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที และมีการควบคุม pH 4 พร้อมทั้งตรวจสอบระบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ถ่ายเชื้อเชื้อราที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวปริมาตร 300 มิลลิลิตรลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จขนาด 5 ลิตร ปริมาตรที่ใช้หมัก 3 ลิตร จากนั้นเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงเชื้อราและทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 48 ชั่วโมง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลาทั้งหมด 336 ชั่วโมง

3.8.4 การศึกษาการผลิตกรดซิตริกและการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อรา *A.niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน

เตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามคู่มือที่มาพร้อมกับตัวถังพร้อมกับต่อถังปฏิกรณ์ชีวภาพเข้ากับอุปกรณ์ต่างๆ และเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราโดยกำหนดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที และมีการควบคุม pH 4 พร้อมทั้งตรวจสอบระบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ถ่ายเชื้อเชื้อราที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวปริมาตร 300 มิลลิลิตรลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ปริมาตรที่ใช้หมัก 3 ลิตรและมีการเติมอาหารใหม่ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ หรือเมื่อน้ำตาลในอาหารหมดลง จากนั้นเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงเชื้อราและทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 48 ชั่วโมง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลาทั้งหมด 336 ชั่วโมง

3.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA โดยการเตรียมตัวอย่างโดยการเกลี่ยเชื้อ (smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆ ไม่ให้หนาแน่นมากเกินไป และศึกษาลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้การขยายภาพที่อัตราขยาย 10x 40x และ 100x

3.9.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของมวลเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscopy: SEM)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. niger* TISTR 3063 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไมซีเลียมและลักษณะเฉพาะภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ได้มีการสังเกตตัวอย่างโดยใช้ SEM สำหรับตัวอย่างที่ตรึงบนท่อ จะใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL JSM-IT500HR ประเทศญี่ปุ่น) ที่มีแรงดันไฟฟ้าเร่ง 3.0 กิโลโวลต์ถึง 5.0 กิโลโวลต์ ภาพ SEM ของตัวอย่างได้รับการบันทึกด้วยกำลังขยาย 1,000 เท่า 2,000 เท่า และ 5,000 เท่า

3.10 การแยกเชื้อจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างผลไม้ที่กำลังย่อยสลายจากสิ่งแวดล้อมจากบริเวณเดียวกัน นำมาคัดแยกเชื้อรา *Aspergillus* โดยวิธี dilution plate method บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน คัดแยกโคโลนีของเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีที่เจริญอย่างรวดเร็ว และสร้างโคนิเดีย (conidia) สีดำ-น้ำตาลบนผิวหน้าอาหาร เก็บเชื้อบริสุทธิ์แต่ละตัวอย่างบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน ศึกษาลักษณะ โคโลนี และรูปร่างลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อจำแนกชนิดเชื้อราและนำไปศึกษาความสามารถในการผลิตกรดซิตริก

3.11 การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Aspergillus* ด้วยวิธีชีวโมเลกุล

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว PDB เขย่าด้วยความเร็ว 300 rpm เป็นเวลา 5 วัน กรองเส้นใย ด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำมาสกัด DNA โดยประยุกต์จากวิธีการของ Doyle & Doyle (1987) (Jj, 1987) ตรวจสอบ คุณภาพและความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer เพิ่มปริมาณลำดับเบสในบริเวณ 26s rRNA ด้วยไพรเมอร์ LR0R 5' (ACC CGC TGA ACT TAA GC) 3' และ LR7 5' (TAC TAC CAC CAA GAT CT) 3' (White et al., 1990) ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X buffer 2.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.2 ไมโครโมลาร์ และ 1 ยูนิต Taq DNA polymerase โดยจำนวนรอบในการทำ PCR คือ 35 รอบ ใช้เวลาและอุณหภูมิในการสังเคราะห์สาย DNA ดังนี้ initial denaturation อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที denaturation อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

annealing อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที และ final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ของบริเวณอนุรักษ์ (Conserve sequence) ที่อยู่บน 26S rRNA นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้ Nucleotide BLAST ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อยืนยันชื่อในระดับสปีชีส์และวิเคราะห์แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการ

3.12 การวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราชนิดที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้ ได้ดำเนินการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ BLAST (nucleotide BLAST alignment) จากฐานข้อมูลของศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Biotechnology Information: NCBI) เพื่อตรวจสอบและจำแนกลำดับยีนที่มีความคล้ายคลึงกัน (homologous sequences) จากเชื้อราชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *A. niger* รหัส LC573607, *A. aculeatus* LC573562, *A. carbonarius* LC573579, *A. awamori* LC573570, *A. foetidus* LC573587, *A. phoenicis* LC573613, *A. luchuensis* LC573598, *A. wentii* OW984456, *Penicillium janthinellum* MK450697 และ AB293968, *P. purpurogenum* GU566251, *P. restrictum* KP016816, *P. citrinum* OW985441 และ *Trichoderma viride* LC535970 โดยใช้ *Yarrowia lipolytica* รหัส AB018158 เป็นชนิดนอกกลุ่ม (outgroup species) สำหรับการเปรียบเทียบในการสร้างแผนภูมิตระกูลวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการดำเนินการด้วยโปรแกรม MEGA11 โดยใช้วิธีการประมาณความน่าจะเป็นสูงสุด (maximum likelihood), ระยะทางวิวัฒนาการ (evolutionary distance) และการหาค่าพารามิเตอร์สูงสุด (maximum parsimony) เพื่อสร้างแผนภูมิตระกูลวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จัดเรียงไว้แล้ว (aligned sequences) เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อราที่ศึกษา.

3.13 วิธีวิเคราะห์

3.13.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ไดโนโทรซาลิไซลิก (Miller, 1959)

นำตัวอย่างที่เก็บทุกๆ 48 ชั่วโมง ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที นำส่วนใสด้านบนดูดใส่หลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำ

กลั่น 4 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าสาร จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางแล้วดูด้วยหลอดทดลองหลอดใหม่ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายดีเอ็นเอส (3,5 dinitrosalicylic acid) ไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ปิดปากหลอดด้วยกระดาษอลูมิเนียม แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็น 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกำจัดไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อหาค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์หน่วยกรัมต่อลิตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร

3.13.2 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

เตรียมหลอดที่แห้งที่ผ่านการทำแห้ง เป็นมาตรฐานในการชั่ง และทราบค่าน้ำหนักที่แน่นอน นำตัวอย่างที่สุ่มในแต่ละครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นรินส่วนใสด้านบนเก็บไว้ในหลอดเซนต์พิวัก เพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำตาลและวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกต่อไป ล้างมวลเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ด้วยปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการผสมแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นรินส่วนใสด้านบนทิ้ง และทำการล้างมวลเซลล์อีกครั้งด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการผสมแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที รินส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นนำหลอดที่ทำการล้างมวลเซลล์แล้วเข้าไปอบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งหน่วยเป็นกรัมต่อลิตรด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด

3.13.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริก ตามวิธีของ AOAC (2000)

ปิเปตตัวอย่างจำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร จากนั้นปิเปตตัวอย่างในที่เจือจางแล้ว มา 10 มิลลิลิตร ในลงในขวดฟลาสก์ หยดฟีนอล์ฟธาไลน์ลงไป 2-3 หยด แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนสารละลายถึงจุดยุติจะเป็นสีชมพู ซึ่งจะไม่จางไปใน 2 นาที บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ใช้ในการไทเทรต

3.13.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาตรกรดอินทรีย์ในน้ำหมักและตะกอนชีตริกด้วยการ

วิเคราะห์แบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)

นำสารละลายตัวอย่างจากน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมาการศึกษาองค์ประกอบและปริมาตรกรดอินทรีย์ โดยเปรียบเทียบกับกรดชีตริกเชิงพาณิชย์ (Sisco research laboratories, India) คำนวณหาปริมาณกรดชีตริกจากกราฟมาตรฐานของกรดชีตริกในช่วงความเข้มข้น 0-30 กรัมต่อลิตร ซึ่งกราฟมาตรฐานที่ใช้นั้นเป็นกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดชีตริกกับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของกรดต่อสารละลายมาตรฐาน

3.14 กระบวนการหลังจากการหมัก (Downstream)

เตรียมตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยสารละลาย NaOH 10% (w/v) หยดสารละลาย NaOH และเพิ่มอย่างช้าๆ และกวนผสมอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งปริมาณในบีกเกอร์จะถึง pH 8 หรือ 9 สังเกตได้โดยการเปลี่ยนสีที่ไม่ซ้ำกัน (สีเหลืองเป็นสีส้ม) เนื่องจากสารละลายเปลี่ยนจากกรดเป็น จากนั้นเตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ CaCl_2 20% (w/v) และเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ลงในสารละลายโซเดียมซิเตรตที่อยู่ในบีกเกอร์ และผสมให้เข้ากันโดยใช้แท่งแก้วกวนผสม เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นสารละลายจะให้ร้อนจนถึงจุดเดือด เมื่ออุณหภูมิของสารละลายสูงขึ้นจะเกิดตะกอนแคลเซียมไดซิเตรตสีขาว หลังจากนั้นการกรองแบบสุญญากาศ เพื่อเก็บเกี่ยวแคลเซียมซิเตรตที่ตกตะกอนและล้างด้วยน้ำร้อน 3 ครั้ง นำตะกอนที่ล้างแล้วถ่ายตะกอนของแคลเซียมซิเตรตลงในบีกเกอร์ แล้วเติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นเจือจาง H_2SO_4 10 % (ลงในบีกเกอร์อย่างช้าๆ และใช้แท่งแก้วเพื่อผสมให้เข้ากัน จะได้ตะกอนแคลเซียมซัลเฟตที่ไม่ละลายน้ำและกรดชีตริก

3.15 การพิสูจน์เอกลักษณ์กรดชีตริกจากเชื้อรา

3.15.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (FT-IR Analysis)

นำตะกอนชีตริกที่ตกตะกอนได้จากน้ำหมักมาการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด โดยเปรียบเทียบกับกรดชีตริกเชิงพาณิชย์ (sisco research laboratories, India) และกรดชีตริกเกรดอาหาร (Tokyo Chemical Industry,

India) วิเคราะห์ในช่วงคลื่นความถี่ $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy

3.15.2 การวิเคราะห์หาปริมาณธาตุองค์ประกอบในสารตัวอย่าง โดยเทคนิค XRF (X-ray fluorescence)

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุองค์ประกอบในสารตัวอย่าง โดยเทคนิค XRF (X-ray fluorescence) โดยใช้การวัดปริมาณรังสีเอกซ์ฟลูออเรสเซนซ์ (X-ray fluorescence) ที่ปลดปล่อยออกมาจากธาตุองค์ประกอบแต่ละชนิดในสารตัวอย่าง โดยการนำตะกอนซีตริกที่ตกตะกอนได้จากน้ำหมักมาการศึกษาองค์ประกอบและปริมาตรกรดอินทรีย์ โดยเปรียบเทียบกับกรดซีตริกเชิงพาณิชย์ (sisco research laboratories, India) และกรดซีตริกเกรดอาหาร (Tokyo Chemical Industry, India)

3.16 การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดซีตริก

3.16.1 การศึกษาจลพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเชื้อ *A.niger* และ *A. luchuensis* SK01

ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ

แบบจำลองที่สมบูรณ์สำหรับการประมาณพารามิเตอร์ ในการศึกษาได้ใช้ระบบของสมการเชิงอนุพันธ์ธรรมดา (ODEs) เพื่อแทนการเปลี่ยนแปลงในความเข้มข้นของชีวมวล [X] ซับสเตรต [S] และความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ [P] ตามข้อมูลการทดลองแบบเบ็ดเสร็จ สมการเหล่านี้อธิบายความสัมพันธ์ทางพลศาสตร์ขององค์ประกอบเหล่านี้ในระหว่างกระบวนการหมัก ระบบสมการที่ใช้มีดังนี้

3.16.1.1 การศึกษาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ)

$$\text{จากสูตร } \mu = r_x / C_x$$

3.16.1.2 การศึกษาค่าเวลาที่เซลล์ใช้เพิ่มจำนวนจากเดิมเป็น 2 เท่า (td)

$$\text{จากสูตร } td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

3.16.3 การศึกษาค่าผลได้มวลเซลล์ที่ผลิตต่อสารอาหารที่ใช้ ($Y_{x/s}$)

$$\text{จากสูตร } Y_{x/s} = \frac{X_{max} - X_0}{S_0 - S_{max}}$$

3.16.4 การศึกษาค่าผลได้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตต่อสารอาหารที่ใช้ ($Y_{p/s}$)

$$\text{จากสูตร } Y_{p/s} = \frac{P_{\max} - P_0}{S_0 - S_{\max}}$$

3.16.5 การศึกษาค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพการผลิต (Productivity)

$$\text{จากสูตร Productivity} = \frac{X_{\max} - X_0}{t}$$

3.16.6 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

แบบจำลอง Monod เป็นแบบจำลองที่อธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ตามความเข้มข้นของซับสเตรตที่มีอยู่ในระบบ โดยใช้สมการที่แสดงอัตราการเจริญเติบโตเป็นฟังก์ชันของความเข้มข้นของซับสเตรตและค่าการอิ่มตัวซึ่งแทนที่อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อความเข้มข้นของซับสเตรตถึงระดับหนึ่ง จุลินทรีย์จะบรรลุขีดจำกัดการเจริญเติบโตสูงสุดและอัตราการเจริญเติบโตจะไม่เพิ่มขึ้นอีก สมการสำหรับจลนพลศาสตร์ Monod มีดังนี้ในสมการที่ 4

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \quad (\text{สมการที่ 4})$$

โดยที่: μ คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (h^{-1})

$\mu_{\max}$ คือ อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด (h^{-1})

S คือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (กรัมต่อลิตร)

K_S คือ ค่าคงที่ของโมนอด ซึ่งแสดงถึงความเข้มข้นของซับสเตรตที่อัตราการเจริญเติบโตจะลดลงครึ่งหนึ่งจากอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด

แบบจำลอง Logistic เป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้เพื่ออธิบายการเจริญเติบโตในลักษณะ S-curve ซึ่งคล้ายกับแบบจำลอง Gompertz แต่มีการคำนวณที่ง่ายกว่าและอธิบายการเจริญเติบโตโดยมีปัจจัยจำกัด ในแบบจำลองนี้ ประชากรหรือผลิตภัณฑ์จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะแรกและค่อยๆ ชะลอตัวเมื่อเข้าถึงขีดจำกัดการเจริญเติบโตที่สูงสุด ซึ่งเรียกว่าความสามารถในการรองรับ สมการของจลนพลศาสตร์ Logistic มีดังนี้ในสมการที่ 5

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \frac{a}{1 - \exp(b - cx)} \quad (\text{สมการที่ 5})$$

โดยที่: X คือ ขนาดของประชากรหรือความเข้มข้นของเซลล์ในเวลา (t)

X_0 คือ ขนาดของประชากรเริ่มต้น (ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น)

a คือ ค่าคงที่ที่สะท้อนความแตกต่างระหว่างขนาดประชากรสูงสุดและประชากรเริ่มต้น

b คือ ค่าคงที่ที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญเติบโตเริ่มต้น (h^{-1})

c คือ ค่าคงที่ที่เกี่ยวข้องกับอัตราการชะลอการเจริญเติบโต (h^{-1})

t คือ เวลา (h)

แบบจำลอง Gompertz เป็นแบบจำลองที่ใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่ออธิบายกระบวนการเจริญเติบโตที่แสดงลักษณะ S-curve โดยเริ่มต้นด้วยการเจริญเติบโตที่ช้า จากนั้นเร่งความเร็วและชะลอตัวเมื่อระบบใกล้ถึงขีดจำกัดสูงสุด ในกระบวนการผลิตทางชีวภาพหรือการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต (เช่น จุลินทรีย์) หรือพลศาสตร์ประชากร การเจริญเติบโตมักจะจำกัดด้วยข้อจำกัดของทรัพยากร ซึ่งทำให้การขยายตัวไม่สามารถดำเนินการได้ตลอดไป แบบจำลอง Gompertz จะแสดงในสมการที่ 6

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = a \exp[-\exp(b - ct)] \quad (\text{สมการที่ 6})$$

โดยที่: X คือ ความเข้มข้นของเซลล์ในเวลา (t)

X_0 คือ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น

a คือ ค่าคงที่ที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด

b คือ ค่าคงที่ที่กำหนดจุดเริ่มต้นของการเจริญเติบโต (h^{-1})

c คือ ค่าคงที่ที่เกี่ยวข้องกับอัตราการชะลอการเจริญเติบโต (h^{-1})

t คือ เวลา (h)

การใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ช่วยในการวิเคราะห์พฤติกรรมของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ พารามิเตอร์ที่ได้จากแบบจำลองเหล่านี้สามารถ

ช่วยทำนายและควบคุมกระบวนการหมักได้ ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตชีวมวลและการ
ผลิตสารเมตาบอไลต์

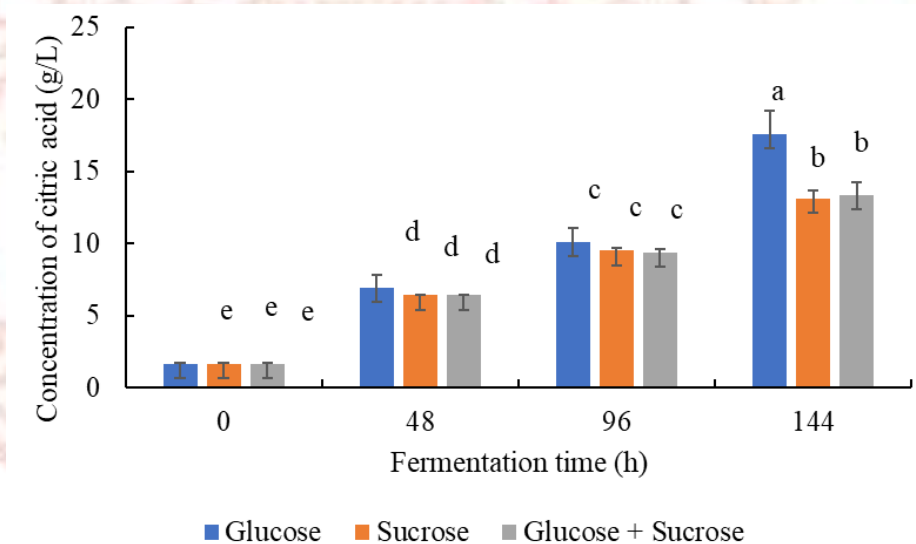


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดซิตริก

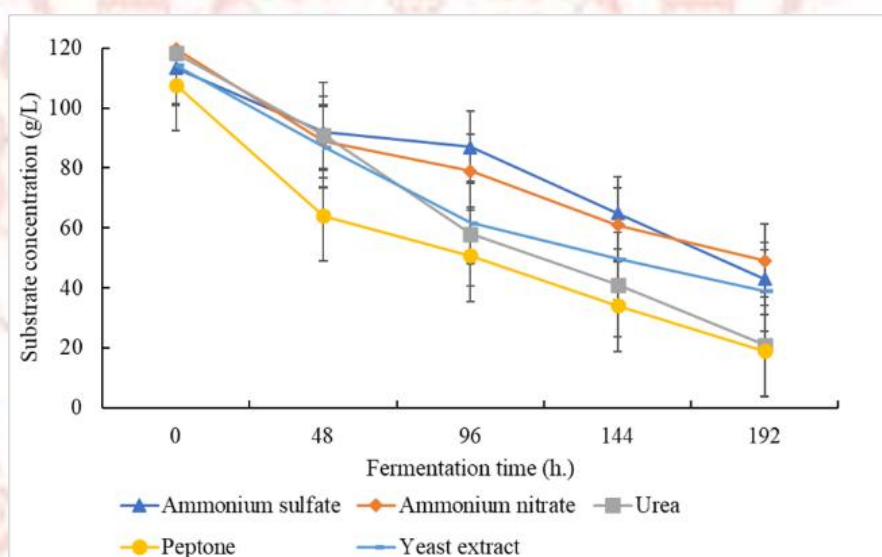
ในการศึกษานี้ ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างแหล่งคาร์บอนชนิดมอนแซ็กคาไรด์ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และส่วนผสมในอัตราส่วน 1:1 ของกลูโคสและซูโครส ในการเพาะเลี้ยง *A. niger* TISTR 3063 ผลการทดลองพบว่า การผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาหมักในทุกสภาวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลลัพธ์ที่ดีกว่าซูโครส และสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดถึง 17.40 กรัมต่อลิตร ภายหลังการหมักเป็นเวลา 6 วัน อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชนิดของมอนแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในช่วงเวลา 2 ถึง 4 วันแรกของกระบวนการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 13 โดยทั่วไปแล้ว การผลิตกรดซิตริกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับชนิดของน้ำตาล และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของกระบวนการผลิตกรดซิตริก



ภาพที่ 13 ความเข้มข้นของกรดซิตริกของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ภายใต้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

4.2 ผลของประเภทของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดซิตริก

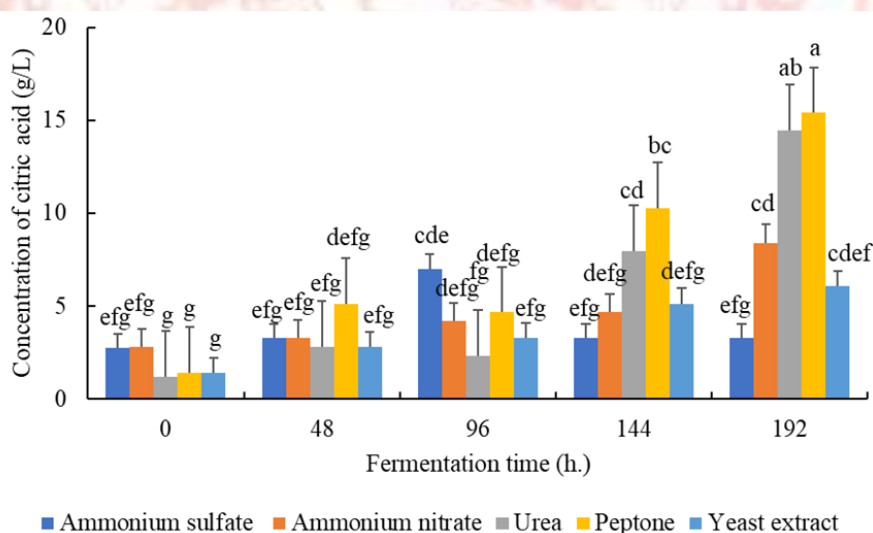
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *A. niger* TISTR 3063 สามารถผลิตกรดซิตริกได้เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก โดยพบว่าปริมาณน้ำตาลลดลงตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 70, 100 และ 130 ตลอดระยะเวลา 10 วัน ดังแสดงในภาพที่ 14 โดยทั่วไป แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงประกอบด้วยเกลืออนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) และแอมโมเนียมไนเตรด NH_4NO_3 ซึ่งสามารถให้ไนโตรเจนในรูปแบบที่จุลินทรีย์ดูดซึมได้ง่าย นอกจากนี้ *A. niger* TISTR 3063 ยังสามารถใช้สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด กากถั่วเหลือง เคซีน กากน้ำข้าวโพด และมอลต์สกัด (Saithi & Tongta, 2016)



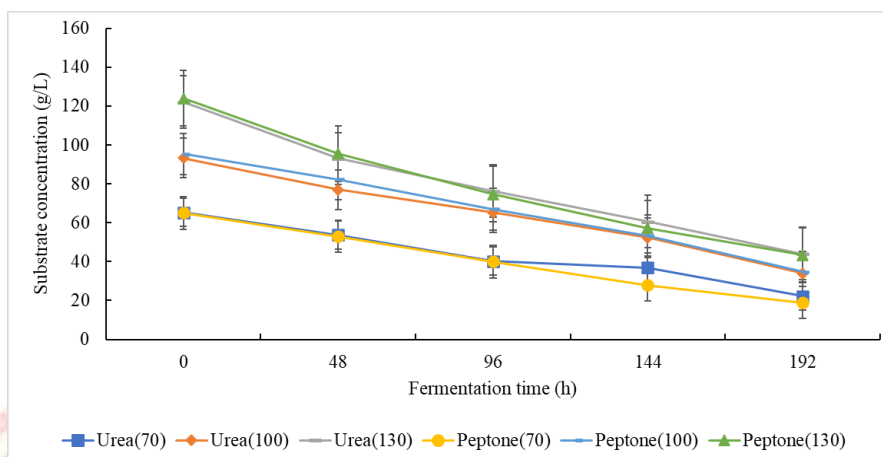
ภาพที่ 14 ความเข้มข้นของสารตั้งต้นของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ภายใต้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

ผลการทดลอง พบว่าในบรรดาแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ ได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NH_4NO_3 ยูเรีย เปปโตน และยีสต์สกัด นั้น สายพันธุ์ *A. niger* TISTR 3063 สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณมากกว่าเมื่อใช้ยูเรียและเปปโตนร่วมกับกลูโคส เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NH_4NO_3 และยีสต์สกัด ดังแสดงในภาพที่ 15 โดยมีการผลิตกรดซิตริกสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ 29 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมักเป็นเวลา 8 วัน ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ภายใต้สภาวะที่ใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 0.1 กรัมต่อลิตร ในทาง

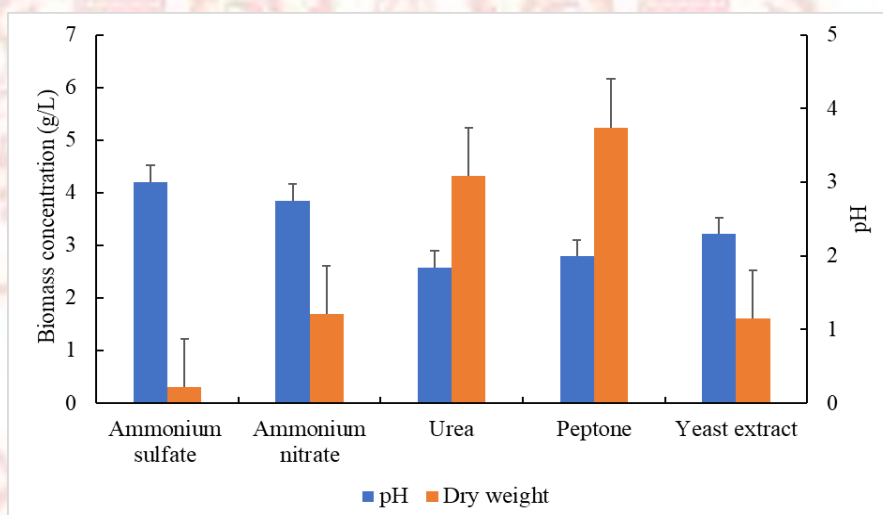
กลับกัน อาหารเลี้ยงที่ประกอบด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NaNO_3 ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในด้านปริมาณการผลิตกรดซิตริก ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yasser et al., 2012 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *A. niger* TISTR 3063 พบว่า ประเภทของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความต้องการเฉพาะของการเพาะเลี้ยงและวัตถุประสงค์ของการผลิต *A. niger* TISTR 3063 เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการปรับตัวสูง โดยสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลากหลายประเภทเพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึม แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เหล่านี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน เปปไทด์ และสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่อจุลินทรีย์ การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนอย่างเหมาะสมควรพิจารณาจากวัตถุประสงค์ของการเจริญเติบโต สูตรองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเงื่อนไขในการทดลอง ภายใต้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้ *A. niger* TISTR 3063 ดังแสดงในภาพที่ 16 และ 17 สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อใช้เปปไทด์และยูเรีย ส่งผลให้มีการผลิตกรดซิตริกในฐานะเมแทบอลิซึมหลักในปริมาณสูง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการปรับให้เหมาะสมทั้งชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการเฉพาะของสายพันธุ์ *A. niger* TISTR 3063 และเพื่อให้บรรลุผลลัพธ์ตามเป้าหมายของกระบวนการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 15 ความเข้มข้นของกรดซิตริกของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ภายใต้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 16 การใช้สารตั้งต้นของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ภายใต้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

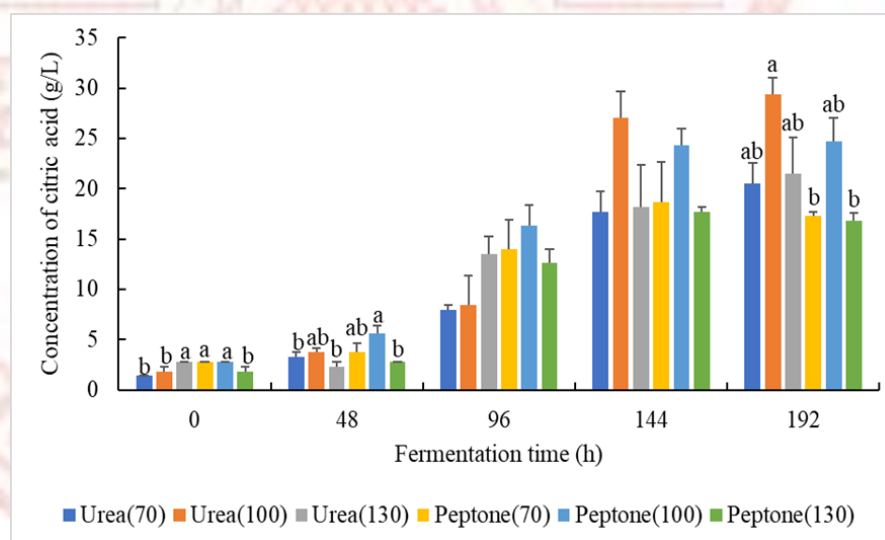


ภาพที่ 17 ความเข้มข้นของชีวมวลและค่า pH ของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ภายใต้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

4.3 ผลของความเข้มข้นของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตกรดซิตริก

จากการทดลองเปรียบเทียบศักยภาพการผลิตกรดซิตริกโดยใช้แหล่งไนโตรเจนสองชนิด ได้แก่ ยูเรีย และเปปโตน ภายใต้ระยะเวลาหมัก 8 วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้นส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ตามระยะเวลาการหมัก โดยพบว่าการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้ว มีการผลิตกรดซิตริกที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วงวันที่ 6 และ 8 ของการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 16 โปรไฟล์การใช้กลูโคส

ในฐานะสารตั้งต้นตลอดระยะเวลาการหมัก และการเพิ่มขึ้นของการผลิตกรดซิตริกที่สอดคล้องกับระดับความเข้มข้นของกลูโคส ภายใต้สภาวะที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนคงที่ จากผลการสังเกตพบว่า การผลิตกรดซิตริกในครั้งนี้มีลักษณะเป็น (*growth-associated product*) การสร้างกรดซิตริกมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์อย่างชัดเจน ซึ่งสามารถสังเกตได้จากแนวโน้มปริมาณกรดซิตริกที่เพิ่มขึ้นพร้อมกับมวลชีวภาพตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงประมาณ 144 ชั่วโมงของกระบวนการหมัก การมีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อถือเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตกรดซิตริกอย่างมีประสิทธิภาพ จากผลการวิเคราะห์เชิงสถิติของสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้ว พบว่า สภาวะที่ใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 0.1 กรัมต่อลิตร (Urea 100) ให้ปริมาณการผลิตกรดซิตริกสูงสุดที่ 29.40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่า pH สุดท้ายของน้ำหมักเท่ากับ 3.66 ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6 การเปรียบเทียบค่าผลผลิตของกรดซิตริก (yield) แสดงไว้ในตารางที่ 5 โดยพบว่าผลผลิตที่สูงกว่าสังเกตได้ในสภาวะที่ใช้ยูเรียในระดับ 70 และ 100 (Urea 70 และ Urea 100) โดยมีค่าอัตราการผลิต เท่ากับ 0.05 กรัมกรดซิตริกต่อกรัมกลูโคสต่อชั่วโมง



ภาพที่ 18 การเปรียบเทียบการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ภายใต้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน

ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของคาร์บอนแตกต่างกันกับแหล่งไนโตรเจน 2 แหล่งต่อการผลิตกรดซิตริก

Nitrogen sources (g/L)	Substrate concentration (g/L)	Concentration of citric acid (g/L)	pH	Dry weight (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/g/h)
Urea (70)	22.33±2.40	20.53±2.03	2.73±0.20	19.7±0.10	0.4	0.05
Urea (100)	34.00±2.51	29.40±1.61	3.66±0.17	22.0±0.07	0.41	0.05
Urea (130)	44.00±2.51	21.46±3.64	3.70±0.30	23.2±0.07	0.21	0.02
Peptone (70)	19.00±2.64	17.26±0.46	4.30±0.41	22.0±0.03	0.28	0.02
Peptone(100)	34.67±3.66	24.73±2.33	3.93±0.08	22.9±0.03	0.33	0.04
Peptone(130)	43.33±2.96	16.80±0.80	3.63±0.14	22.1±0.00	0.17	0.02

ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้นของคาร์บอนแตกต่างกันกับแหล่งไนโตรเจน 2 แหล่งต่อการผลิตกรดซิตริก ในระยะเวลาการหมัก 192 ชั่วโมง

Fermentation time (h)	Substrate concentration (g/L)	Concentration of citric acid (g/L)	Sig.
0	Urea(70)	1.40±0.00	0.244
	Urea(100)	1.86±0.46	0.244
	Urea(130)	2.80±0.00	0.003
	Peptone(70)	2.80±0.00	0.003
	Peptone(100)	2.80±0.00	0.003
	Peptone(130)	1.86±0.46	0.244
48	Urea(70)	3.26±0.46	0.594
	Urea(100)	3.73±0.46	0.594
	Urea(130)	2.33±0.46	0.295
	Peptone(70)	3.73±0.93	0.594
	Peptone(100)	5.60±0.80	0.018
	Peptone(130)	2.80±0.00	0.594
96	Urea(70)	7.93±0.46	0.877
	Urea(100)	8.40±2.91	0.877
	Urea(130)	13.53±1.68	0.082
	Peptone(70)	14.00±2.91	0.062
	Peptone(100)	16.33±2.03	0.015
	Peptone(130)	12.60±1.40	0.14
144	Urea(70)	17.73±2.03	0.037
	Urea(100)	27.06±2.59	0.037
	Urea(130)	18.20±4.20	0.909
	Peptone(70)	18.66±3.98	0.818
	Peptone(100)	24.26±1.68	0.126
	Peptone(130)	17.73±0.80	1
	Urea(70)	20.53±2.03	0.011

192	Urea(100)	29.40±1.61	0.011
	Urea(130)	21.46±3.64	0.758
	Peptone(70)	17.26±0.46	0.292
	Peptone(100)	24.73±2.33	0.182
	Peptone(130)	16.80±0.80	0.232

4.4 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 โดยใช้อาหารตัดแปรด้วยวิธีการพินผิวตอบสนอง

เพื่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสูงสุดในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 อาศัยกระบวนการทางสถิติโดยการออกแบบการ ทดลองแบบบล็อก – เบห์นเคน ซึ่งกำหนดตัวแปร และระดับดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ตัวแปรปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาสภาวะเหมาะสมสูงสุด

ปัจจัย	ระดับของตัวแปร			หน่วย
	-1	0	1	
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	70	85	100	กรัมต่อกรัม
ความเร็วรอบในการเขย่า	200	250	300	รอบต่อนาที
ปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์	0.01	0.05	0.1	กรัมต่อลิตร

การออกแบบในตารางที่ 8 ได้ผลการออกแบบชุดการทดลองด้วยโปรแกรม Design Expert V.13 ส่งผลให้เกิดจำนวนการทดลองทั้งหมด 17 การทดลอง ผลการผลิตรกรดซิตริก และผลผลิตที่ได้จากแต่ละสภาวะถูกบันทึกและแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการทดลองแบบฟ็อกซ์ – เบห์นเคนและผลของตัวแปรตอบสนอง

RUN	Factor 1 A : C/N (g/g)	Factor 2 B : Shaking Speed (rpm)	Factor 3 C : CaCl ₂ (g/L)	Response 1 Citric acid (g/L)	Response 2 Yield (g/g)
1	100	200	0.055	23.04	0.42
2	85	200	0.1	21.33	0.52
3	85	250	0.055	22.61	0.53
4	100	250	0.01	23.04	0.40
5	85	200	0.01	22.19	0.52
6	85	250	0.055	22.61	0.52
7	70	300	0.055	19.63	0.68
8	100	300	0.055	27.73	0.51
9	70	200	0.055	19.63	0.68
10	85	300	0.1	23.04	0.59
11	100	250	0.1	25.60	0.44
12	85	250	0.055	22.19	0.50
13	85	250	0.055	22.61	0.52
14	85	250	0.055	22.61	0.51
15	70	250	0.01	20.91	0.70
16	85	300	0.01	21.33	0.52
17	70	250	0.1	19.63	0.68

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงขั้นสุดท้ายสำหรับการหมักผลิตรกรดซิตริกโดย *A. niger* TISTR 3063 ประกอบด้วยกลูโคส (C₆H₁₂O₆) ที่ความเข้มข้น 70, 85 และ 100 กรัมต่อลิตร KH₂PO₄ 0.3 กรัม

ต่อลิตร K_2HPO_4 0.3 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 กรัมต่อลิตร และใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio, g/g) ให้ได้ 3 ค่า ได้แก่ 70, 85 และ 100 นอกจากนี้ยังมีการเติม $CaCl_2$ ใน 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.05 และ 0.1 กรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเติมหัวเชื้อ *A. niger* TISTR 3063 ในอัตรา 10% (v/v) และเติม $CaCO_3$ ที่ความเข้มข้น 1% (w/v) ลงไปหลังจากเริ่มต้นการหมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง กระบวนการหมักกรดซิตริกดำเนินการในเครื่องเขย่า (shaking incubator) ที่ความเร็วรอบแตกต่างกัน 3 ค่า ได้แก่ 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 6 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ พร้อมคำนวณค่าผลผลิต (yield) ของแต่ละรอบการทดลอง ซึ่งผลลัพธ์สรุปไว้ในตารางที่ 8

ผลการทดลองที่ได้ใช้แบบจำลองเชิงควอดราติก (quadratic model) ดังแสดงในสมการที่ 7 ซึ่งใช้เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรนำเข้า (input variables) กับปริมาณการผลิตกรดซิตริก โดยทำการประเมินความเหมาะสมของแบบจำลองผ่านการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 9 ค่าความสัมพันธ์กำลังสอง (R^2) ของแบบจำลองเท่ากับ 0.9513 ที่สามารถอธิบายความแปรปรวนของข้อมูลที่สังเกตได้ถึงประมาณ 95.13% ซึ่งบ่งชี้ว่าแบบจำลองมีความเหมาะสมในการใช้งาน แม้จะยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างสมบูรณ์แบบ ได้สมการอธิบายปริมาณกรดซิตริกที่ผลิตได้ดังสมการที่ 7

$$\begin{aligned} \text{Citric acid} = & +47.29 - 0.15 * \text{C/N} - 0.18 * \text{Shaking Speed} - 217.18 * \text{CaCl}_2 + 1.85E-003 * \text{C/N} * \\ & \text{Shaking Speed} + 2.12 * \text{C/N} * \text{CaCl}_2 + 0.29 * \text{Shaking Speed} * \text{CaCl}_2 - 1.36E-003 * \text{C/N}^2 + 2.92E- \\ & 005 * \text{Shaking Speed}^2 - 309.33 * \text{CaCl}_2^2 \end{aligned} \quad (\text{สมการที่ 7})$$

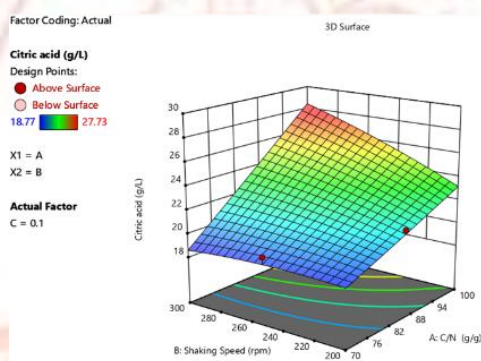
ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจากการลดรูปสมการถดถอยผลตอบสนองของการผลิตกรดซิตริก (ANOVA for Reduced Quadratic model)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	69.4	9	7.71	15.19	0.0008	significant
A-C/N	0.9846	1	0.9846	1.94	0.2063	
B-Shaking Speed	0.8647	1	0.8647	1.7	0.2331	
C-CaCl ₂	3.76	1	3.76	7.41	0.0297	
AB	7.7	1	7.7	15.17	0.0059	
AC	3.69	1	3.69	7.26	0.0309	
BC	1.65	1	1.65	3.25	0.1143	
A ²	0.0083	1	0.0083	0.0164	0.9016	
B ²	0.3254	1	0.3254	0.641	0.4497	
C ²	0.3196	1	0.3196	0.6296	0.4536	
Residual	3.55	7	0.5076			
Lack of Fit	3.41	3	1.14	32.24	0.0029	significant
Pure Error	0.1411	4	0.0353			
Cor Total	72.96	16				

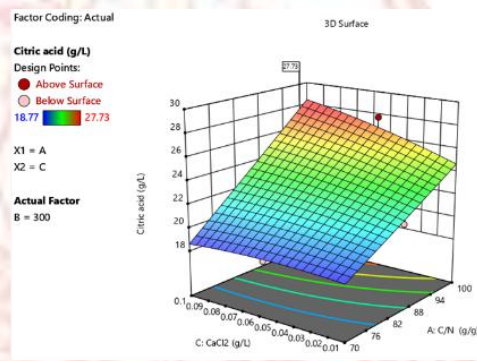
4.4.1 อิทธิพลร่วมของตัวแปรนำเข้าต่อการผลิตกรดซิตริก

ผลผลิตกรดซิตริกที่ได้จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ตัวแปรนำเข้าบางรายการมีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.0297$) โดยผลการทดลองพบว่าช่วงของปริมาณการผลิตกรดซิตริกมีความกว้าง ตั้งแต่ 18.77 ถึง 27.73 กรัมต่อลิตร ตามข้อมูลที่ระบุไว้ในตารางที่ 9 ซึ่งแสดงถึงความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการหมักต่อปัจจัยของอิทธิพลร่วมระหว่างตัวแปรนำเข้าที่มีต่อการผลิตกรดซิตริกปรากฏในภาพที่ 19 (ก-ค) กราฟการตอบสนองทั้งหมดมีลักษณะโค้งเว้า (*concave*) บ่งชี้ว่า จุดที่เหมาะสมที่สุด

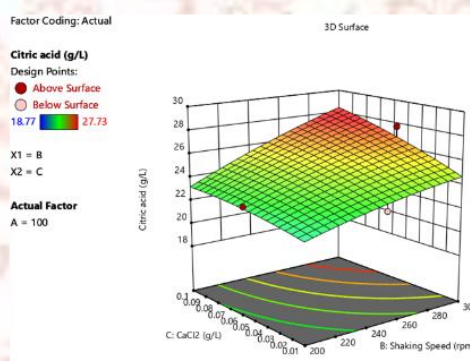
ของแต่ละตัวแปรอยู่ภายในช่วงที่กำหนดไว้ในการทดลอง ภาพที่ 19 (ก) แสดงให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้นในรูปของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) และความเร็วในการเขย่า นำไปสู่การผลิตกรดซิตริกสูงสุดที่ประมาณ 27.73 กรัมต่อลิตร โดยเกิดขึ้นที่ค่ากลางของทั้งสองตัวแปร นอกจากนี้ ยังพบแนวโน้มปฏิสัมพันธ์ในลักษณะเดียวกันระหว่างความเข้มข้นของ CaCl_2 และ C/N ratio โดยให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดที่ 27.73 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเร็วการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ดังแสดงในภาพที่ 19 (ก) นอกจากนี้ ยังพบแนวโน้มปฏิสัมพันธ์ ภาพที่ 19 (ข) แสดงให้เห็นว่า เมื่อคงอัตราส่วน C/N ไว้ที่ 85 และเพิ่มปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) จาก 0.01% เป็น 0.1% อย่างต่อเนื่อง จะส่งผลให้ปริมาณการผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นตามลำดับ ผลของการเปลี่ยนแปลงทั้งความเร็วในการเขย่าและปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ที่มีต่อการผลิตกรดซิตริกในรูปแบบกราฟพื้นผิวสามมิติ (3D response surface) ภาพที่ 19 (ค)



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 19 พื้นผิวตอบสนองของการผลิตกรดซิตริก (ก) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และความเร็วในการเขย่า (ข) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ (ค) ความเร็วในการเขย่า และปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์

4.4.2 อิทธิพลร่วมของตัวแปรนำเข้าต่อการผลิต (Yield)

สำหรับค่าผลผลิต (Yield) ของการผลิตกรดซิตริก พบว่าแบบจำลองที่พัฒนาขึ้นมีค่า R^2 0.9866 แบบจำลองสามารถอธิบายความแปรปรวนของข้อมูลที่เกิดขึ้นได้ถึงประมาณ 98.66% หมายความว่าแบบจำลองมีความแม่นยำสูงในการอธิบายผลลัพธ์จากการทดลอง การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ที่เกี่ยวข้องกับแบบจำลองผลผลิตนี้ได้นำเสนอไว้ในตารางที่ 10 โดยมีค่า p -value ที่ต่ำมาก (< 0.0001) และค่า F -value ที่สูงถึง 57.35 ซึ่งสนับสนุนความมีนัยสำคัญทางสถิติของแบบจำลองอย่างชัดเจน โดยทั่วไป ยิ่งค่า F -value สูงกว่ายูนิท แบบจำลองสามารถอธิบายความแปรปรวนของข้อมูลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และผลของปัจจัยที่ประมาณค่านั้นมีความเป็นจริง (real effect)

สมการที่ใช้แทนแบบจำลองของค่าผลผลิตกรดซิตริกแสดงไว้ในสมการที่ 8:

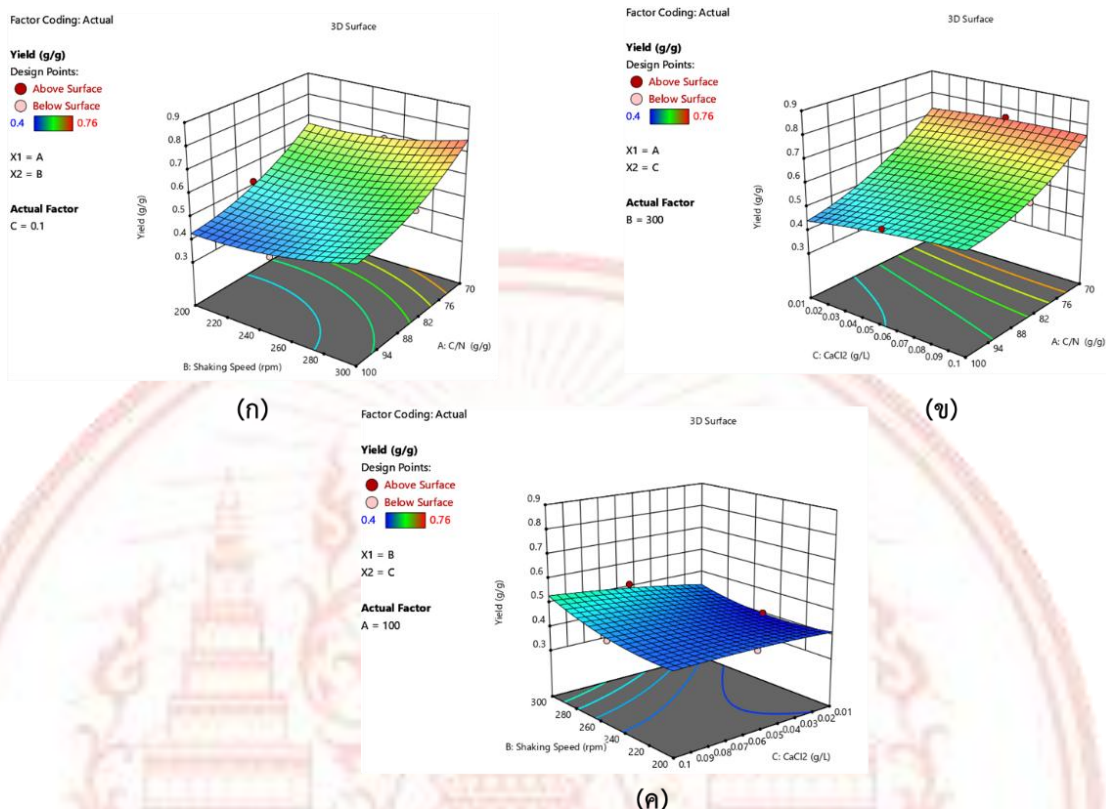
$$\text{Yield} = +3.57 - 0.05 * C/N - 5.82E-003 * \text{Shaking Speed} - 2.62 * CaCl_2 + 3.33E-006 * C/N * \text{Shaking Speed} + 0.02 * C/N * CaCl_2 + 7.78E-003 * \text{Shaking Speed} * CaCl_2 + 2.09E-004 * (C/N)^2 + 1.14E-005 * \text{Shaking Speed}^2 - 3.88 * CaCl_2^2 \quad (\text{สมการที่ 8})$$

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจากการลดรูปสมการถดถอยผลตอบสนองของผลผลิตที่ได้ (ANOVA for Reduced Quadratic model)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0.1619	9	0.018	57.35	< 0.0001	significant
A-C/N	0.013	1	0.013	41.32	0.0004	
B-Shaking Speed	0.0028	1	0.0028	8.93	0.0203	
C-CaCl ₂	0.0013	1	0.0013	4.05	0.0842	
AB	0	1	0	0.0797	0.7858	
AC	0.0009	1	0.0009	2.87	0.1341	
BC	0.0012	1	0.0012	3.91	0.0886	
A ²	0.0093	1	0.0093	29.66	0.001	
B ²	0.0037	1	0.0037	11.69	0.0112	
C ²	0.0003	1	0.0003	0.8594	0.3848	
Residual	0.0022	7	0.0003			

Lack of Fit	0.0017	3	0.0006	4.29	0.0965	not significant
Pure Error	0.0005	4	0.0001			
Cor Total	0.164	16				

จากผลการทดลองพบว่า ค่าผลผลิตของกรดซิตริกได้รับอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญจากอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) และความเร็วในการเขย่า โดยมีค่า *p-value* เท่ากับ 0.0004 และ 0.0203 ตามลำดับ รายละเอียดของปัจจัยทั้งสอง รวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน แสดงไว้ในตารางที่ 10 ค่าผลผลิตของกรดซิตริกที่สังเกตได้จากการทดลองมีความแปรปรวนอยู่ในช่วง 0.40–0.76 กรัมกรดซิตริกต่อกรัมกลูโคส (กรัมต่อกรัม) ดังแสดงในตารางที่ 8 อิทธิพลเชิงปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรกระบวนการต่อการสร้างกรดซิตริกแบบจับคู่ระหว่างสองตัวแปร (pairwise interaction) เสนอในภาพที่ 20 (ก-ค) โดยกราฟตอบสนองทั้งหมดมีลักษณะโค้งเว้า (*concave shape*) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุดที่เหมาะสมที่สุด (*optimum setpoint*) อยู่ภายในช่วงของการออกแบบการทดลองที่กำหนดไว้ จากภาพที่ 20 (ก) พบว่า ปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้น และระยะเวลาการหมัก (ให้ค่าผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดประมาณ 0.76 กรัมต่อกรัม ที่ระดับกลูโคสประมาณ 70 กรัมต่อลิตร และความเร็วการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที พร้อมทั้งเสริม CaCl_2 ที่ความเข้มข้น 0.055 กรัมต่อลิตร ในภาพที่ 20 (ข) และ ภาพที่ 20 (ค) พบลักษณะของปฏิสัมพันธ์ในทำนองเดียวกันเมื่อคงค่าความเร็วในการเขย่าไว้ที่ 250 รอบต่อนาที โดยมีการเปลี่ยนแปลงของ C/N และ CaCl_2 ภายในช่วงที่กำหนดในการทดลอง ซึ่งให้ค่าผลผลิตสูงสุดที่ประมาณ 0.76 กรัมต่อกรัมเช่นกัน



ภาพที่ 20 พื้นที่ผิวตอบสนองของผลผลิตที่ได้ (ก) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และความเร็วในการเขย่า (ข) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์ (ค) ความเร็วในการเขย่า และปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์

4.5 ผลการยืนยันสถานะเหมาะสมสูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการ

การศึกษาสถานะเหมาะสมสูงสุดในกระบวนการผลิตกรดซิตริกผ่านการออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคิน พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 97.93 กรัมต่อกรัม ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที และปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร เป็นสถานะการเพาะเลี้ยงที่สามารถผลิตกรดซิตริก และให้ผลผลิตสูงสุด ดังนั้นจึงยืนยันสถานะเหมาะสมสูงสุดในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 เพื่อผลิตกรดซิตริกในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 จากสภาวะดังกล่าวทั้งหมด 3 ขั้ว บันทึกรวมผลผลิตกรดซิตริก และผลผลิตที่ได้แสดงดังตารางที่ 11 พบว่าผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของกรดซิตริก ความเข้มข้นของน้ำตาล และมวลเซลล์ตามระยะเวลาที่ผ่านมา โดยเริ่มจากเวลา 0 ชั่วโมงจนถึง 384 ชั่วโมง จากการวัดกรดซิตริก พบว่าเริ่มต้นที่ 2.56 ± 0.02 กรัม/ลิตรในเวลา 0 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

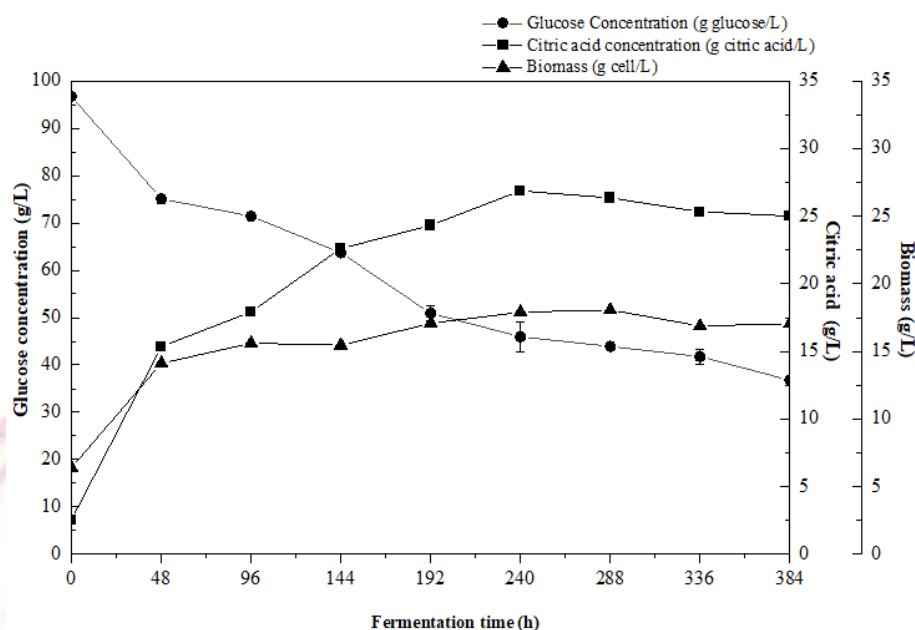
จนถึง 26.88 ± 0.01 กรัม/ลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการสะสมของกรดซิตริกในตัวอย่างอย่างต่อเนื่อง การเพิ่มขึ้นของกรดซิตริกนี้บ่งชี้ว่าเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 สามารถผลิตกรดซิตริกได้ตามระยะเวลา โดยอาจเกิดจากกระบวนการทางชีวภาพที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายน้ำตาล การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ 96.71 ± 0.84 กรัม/ลิตรในเวลา 0 ชั่วโมง และลดลงเหลือ 36.78 ± 0.14 กรัม/ลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง การลดลงของน้ำตาลนี้เป็นสัญญาณของการใช้น้ำตาลของเชื้อรา ซึ่งน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานหลักในการผลิตกรดซิตริก การเพิ่มขึ้นของมวลเซลล์จาก 6.40 ± 0.01 กรัม/ลิตรในเวลา 0 ชั่วโมงเป็น 17.40 ± 0.00 กรัม/ลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง ยังแสดงถึงการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเชื้อรา โดยมวลเซลล์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่มีการใช้สารอาหาร ดังแสดงภาพที่ 21 ซึ่งสอดคล้องกับกระบวนการผลิตกรดซิตริก การทดลองนี้สะท้อนให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริกอย่างชัดเจน ในระยะแรกของการศึกษา ความเข้มข้นของกรดซิตริกวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าผลลัพธ์ปริมาณกรดซิตริกที่ได้จาก HPLC สอดคล้องกับผลลัพธ์ที่ได้จากวิธีการไทเทรต โดยไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในความแม่นยำในการวัด ดังนั้น เพื่อลดความซับซ้อนของการสร้างแบบจำลองและการประเมินสมการจลนศาสตร์ จึงเลือกใช้วิธีการไทเทรตสำหรับการวิเคราะห์ในภายหลัง วิธีการนี้ช่วยให้การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลองมีประสิทธิภาพ ในขณะที่ยังคงรักษาความแม่นยำที่เชื่อถือได้ในการประเมินการผลิตกรดซิตริก นอกจากนี้ความชันของสารอาหารและออกซิเจนภายในไบโอรีแอคเตอร์อาจเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนเหล่านี้ เพื่อแก้ไขปัญหาเหล่านี้และเพิ่มความน่าเชื่อถือของข้อมูล ขอแนะนำให้ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะที่เหนือกว่า HPLC ให้การวัดปริมาณที่แม่นยำยิ่งขึ้น ลดข้อผิดพลาดในการวิเคราะห์ และปรับปรุงความสามารถในการทำซ้ำ ซึ่งช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือของข้อมูลการหมักได้อย่างมาก (Hagemann, 2018; Ibrahim et al., 2015)

อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองนี้แสดงว่ากระบวนการผลิตกรดซิตริกจาก *A. niger* TISTR 3063 ได้ดี โดยสามารถผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นตามเวลา การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลและมวลเซลล์ช่วยสนับสนุนความเข้าใจในกระบวนการนี้ และสามารถนำผลการทดลองนี้ในการปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการให้เหมาะสมที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถนำไปพัฒนากระบวนการ

ผลิตกรดซิตริกในอุตสาหกรรมได้ โดยอาจมีการทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดและการควบคุมตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริกในเชิงพาณิชย์.

ตารางที่ 11 ผลการยืนยันสภาวะเหมาะสมสูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการ

เวลา (ชม.)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ น้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)
0	2.56±0.02	94.71±0.84	6.40±0.01	0.07±0.00
48	15.36±0.00	75.08±0.95	14.12±0.01	0.19±0.00
96	17.92±0.02	71.42±0.46	15.60±0.006	0.22±0.00
144	22.61±0.01	63.66±0.78	15.46±0.01	0.24±0.00
192	24.32±0.01	50.88±1.57	17.07±0.01	0.34±0.01
240	26.88±0.01	45.98±3.19	17.90±0.01	0.39±0.03
288	26.35±0.06	43.89±0.23	18.07±0.01	0.41±0.00
336	25.32±0.01	41.76±1.62	16.88±0.01	0.40±0.02
384	25.01±0.02	36.78±0.14	17.04±0.00	0.46±0.00



ภาพที่ 21 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์ การใช้กลูโคส และการผลิตกรดซิตริกระหว่างการหมัก *A. niger* TISTR 3063 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 384 ชั่วโมง ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที

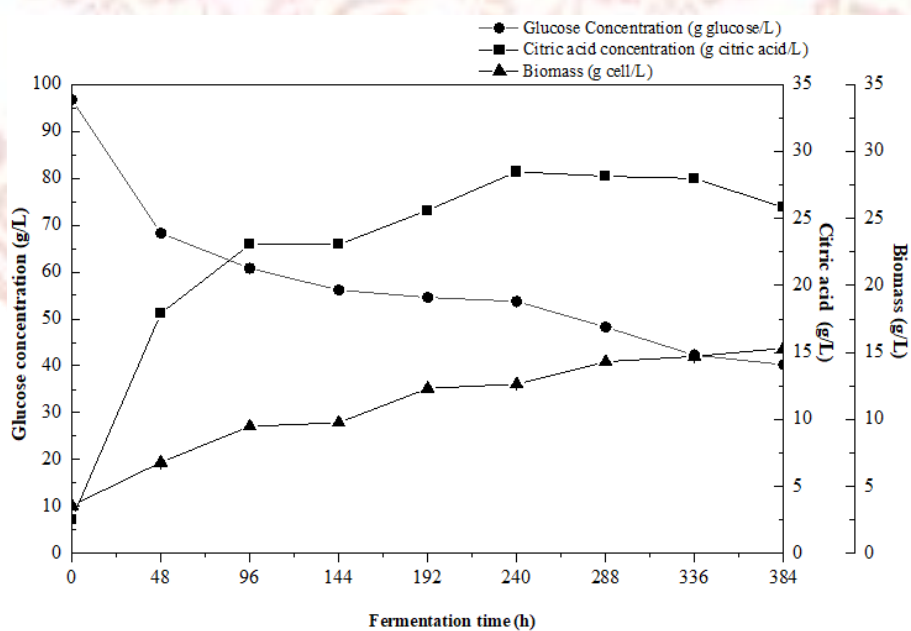
4.6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อราสายพันธุ์แอสเพอร์จิลลัส ลูซุเอนซิส (*A. luchuensis* SK01) เพื่อยืนยันสภาวะการผลิตกรดซิตริกในระดับห้องปฏิบัติการ

สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดซิตริกที่ได้จากเชื้อราสายพันธุ์ *A. luchuensis* SK01 โดยการใช้การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken) เพื่อหาค่าตัวแปรที่ดีที่สุดสำหรับกระบวนการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการมาใช้ในการผลิตกรดซิตริกโดยใช้เชื้อ *A. luchuensis* SK01 ผลการทดลองพบว่า อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่ 97.93 กรัม/กรัม ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที และปริมาตรของแคลเซียมคลอไรด์ที่ 0.1 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. luchuensis* SK01 เพื่อผลิตกรดซิตริกแสดงตารางที่ 12 ผลการทดลองพบว่าผลผลิตกรดซิตริกที่ได้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลาเริ่มต้นของการหมัก จาก 2.56 กรัม/ลิตรใน 0 ชั่วโมง ไปจนถึง 28.47 กรัม/ลิตรใน 240 ชั่วโมง และคงที่ในระดับประมาณ 25.81 กรัม/ลิตรใน 384 ชั่วโมง มวลเซลล์ในช่วงเวลาเดียวกันก็เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 3.58 กรัม/ลิตรใน 0 ชั่วโมง ไปจนถึง 15.30 กรัม/ลิตรใน 384 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของเชื้อรา ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่าเชื้อราใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานหลักในการผลิตกรดซิตริก โดยกลูโคสใน

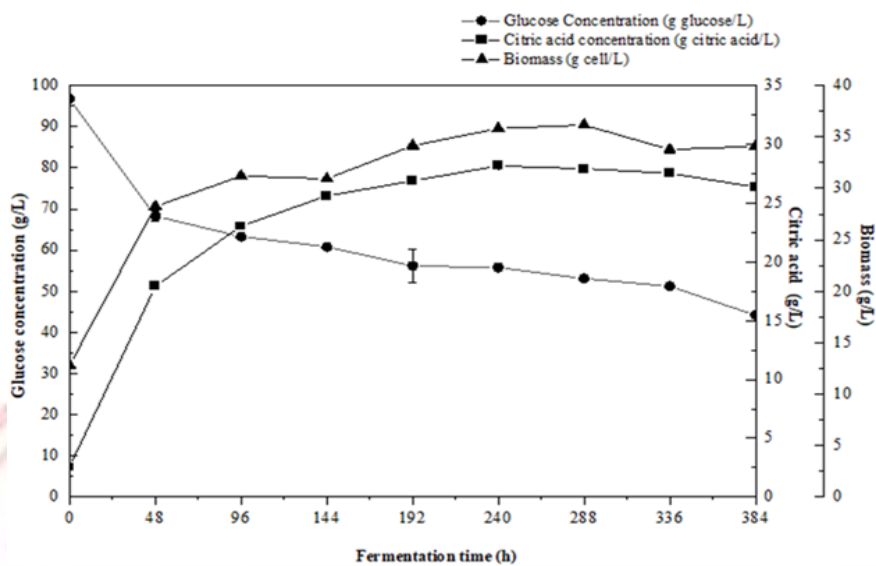
ปริมาณเริ่มต้นที่ 96.71 กรัม/ลิตรลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดการหมัก ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของกลูโคส ในระยะเวลา 384 ชั่วโมงเหลือเพียง 40.26 กรัม/ลิตร การเติมอาหารใหม่ในบางช่วงเวลา (เช่นใน 240 ชั่วโมง) ดังแสดงดังภาพที่ 22 มีผลทำให้ระดับกลูโคสเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ กลูโคสยังคงลดลงจนถึงสิ้นสุดการทดลอง การศึกษานี้ยืนยันว่าการเลือกตัวแปรที่เหมาะสมเช่น C/N ratio ความเร็วในการเขย่า และการใช้แคลเซียมคลอไรด์มีผลสำคัญในการเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกจาก เชื้อรา *A. luchuensis* SK01 ในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ยังคงต้องมีการศึกษาขั้นตอนเพิ่มเติมเพื่อเพิ่ม ผลผลิตกรดซิตริกในระยะยาวหลังจาก 240 ชั่วโมง แม้ผลการทดลองนี้จะได้ผลผลิตกรดซิตริกที่ดีใน ช่วงแรกๆ แต่การผลิตรกรดซิตริกในระยะยาวหลังจาก 240 ชั่วโมงไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Lotfy et al., 2007) สาเหตุมาจากการใช้กลูโคสที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่ง อาจเป็นผลจากการที่เชื้อราใช้กลูโคสอย่างเต็มที่ในการผลิตรกรดซิตริก การปรับปรุงวิธีการเติมอาหาร หรือการเพิ่มตัวแปรใหม่ในกระบวนการอาจช่วยเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกในระยะยาว เช่น การใช้แหล่ง พลังงานอื่นๆ หรือการปรับอัตราการเติมอาหารใหม่ให้เหมาะสม

ตารางที่ 12 จลพลศาสตร์การผลิตกรดซิตริกใช้สภาวะเหมาะสมสูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการของ *A. luchuensis* SK01

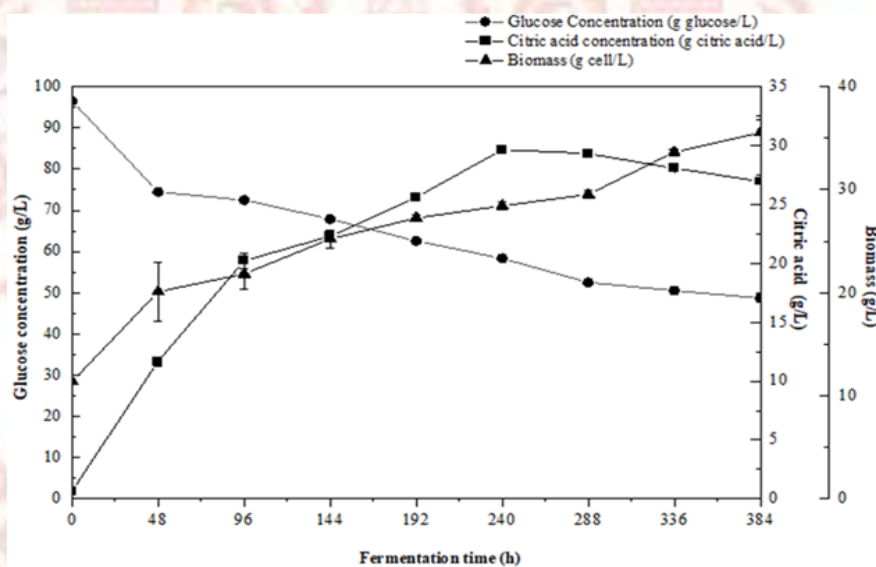
เวลา (ชม.)	กรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ น้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ (กรัมต่อกรัม)
0	2.56±0.01	96.71±0.01	3.58±0.00	0.04±0.00
48	17.92±0.00	68.26±0.01	6.80±0.01	0.10±0.00
96	23.04±0.01	60.78±0.01	9.48±0.01	0.16±0.00
144	23.05±0.01	56.14±0.00	9.76±0.01	0.17±0.00
192	255.06±0.01	54.57±0.01	12.32±0.01	0.23±0.01
240	28.47±0.01	53.71±0.01	12.64±0.01	0.24±0.03
288	28.14±0.06	48.26±0.01	14.30±0.02	0.30±0.00
336	27.96±0.12	42.25±0.02	14.70±0.00	0.35±0.02
384	25.81±0.01	40.26±0.00	15.30±0.02	0.38±0.00



ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์ การใช้กลูโคส และการผลิตกรดซิตริกระหว่างการหมัก *A. luchuensis* SK01 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 384 ชั่วโมง ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที



(ก)



(ข)

ภาพที่ 23 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์ การใช้กลูโคส และการผลิตกรดซิตริกระหว่างการหมักของเชื้อ (ก) *A. niger* TISTR 3063 และ (ข) *A. luchuensis* SK01 ที่สภาวะ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 384 ชั่วโมง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ตเสรีจ

4.7 ผลการศึกษาการผลิตกรดซิตริก และการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อราในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง

ผลการศึกษาการผลิตกรดซิตริก และการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อราในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 30°C ด้วยการกวน 300 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 384 ชั่วโมง โดยไม่ควบคุมค่า pH ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตกรดซิตริก ตามที่แสดงในภาพที่ 23 ก *A. niger* TISTR 3063 ในช่วงเวลาการหมักที่ 0 ชั่วโมงพบว่า การผลิตกรดซิตริกมีค่า 2.56 กรัมต่อลิตร และมีการใช้กลูโคส 96.71 กรัมต่อลิตร ในขณะที่มวลเซลล์อยู่ที่ 12.80 กรัมต่อลิตร. เมื่อการหมักดำเนินไปถึง 384 ชั่วโมง ค่าในการผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นเป็น 28.16 กรัมต่อลิตร โดยมีการใช้กลูโคส 44.15 กรัมต่อลิตร และมวลเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 34.08 กรัมต่อลิตร. และ ภาพที่ 23 ข *A. luchuensis* SK01 ผลผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นจาก 0.67 กรัมต่อลิตร เป็น 29.64 กรัมต่อลิตร การลดลงของกลูโคสจาก 96.48 กรัมต่อลิตร เป็น 48.66 กรัมต่อลิตร และมวลเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 25.31 กรัมต่อลิตร เป็น 45.88 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 มีการเจริญเติบโตที่ดี โดยมีการเพิ่มขึ้นของมวลเซลล์ที่สอดคล้องกับการใช้น้ำตาลกลูโคสและการผลิตกรดซิตริก การเพิ่มขึ้นของกรดซิตริกในทั้งสองเชื้อรา มีแนวโน้มในทางบวกตามระยะเวลาการหมัก ผลการวิจัยสอดคล้องกับรายงานของ (Amenaghawon & Aisien, 2012) ซึ่งสังเกตเห็นการลดลงของปริมาณน้ำตาลที่เหลือคล้ายคลึงกัน ที่ปริมาณน้ำตาลช่วงเริ่มต้นการหมัก 3.032 กรัมต่อลิตร และลดลงเหลือ 0.152 กรัมต่อลิตร ในช่วงสิ้นสุดการหมัก หลังจาก 120 ชั่วโมง และสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดประมาณ 2.7 กรัมต่อลิตร เนื่องจากการก่อตัวของกรดซิตริกจากการบริโภคน้ำตาลของแป้งข้าวโพดไฮโดรไลเซต

ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์เจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่ามวลเซลล์ *A. niger* TISTR 3063 เพิ่มขึ้นจาก 12.80 กรัมเซลล์/ลิตรในระยะเริ่มต้นเป็น 35.80 กรัมเซลล์/ลิตร หลังจากผ่านไปประมาณ 240 ชั่วโมง ในขณะที่ *A. luchuensis* SK01 มีมวลเซลล์เริ่ม 25.30 กรัมต่อลิตร มวลเซลล์สูงสุด 45.88 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ลดลงเล็กน้อยในช่วงท้าย ในขณะที่การเจริญเติบโตช้าลงระหว่าง 192 ถึง 384 ชั่วโมง การลดลงที่สังเกตได้มักเกิดจากการใช้สารตั้งต้นจนหมด และอาจเกิดจากกรดซิตริกในระดับสูงซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อกรดซิตริกสะสมมากเกินไป (Bennett, 2007) ซึ่งอาจ

ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ที่หมัก พารามิเตอร์สำคัญในการเจริญเติบโตของมวลเซลล์ แสดงดังตารางที่ 13 *A. niger* TISTR 3063 มีอัตราการเติบโตสูงสุด ($\mu_{\max}$) เท่ากับ 0.01 h^{-1} ขณะที่ *A. luchuensis* SK01 มี $\mu_{\max}$ เท่ากับ 0.01 h^{-1} อีกพารามิเตอร์สำคัญค่าอัตราการผลิตมวลเซลล์ต่อปริมาณกลูโคสที่ใช้ ($Y_{x/s}$) ของ *A. luchuensis* SK01 มีค่าเท่ากับ 0.430 กรัม/กรัมกลูโคส ซึ่งสูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 ที่มีค่า $Y_{x/s}$ เท่ากับ 0.405 กรัม/กรัมกลูโคส จากผลการบ่งชี้ว่า *A. luchuensis* SK01 ใช้กลูโคสในการผลิตมวลเซลล์ได้มีประสิทธิภาพดีกว่า ผลการทดลองสอดคล้องกับผลการวิจัยของ (Amenaghawon & Aisien, 2012) ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของเซลล์เชื้อราเพิ่มขึ้นในช่วงเริ่มต้นของการหมักจนถึงค่าสูงสุด หลังจากนั้นความเข้มข้นจะลดลง แนวโน้มการลดลงของความเข้มข้นมักเกิดจากการหมดลงของสารตั้งต้น และสารพิษและกรดซิตริกสะสม จึงทำให้การเจริญของเซลล์ถูกยับยั้งและบางส่วนตาย ซึ่งสอดคล้องกับตารางที่ 13 ซึ่งแสดงพารามิเตอร์จลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตกรดซิตริกในกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ แสดงดังตารางที่ 20 และ 21 (ภาคผนวก) อัตราการเจริญเติบโตของ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 (r_x) เริ่มต้นที่ 0.32 กรัมเซลล์/ลิตร/ชั่วโมง และ 0.14 กรัมเซลล์/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้นค่อยๆ ลดลง อัตราการบริโภคน้ำตาล (r_s) และอัตราการผลิตกรดซิตริก (r_p) ก็เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการหมักเช่นกัน และอัตราการผลิตเซลล์ (q_x) ปริมาณการบริโภคน้ำตาลต่อเซลล์ (q_s) และปริมาณการผลิตกรดซิตริกต่อเซลล์ (q_p) ก็เปลี่ยนแปลงเช่นกัน ข้อมูลเหล่านี้สามารถนำมาใช้ปรับปรุงและควบคุมกระบวนการหมักเพื่อเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 13 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01

สายพันธุ์เชื้อรา	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g cell / g glucose)	$Y_{p/s}$ (g citric acid / g glucose)	$Y_{p/x}$ (g citric acid / g cell)	td (h)	Productivity (Citric acid) (g/L/h)	Productivity (Biomass) (g/L/h)
<i>A. niger</i> TISTR 3063	0.011	0.405	0.487	1.203	63.000	0.067	0.081
<i>A. luchuensis</i> SK01	0.009	0.430	0.606	1.409	76.531	0.101	0.143

ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดซิตริกในในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จพบว่า การผลิตกรดซิตริกมีความสัมพันธ์เกือบเป็นเส้นตรงกับการเจริญเติบโตของเซลล์ตั้งแต่เริ่มต้นการหมัก จนถึงประมาณ 240 ชั่วโมง ซึ่งบ่งชี้ว่าการผลิตกรดซิตริกมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์ จุลินทรีย์ การกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 มีรูปแบบการเพิ่ม คล้ายกัน โดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและเมื่อถึงจุดที่ปริมาณกรดสูงสุดแล้ว หลังจากนั้นจะคงที่ และลดลงหลังจาก 240 ชั่วโมง พบว่าค่าการกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3063 จาก 2.56 กรัม/ ลิตร ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่ 28.16 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นจะคงที่และลดลงหลังจาก 240 ชั่วโมง ส่วน *A. luchuensis* SK01 มีปริมาณกรดเริ่มที่ 0.67 กรัมต่อลิตร และผลิตกรดได้สูงสุดที่ 29.64 กรัม ต่อลิตร ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับของ Nadeem และคณะ (2010) ซึ่งรายงานการลดลงของ การผลิตกรดซิตริกที่คล้ายคลึงกันหลังจากถึงจุดสูงสุด (Al-Sheri & Mostafa, 2006; Alvarez- Vasquez et al., 2000; Arzumanov et al., 2000) พบว่าผลผลิตกรดซิตริกลดลงเนื่องจากการ เจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ลดลงในการหมักหลังจาก 96 ชั่วโมง เนื่องจากการก่อตัวของกรดซิตริกมี ความเชื่อมโยงอย่างใกล้ชิดกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ การลดลงนี้อาจเกิดจากผล การยับยั้งจากความเข้มข้นของกรดซิตริกที่สูง ระดับไนโตรเจนที่ลดลงในอาหารหมัก และการใช้แหล่ง น้ำตาล ส่วนพารามิเตอร์อัตราการผลิตกรดซิตริกต่อกลูโคสที่ใช้ ($Y_{p/s}$) ของ *A. luchuensis* SK01 มี ค่าสูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 ที่ 0.549 กรัม/กรัมกลูโคส เมื่อเทียบกับ 0.453 กรัม/กรัมกลูโคส ซึ่ง แสดงให้เห็นว่า *A. luchuensis* SK01 มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริกสูงกว่า และอีกพารามิเตอร์ สำคัญคืออัตราการผลิตกรดซิตริกต่อมวลเซลล์ที่ผลิตได้ ($Y_{p/x}$) ดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่า *A. luchuensis* SK01 มีค่าเท่ากับ 1.088 กรัมต่อ 1 กรัมเซลล์ เมื่อเทียบ *A. niger* TISTR 3063 ที่มี ค่าเท่ากับ 1.118 กรัมต่อกรัมเซลล์ แสดงให้เห็นว่า *A. luchuensis* SK01 สามารถผลิตกรดซิตริกได้ ในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับมวลเซลล์ที่ผลิต โดยที่ค่าเวลาที่เซลล์ใช้เพิ่มจำนวนจากเดิมเป็น 2 เท่า (td) แสดงถึงเวลาที่เชื้อราใช้ในการแบ่งตัว พบว่า *A. niger* TISTR 3063 มีค่า td เท่ากับ 60.83 ชั่วโมง ส่วน *A. luchuensis* SK01 ที่มีค่า td เท่ากับ 76.86 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *A. niger* TISTR 3063 มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่า *A. luchuensis* SK01 และ อัตราการผลิต พบว่า *A. luchuensis* SK01 มีอัตราผลิตกรดซิตริกและมวลเซลล์สูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 ซึ่งมีอัตรา ผลิตกรดซิตริกที่ 0.107 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และอัตราผลิตมวลเซลล์ที่ 0.081 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ขณะที่

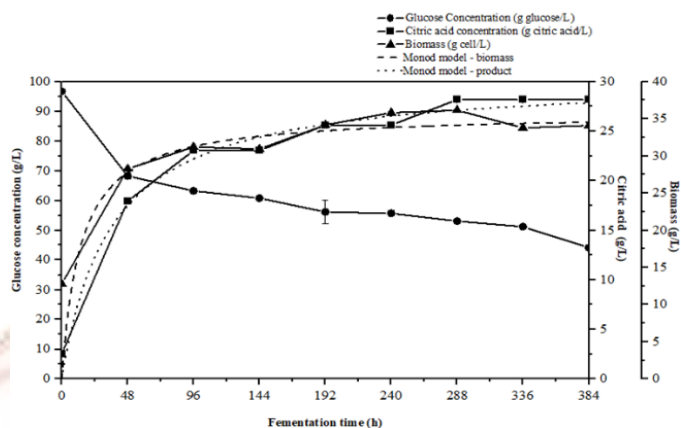
A. luchuensis SK01 มีอัตราผลิตกรดซิตริกที่ 0.121 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และอัตราผลิตมวลเซลล์ที่ 0.063 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *A. luchuensis* SK01 มีอัตราการผลิตทั้งกรดซิตริกและมวลเซลล์ที่สูงกว่า

4.8 ผลการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดซิตริกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ

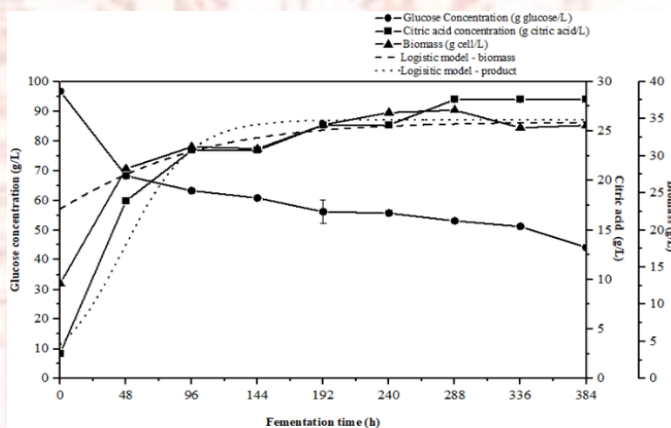
ผลการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเหมาะสมของโมเดลทางคณิตศาสตร์ในการอธิบายพฤติกรรมของการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ในกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ โดยใช้โมเดลสามตัว ได้แก่ แบบจำลองโมนอด แบบจำลองโลจิสติก และแบบจำลองคอมเพิร์ตซ์ เพื่อคาดการณ์อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา การใช้ซับสเตรต และการผลิตกรดซิตริก ดังในภาพที่ 24 และ 25 โดยการประมาณค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญ เช่น อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด ($\mu_{\max}$) ความสัมพันธ์ของซับสเตรต (K_S) และค่าความแม่นยำของการจับคู่ข้อมูล (R^2_b สำหรับโมซีเลียมและ R^2_p สำหรับผลิตภัณฑ์) ดังแสดงในตารางที่ 14 ผลการทดลองพบว่าแบบจำลองโมนอด ของ *A. niger* TISTR 3063 ให้ค่า $\mu_{\max}$ ที่สูงที่สุดที่ 35.78 h^{-1} และ $P_{\max}$ ที่ 30.43 กรัมต่อลิตร แต่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มวลเซลล์ R^2_b (0.623) ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับโมเดลอื่น ๆ ซึ่งแสดงว่าโมเดลนี้ไม่เหมาะสมกับข้อมูลการเจริญเติบโตของโมซีเลียมได้ด้นัก ส่วน *A. luchuensis* SK01 พบว่า $\mu_{\max} = 45.88 \text{ h}^{-1}$ และ $P_{\max} = 30.20$ กรัมต่อลิตร แต่มีความผันผวนสูงในค่าของ K_S (134.96 ± 226.959) โดย $R^2_b = 0.493$ และ $R^2_p = 0.983$ ซึ่งบ่งชี้ถึงการปรับพารามิเตอร์ที่ไม่สมบูรณ์หรือมีความแปรปรวนมากกว่า ขณะที่ แบบจำลองโลจิสติก ให้ค่า $\mu_{\max}$ และ $P_{\max}$ ของ *A. niger* TISTR 3063 อยู่ที่ 34.56 h^{-1} และ 26.13 กรัมต่อลิตร โดยมี $c = 0.680$ และ $R^2_p = 0.963$ ส่วน *A. luchuensis* SK01 มีค่า $\mu_{\max} 36.03 \text{ h}^{-1}$ และ $P_{\max} 28.21$ กรัมต่อลิตร โดยมี $R^2_b = 0.988$ และ $R^2_p = 0.996$ ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำสูงในข้อมูลการจับคู่ และแบบจำลองคอมเพิร์ตซ์พบว่า *A. niger* TISTR 3063 ค่า $\mu_{\max}$ อยู่ที่ 34.56 h^{-1} และ $P_{\max} 27.18$ กรัมต่อลิตร โดยมีค่า $R^2_b = 0.678$ และ $R^2_p = 0.996$ ในขณะที่ *A. luchuensis* SK01 แสดงผล $\mu_{\max}$ ที่ 38.26 h^{-1} และ $P_{\max}$ ที่ 28.28 กรัมต่อลิตร โดย $R^2_b = 0.990$ และ $R^2_p = 0.995$ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Gompertz model สามารถจับความสัมพันธ์ของข้อมูลได้ดี

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า Logistic model และ Gompertz model ให้ค่าความแม่นยำสูงในทั้งสองสายพันธุ์ โดย Gompertz model มีค่า R^2_p สูงถึง 0.995 และ Logistic model ให้ค่า R^2_p ที่ 0.996 ซึ่งบ่งชี้ว่าโมเดลทั้งสองสามารถอธิบายพฤติกรรมของการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิตริกได้ดีที่สุด โดย Gompertz model สามารถจับลักษณะการเจริญเติบโตแบบ S-curve ทำให้เหมาะสำหรับ

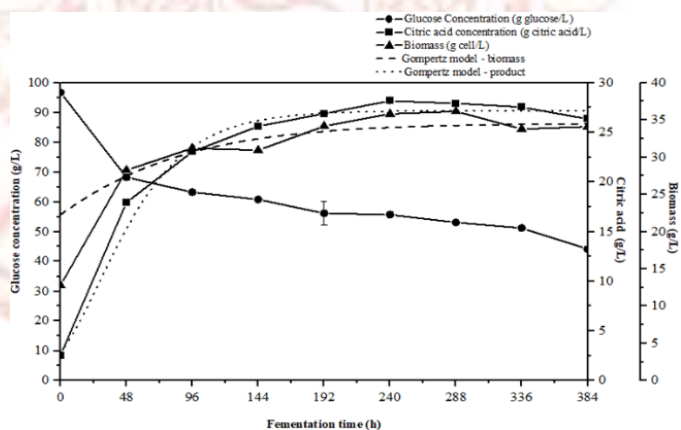
กระบวนการสร้างแบบจำลองที่เกี่ยวข้องกับช่วงการปรับตัวเริ่มต้น ตามด้วยการเติบโตอย่างรวดเร็ว และในช่วงท้ายจะช้าลงเมื่อระบบถึงจุดอิ่มตัว ทั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริก และมีการพยากรณ์ที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ Monod และ Logistic models ทั้งนี้ การเลือกใช้โมเดลที่เหมาะสมและการประเมินค่าพารามิเตอร์ที่แม่นยำจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการหมักและการผลิตกรดซิตริก โดยสามารถคำนวณและควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยล่าสุดของ Ghovvati et al., 2015 ซึ่งประยุกต์ใช้แบบจำลอง Andrews เพื่ออธิบายผลการยับยั้งสารตั้งต้นในเชื้อรา *Aspergillus* ระหว่างกระบวนการหมักกรดซิตริก ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าแบบจำลอง Andrews ให้ค่าการจับที่ดีกว่าแบบจำลองโมโนดแบบดั้งเดิม โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูง (Baei et al., 2008) ในทำนองเดียวกัน Chaleewong et al., 2022 ได้ใช้แบบจำลองไฮบริด Contois-Gompertz แบบผสม เพื่อบันทึกการเจริญเติบโตของชีวมวลและการก่อตัวของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการผลิตแบบเบ็ดเสร็จของเชื้อราเส้นใย ซึ่งเน้นย้ำถึงความสำคัญของการคำนึงถึงการดูดซึมสารตั้งต้นที่ขึ้นอยู่กับชีวมวล (Chaleewong et al., 2022) การศึกษาเหล่านี้เน้นย้ำถึงลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปของการสร้างแบบจำลองจลนศาสตร์ในการวิจัยการหมัก โดยแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองไฮบริดหรือแบบจำลองที่ปรับปรุงแล้วมักมีประสิทธิภาพดีกว่าแบบจำลองแบบดั้งเดิม ด้วยการรวมปรากฏการณ์ทางชีววิทยาที่ซับซ้อน เช่น การยับยั้ง การรวมตัวของชีวมวล และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา แบบจำลองขั้นสูงเหล่านี้จึงให้ภาพพลวัตของการหมักที่ครอบคลุมและแม่นยำยิ่งขึ้น



(ก)

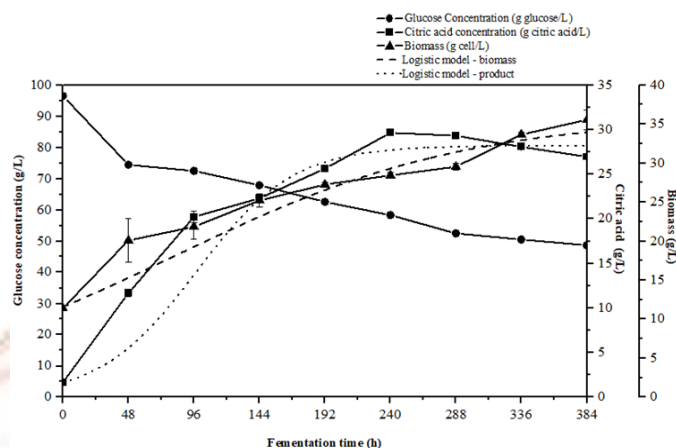


(ข)

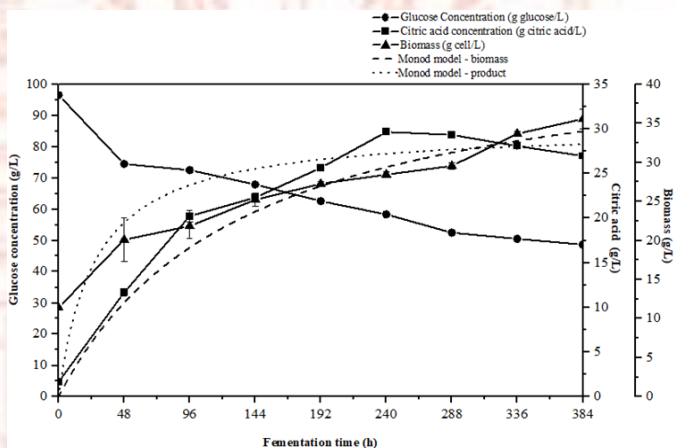


(ค)

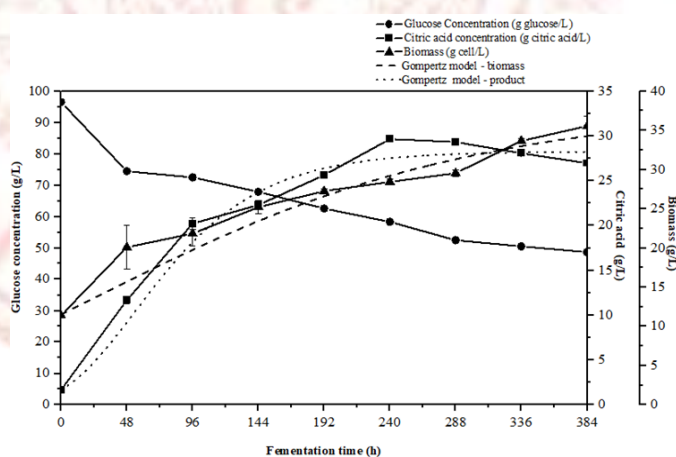
ภาพที่ 24 การประมาณค่าของแบบจำลอง (ก) แบบจำลองโมนอด (ข) แบบจำลองโลจิสติก และแบบจำลอง (ค) แบบจำลองกอมเพิร์ตซ์ ให้เข้ากับความเข้มข้นของสารตั้งต้น ชีวมวล และผลิตภัณฑ์โดย *A. niger* TISTR 2365 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเบ็ดเสร็จขนาด 5 ลิตร



(ก)



(ข)



(ค)

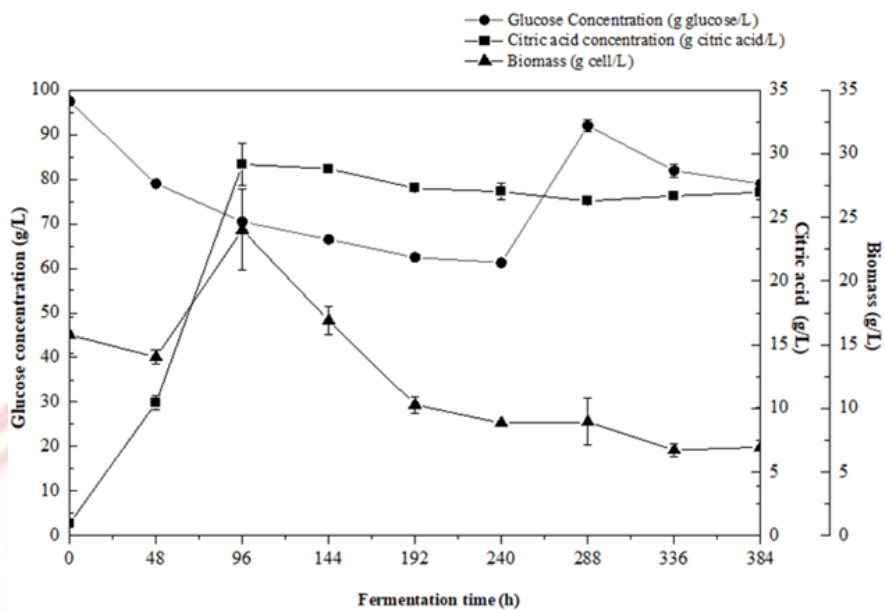
ภาพที่ 25 การประมาณค่าของแบบจำลอง (ก) แบบจำลองโมโนด (ข) แบบจำลองโลจิสติก และแบบจำลอง (ค) แบบจำลองกอมเพิร์ตซ์ ให้เข้ากับความสัมพันธ์ของสารตั้งต้น ซีวมวล และผลิตภัณฑ์ โดย *A. luchuensis* SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 14 ค่าพารามิเตอร์จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

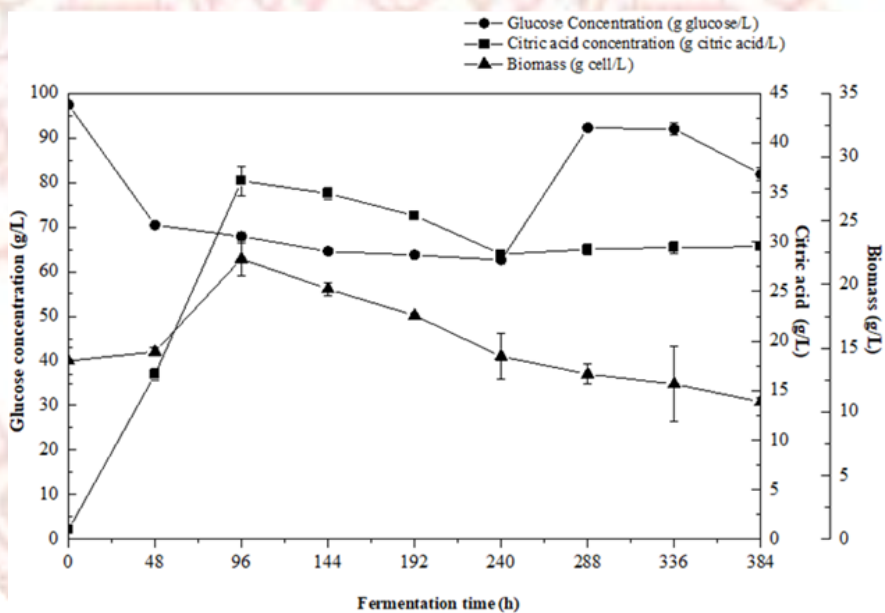
สายพันธุ์เชื้อรา	สมการ	$\mu_{\max}$ h^{-1}	$P_{\max}$ g/L	K_s g/L	R^2_b	R^2_p
<i>A. niger</i> TISTR 3063	Monod	35.78±0.93	30.43±1.61	35.63	0.623	0.978
<i>A. luchuensis</i> SK01		45.88±26.40	30.20±3.96	134.96±226.959	0.493	0.983
<i>A. niger</i> TISTR 3063	Logistic	34.56±0.80	26.13±0.93	-	0.680	0.963
<i>A. luchuensis</i> SK01		36.03±2.04	28.21±0.65	-	0.988	0.996
<i>A. niger</i> TISTR 3063	Gompertz	34.56±0.82	27.18±0.48	-	0.678	0.996
<i>A. luchuensis</i> SK01		38.26±2.93	28.28±0.78	-	0.990	0.995

R^2_b : ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์พหุคูณ

R^2_p : ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ผลิตภัณฑ์



(ก)



(ข)

ภาพที่ 26 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์ การใช้กลูโคส และการผลิตกรดซิตริกระหว่างการหมักของเชื้อ (ก) *A. niger* TISTR 3063 และ (ข) *A. luchuensis* SK01 ที่สภาวะ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 384 ชั่วโมง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบก่อกวน

4.9 ผลการศึกษาการผลิตกรดซิตริก และการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อราในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง

ผลการศึกษาการผลิตกรดซิตริกและการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 30°C ด้วยการกวน 300 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 384 ชั่วโมง โดยมีการเติมอาหารใหม่ที่ชั่วโมง 240 และไม่ควบคุมค่า pH แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญในการผลิตกรดซิตริก การใช้กลูโคส และการเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์ตลอดระยะเวลาในการหมัก ตามที่แสดงในภาพที่ 26 ก ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. niger* TISTR 3063 พบว่า การผลิตกรดซิตริกเริ่มต้นจาก 0.97 กรัม/ลิตรในเวลา 0 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึง 26.95 กรัม/ลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง โดยกรดซิตริกจะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเริ่มต้นและคงที่ในช่วงสุดท้าย. ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่ 97.41 กรัม/ลิตรและลดลงในระหว่างกระบวนการหมัก จนถึง 78.98 กรัม/ลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง. ในส่วนของมวลเซลล์แห้งเริ่มจาก 15.78 กรัม/ลิตรในเวลา 0 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นเป็น 24.00 กรัม/ลิตรในเวลา 96 ชั่วโมง ก่อนที่จะลดลงเหลือ 6.96 กรัม/ลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง. ส่วนผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. luchuensis* SK01 ภาพที่ 26 ข พบว่าการผลิตกรดซิตริกเริ่มจาก 0.96 กรัม/ลิตรในเวลา 0 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นถึง 29.52 กรัม/ลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง. ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่ 97.41 กรัม/ลิตร และลดลงเป็น 81.89 กรัม/ลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง. มวลเซลล์แห้งเริ่มต้นที่ 14.00 กรัม/ลิตรและเพิ่มขึ้นเป็น 22.00 กรัม/ลิตรในเวลา 96 ชั่วโมง ก่อนที่จะลดลงเหลือ 10.78 กรัม/ลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงการผลิตกรดซิตริกที่มีประสิทธิภาพจากทั้งสองเชื้อรา โดยแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริก การใช้กลูโคส และการเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์ในกระบวนการหมักภายใต้สภาวะการหมัก

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ในการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตรภายใต้สภาวะที่ควบคุมโดยกรดซิตริกจากทั้งสองเชื้อราเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในระยะเริ่มต้นและคงที่ในช่วงท้ายหลังจากการเติมอาหารใหม่ที่ชั่วโมง 240 ซึ่งช่วยเพิ่มกรดซิตริกเล็กน้อยในช่วงสุดท้าย การใช้กลูโคสในกระบวนการหมักเริ่มต้นจาก 97.41 กรัม/ลิตรในทั้งสองเชื้อราและลดลงตามระยะเวลาในการผลิตกรดซิตริก โดยการเติมอาหารใหม่ที่ชั่วโมง 240 ช่วยเพิ่มระดับกลูโคสเล็กน้อยแต่ก็ยังคงลดลงต่อไป

จนถึงเวลา 384 ชั่วโมง การเติมอาหารใหม่ช่วยให้การผลิตกรดซิตริกในช่วงสุดท้ายของการหมักยังคงมีอัตราที่ดีขึ้น สำหรับมวลเซลล์แห้ง การทดลองแสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของเชื้อราในช่วงเริ่มต้น โดยมวลเซลล์สูงสุดในเวลา 96 ชั่วโมงก่อนที่จะลดลงในช่วงสุดท้ายของการหมัก ซึ่งบ่งชี้ว่าเมื่อสารอาหารเริ่มหมด เชื้อราจะมีการเจริญเติบโตที่ช้าลงและมวลเซลล์เริ่มคงที่หรือลดลง การทดลองนี้ไม่ได้ควบคุมค่า pH ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อการผลิตกรดซิตริก เนื่องจาก pH มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริก การควบคุมค่า pH ในการทดลองครั้งถัดไปอาจช่วยให้การผลิตกรดซิตริกมีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยสามารถรักษาสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริกที่สูงสุด. (Crolla & Kennedy, 2004)

ผลการศึกษาจากงานพลศาสตร์เจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่ามวลเซลล์ *A. niger* TISTR 3063 เพิ่มขึ้นจาก 15.78 กรัมเซลล์/ลิตรในระยะเริ่มต้น เพิ่มขึ้นเป็น 24.00 กรัมเซลล์/ลิตร หลังจากผ่านไปประมาณ 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็ลดลงเหลือ 6.96 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 384 ในขณะที่ *A. luchuensis* SK01 มีมวลเซลล์เริ่ม 14.00 กรัมต่อลิตร มวลเซลล์สูงสุด 22.00 กรัมต่อลิตร หลังจากผ่านไป 96 ชั่วโมง ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ลดลงในช่วงท้าย ในขณะที่การเจริญเติบโตของมวลเซลล์ลดลงระหว่าง 144 ถึง 384 ชั่วโมง การลดลงที่สังเกตได้มักเกิดจากการใช้สารตั้งต้นจนหมด และอาจเกิดจากกรดซิตริกในระดับสูงซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อกรดซิตริกสะสมมากเกินไป (Bennett, 2007) ซึ่งอาจยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ที่หมัก มีรายงานว่า การเติมแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) 0.5 กรัมต่อลิตรลงในอาหารหมักช่วยลดมวลเซลล์ของชีวมวลลงประมาณ 35% ซึ่งบ่งชี้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อราลดลง (Pera & Callieri, 1997) อย่างไรก็ตาม การเติมแคลเซียมคลอไรด์นี้ช่วยเพิ่มการดูดซึมฟอสเฟตและซูโครสได้อย่างมีนัยสำคัญถึง 35% และการผลิตกรดซิตริกได้ 50% แสดงให้เห็นว่า CaCl_2 อาจยับยั้งการสะสมชีวมวลของเชื้อรา แต่กลับส่งผลดีต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม นำไปสู่การสังเคราะห์กรดซิตริกและการใช้สารตั้งต้นที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้แคลเซียมไอออนมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตและการปกป้องเซลล์จากความเครียดต่างๆ โดยเฉพาะในการปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์จากความเสียหาย และช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านทานความเครียดจากปัจจัยภายนอก เช่น ความเครียดจากเอทานอล กรดอ่อน และความเครียดจากออกซิเจน และ CaCl_2 (แคลเซียมคลอไรด์) ยังสามารถทำให้มวลเซลล์เกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน (aggregation) ได้ แคลเซียมไอออนจาก CaCl_2 มีบทบาทในการส่งเสริมการจับตัวของเซลล์โดยการช่วยให้เซลล์มีความสามารถในการ

เชื่อมต่อกันมากขึ้น (oxidative stress) (Rachman et al., 2021) พารามิเตอร์สำคัญในการเจริญเติบโตของมวลเซลล์ แสดงดังตาราง 15 *A. niger* TISTR 3063 มีอัตราการเติบโตสูงสุด ($\mu_{\max}$) เท่ากับ 0.01 h^{-1} ขณะที่ *A. luchuensis* SK01 มี $\mu_{\max}$ เท่ากับ 0.01 h^{-1} อีกพารามิเตอร์สำคัญค่าอัตราการผลิตมวลเซลล์ต่อปริมาณกลูโคสที่ใช้ ($Y_{x/s}$) ของ *A. luchuensis* SK01 พบว่าผลิตมวลเซลล์เริ่มต้น 14 กรัมต่อลิตร และลดลงเหลือ 10.78 กรัมต่อลิตรในช่วงท้ายของการหมัก ส่วนค่า $Y_{x/s}$ ของ *A. niger* TISTR 3063 มีการผลิตมวลเซลล์ลดลงเช่นกันมวลเซลล์เริ่มที่ 15.78 กรัมต่อลิตร และในช่วงสุดท้ายลดเหลือ 6.96 กรัมต่อลิตร จากผลการบ่งชี้ว่า *A. luchuensis* SK01 และ *A. niger* TISTR 3063 มีการผลิตเซลล์ได้น้อย หลังจากนั้นความเข้มข้นจะลดลง ตารางที่ 15 ซึ่งแสดงพารามิเตอร์จลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตกรดซิตริกในกระบวนการหมักแบบป้อน แสดงดังตารางที่ 22 และ 23 (ภาคผนวก) อัตราการผลิตกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 (r_p) เริ่มต้นที่ 0.20 กรัมเซลล์/ลิตร/ชั่วโมง และ 0.33 กรัมเซลล์/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้นค่อยๆ ลดลง อัตราการบริโภคน้ำตาล (r_s) และอัตราการเจริญเติบโต (r_x) ก็เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการหมักเช่นกัน และอัตราการผลิตเซลล์ (q_x) ปริมาณการบริโภคน้ำตาลต่อเซลล์ (q_s) และปริมาณการผลิตกรดซิตริกต่อเซลล์ (q_p) ก็เปลี่ยนแปลงเช่นกัน ข้อมูลเหล่านี้สามารถนำมาใช้ปรับปรุงและควบคุมกระบวนการหมักเพื่อเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 15 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01

สายพันธุ์เชื้อรา	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g cell / g glucose)	$Y_{p/s}$ (g citric acid / g glucose)	$Y_{p/x}$ (g citric acid / g cell)	td (h)	Productivity (Citric acid) (g/L/h)	Productivity (Biomass) (g/L/h)
<i>A. niger</i> TISTR 3063	0.01	-0.18	0.52	-2.92	80.01	0.29	0.09
<i>A. luchuensis</i> SK01	0.01	-0.07	0.63	-8.86	100.40	0.37	0.08

ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดซิตริกในในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อนพบว่า การกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 มีรูปแบบการเพิ่มคล้ายกัน โดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและเมื่อถึงจุดที่ปริมาณกรดสูงสุดแล้ว หลังจากนั้นจะคงที่และลดลงหลังจาก 96 ชั่วโมง พบว่าค่าการกรดซิตริกของ *A. niger* TISTR 3063 จาก 0.97 กรัม/ลิตร ปริมาณกรดซิตริกสูงสุดที่ 29.16 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นจะคงที่และลดลงหลังจาก 96 ชั่วโมง และเมื่อมีการเติมอาหารใหม่ที่ชั่วโมงที่ 240 มีการผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 384 ส่วน *A. luchuensis* SK01 มีปริมาณกรดเริ่มที่ 0.96 กรัมต่อลิตร และผลิตกรดได้สูงสุดที่ 36.16 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 96 และหลังจากนั้นค่อยๆลดลง และหลังจากมีการเติมอาหารใหม่ที่ 240 ชั่วโมงมีปริมาณกรดซิตริกเพิ่มขึ้นตามการเติมอาหารใหม่ เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดซิตริกของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อนสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงกว่าในสภาวะถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ สอดคล้องกับงานวิจัย (Song et al., 2010) การใช้ระบบหมักแบบป้อน ช่วยเพิ่มการผลิตกรดบิวตริกจากการลดการยับยั้งจากสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่สะสมในถังหมัก โดยการเติมกลูโคสอย่างต่อเนื่องทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถผลิตกรดบิวตริกได้ถึง 73 กรัมต่อลิตร ภายใน 52 ชั่วโมง ในขณะที่อัตราการผลิตกรดบิวตริกอยู่ที่ 1.41 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าเมื่อทำการหมักแบบเบ็ดเสร็จ พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องแสดงดังตารางที่ 15 อัตราการผลิตกรดซิตริกต่อกลูโคสที่ใช้ ($Y_{p/s}$) ของ *A. luchuensis* SK01 มีค่าสูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 ที่ 0.63 กรัมต่อกรัมกลูโคส เมื่อเทียบกับ 0.52 กรัมต่อกรัมกลูโคส ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *A. luchuensis* SK01 มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริกสูงกว่า และอีกพารามิเตอร์สำคัญคืออัตราการผลิตกรดซิตริกต่อมวลเซลล์ที่ผลิตได้ ($Y_{p/x}$) ดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่า *A. luchuensis* SK01 มีค่าเท่ากับ -8.86 กรัมต่อ 1 กรัมเซลล์ เมื่อเทียบ *A. niger* TISTR 3063 ที่มีค่าเท่ากับ -2.92 กรัมต่อกรัมเซลล์ แสดงให้เห็นว่า *A. luchuensis* SK01 สามารถผลิตกรดซิตริกได้ในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับมวลเซลล์ที่ผลิต โดยที่ค่า t_d พบว่า *A. niger* TISTR 3063 มีค่า t_d เท่ากับ 80.011 ชั่วโมง ส่วน *A. luchuensis* SK01 ที่มีค่า t_d เท่ากับ 100.40 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *A. niger* TISTR 3063 มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่า *A. luchuensis* SK01 และ อัตราการผลิตพบว่า *A. luchuensis* SK01 มีอัตราผลิตกรดซิตริกและมวลเซลล์สูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 ซึ่งมีอัตราผลิตกรดซิตริกที่ 0.294 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราผลิตมวลเซลล์ที่ 0.086 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่ *A. luchuensis* SK01 มีอัตราผลิต

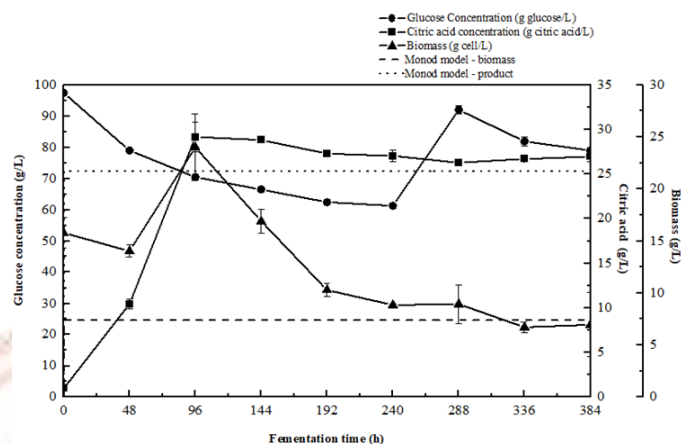
กรดซิทริกที่ 0.367 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราผลิตมวลเซลล์ที่ 0.083 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *A. luchuensis* SK01 มีอัตราการผลิตทั้งกรดซิทริกและมวลเซลล์ที่สูงกว่า

4.10 ผลการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดซิทริกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน

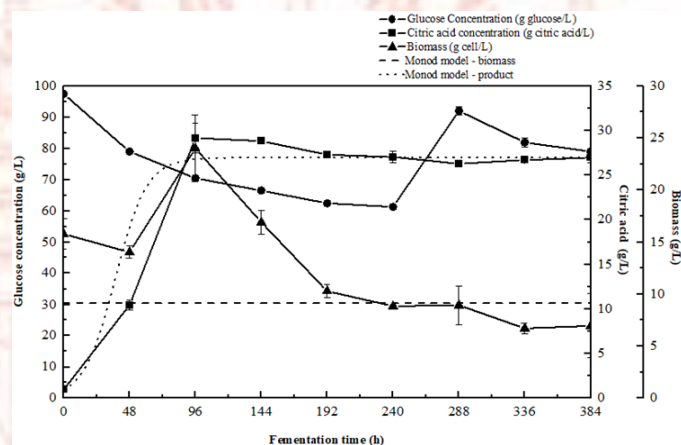
ผลการทดลองในตารางนี้แสดงค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญจากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ภายใต้กระบวนการหมักแบบป้อนโดยใช้โมเดลทางคณิตศาสตร์สามแบบ ได้แก่ แบบจำลองโมโนด แบบจำลองโลจิสติก และแบบจำลองคอมเพิร์ตซ์ แสดงในภาพที่ 27 และ 28 เพื่อประเมินค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิทริก ค่า $\mu_{\max}$ (อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด) ของ *A. luchuensis* SK01 ในทุกแบบจำลองมีค่าสูงกว่าของ *A. niger* TISTR 3063 โดยในแบบจำลองโมโนด *A. luchuensis* SK01 มีค่า $\mu_{\max}$ เท่ากับ $15.20 \pm 2.07 \text{ h}^{-1}$ ซึ่งสูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 ที่มีค่า $\mu_{\max}$ เท่ากับ $7.93 \pm 1.79 \text{ h}^{-1}$ ดังแสดงที่ตาราง 16 ขณะที่แบบจำลองโลจิสติก และแบบจำลองคอมเพิร์ตซ์ ค่าของ *A. luchuensis* SK01 ยังคงสูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 แต่ความแตกต่างลดลง ค่า $P_{\max}$ (ปริมาณกรดซิทริกสูงสุด) ในแบบจำลองโมโนด สำหรับ *A. luchuensis* SK01 เท่ากับ 32.64 ± 41.80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 ที่มีค่า $P_{\max}$ เท่ากับ 25.35 ± 2.53 กรัมต่อลิตร และในแบบจำลองโลจิสติก และแบบจำลองคอมเพิร์ตซ์ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า *A. luchuensis* SK01 สามารถผลิตกรดซิทริกได้มากกว่า *A. niger* TISTR 3063 โดยมีค่า $P_{\max}$ สูงกว่าในทุกกรณี สำหรับค่า K_s (ค่าคงที่ของซับสเตรต) แบบจำลองโมโนด ของ *A. luchuensis* SK01 ให้ค่า K_s ที่ต่ำกว่า *A. niger* TISTR 3063 (1.33 กรัมต่อลิตร เทียบกับ 2.53 กรัมต่อลิตร) ซึ่งบ่งชี้ว่า *A. luchuensis* SK01 มีความสามารถในการใช้ซับสเตรตที่ดีกว่า นอกจากนี้ ค่า R^2_p (ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ผลิตภัณฑ์) สำหรับทั้งสองสายพันธุ์ในทุกโมเดลแสดงค่าที่สูงมาก โดย *A. luchuensis* SK01 ให้ค่า R^2_p เท่ากับ 1.000 ในทั้งสามโมเดล ซึ่งบ่งชี้ถึงความแม่นยำสูงในการจับคู่ข้อมูลการผลิตกรดซิทริก ขณะที่ *A. niger* TISTR 3063 ให้ค่า R^2_p ที่สูงกว่า 0.986 แต่ยังคงต่ำกว่า *A. luchuensis* SK01 ทั้งนี้ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *A. luchuensis* SK01 มีการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิทริกที่ดีกว่า *A. niger* TISTR 3063 ในทุกโมเดลที่ใช้ในการศึกษานี้ โดยโมเดล Gompertz และ Logistic ได้ผล

การจับคู่ข้อมูลที่ดีที่สุดทั้งสองสายพันธุ์ จึงสามารถใช้โมเดลเหล่านี้ในการทำนายและควบคุมกระบวนการหมักเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริกได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด.

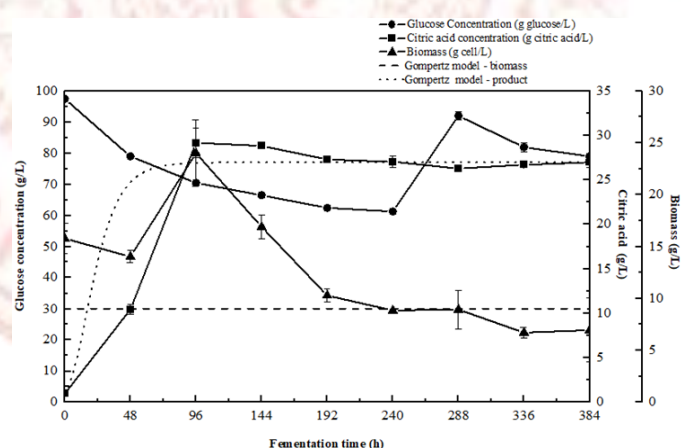
ผลการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดซิตริกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะและแบบป้อนได้แสดงให้เห็นถึงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 โดยใช้โมเดลทางคณิตศาสตร์สามแบบ ได้แก่ Monod model, Logistic model และ Gompertz model สำหรับทั้งสองประเภทของถังปฏิกรณ์ชีวภาพในกรณีของ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ ผลการทดลองแสดงที่ตารางที่ 16 พบว่าโมเดล Gompertz และ Logistic มีความแม่นยำสูงในการอธิบายพฤติกรรมของการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริก โดยมีค่า R^2_p สูงถึง 0.995 และ 0.996 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมเดลเหล่านี้สามารถจับลักษณะการเจริญเติบโตแบบ S-curve ได้ดีในช่วงการเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริก ในขณะที่โมเดล Monod มีค่า R^2_b สำหรับการจับคู่ข้อมูลไม่ซีเลียมที่ต่ำกว่า (0.623) ซึ่งบ่งชี้ว่าไม่เหมาะสมกับการอธิบายการเจริญเติบโตของโมซีเลียมได้ดีเท่าที่ควร เมื่อเปรียบเทียบผลการสร้างแบบจำลองใน ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน พบว่า *A. luchuensis* SK01 สามารถผลิตกรดซิตริกได้มากกว่า *A. niger* TISTR 3063 โดยมีค่า P_{max} ที่สูงกว่าในทุกโมเดลที่ใช้ในการศึกษา สำหรับค่า μ_{max} และ K_s ในโมเดล Monod *A. luchuensis* SK01 แสดงให้เห็นว่ามีความสามารถในการใช้ซับสเตรตดีกว่า *A. niger* TISTR 3063 ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงความแตกต่างในการใช้ทรัพยากรและประสิทธิภาพในการผลิตกรด ซิตริก



(ก)

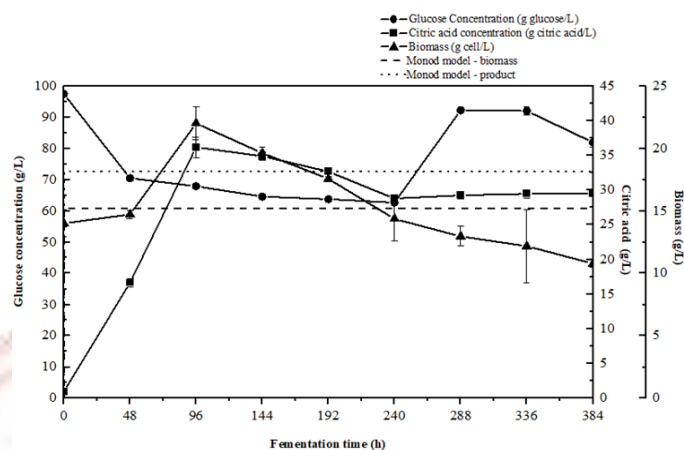


(ข)

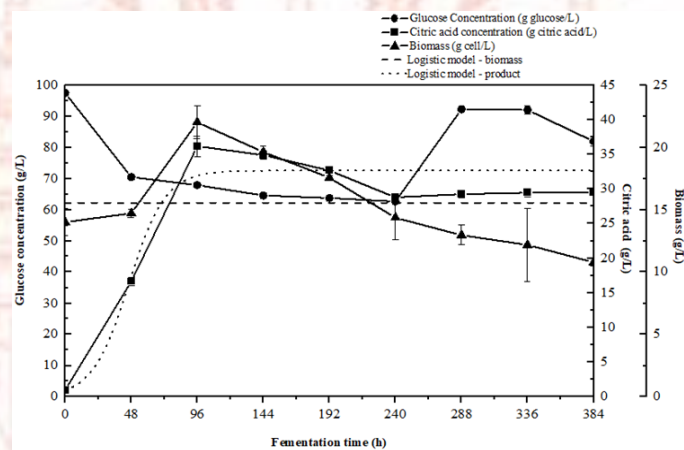


(ค)

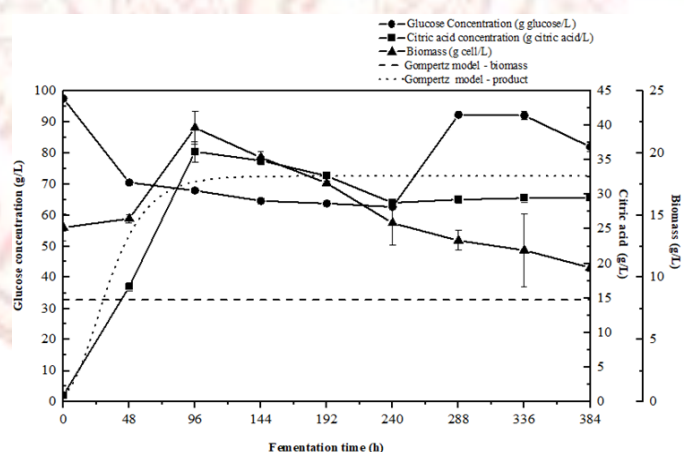
ภาพที่ 27 การประมาณค่าของแบบจำลอง (ก) แบบจำลองโมนอด (ข) แบบจำลองโลจิสติก และแบบจำลอง (ค) แบบจำลองกอมเพิร์ตซ์ ให้เข้ากับความเข้มข้นของสารตั้งต้น ชีวมวล และผลิตภัณฑ์โดย *A. niger* TISTR 2365 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน ขนาด 5 ลิตร



(ก)



(ข)



(ค)

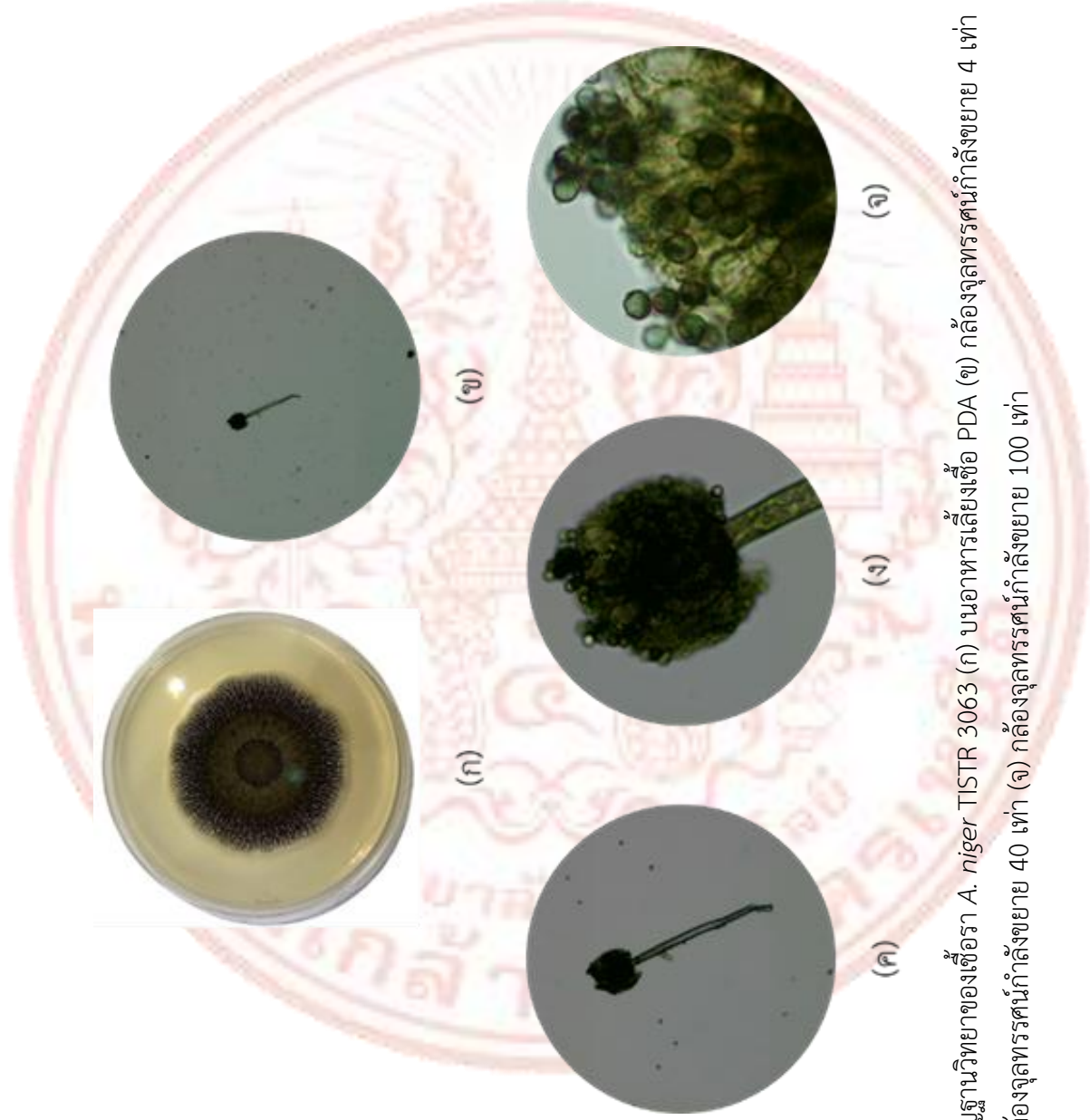
ภาพที่ 28 การประมาณค่าของแบบจำลอง (ก) แบบจำลองโมนอด (ข) แบบจำลองโลจิสติก และแบบจำลอง (ค) แบบจำลองกอมเพิร์ตซ์ ให้เข้ากับความสัมพันธ์ของสารตั้งต้น ชีวมวล และผลิตภัณฑ์โดย *A. luchuensis* SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อนขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 16 ค่าพารามิเตอร์จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

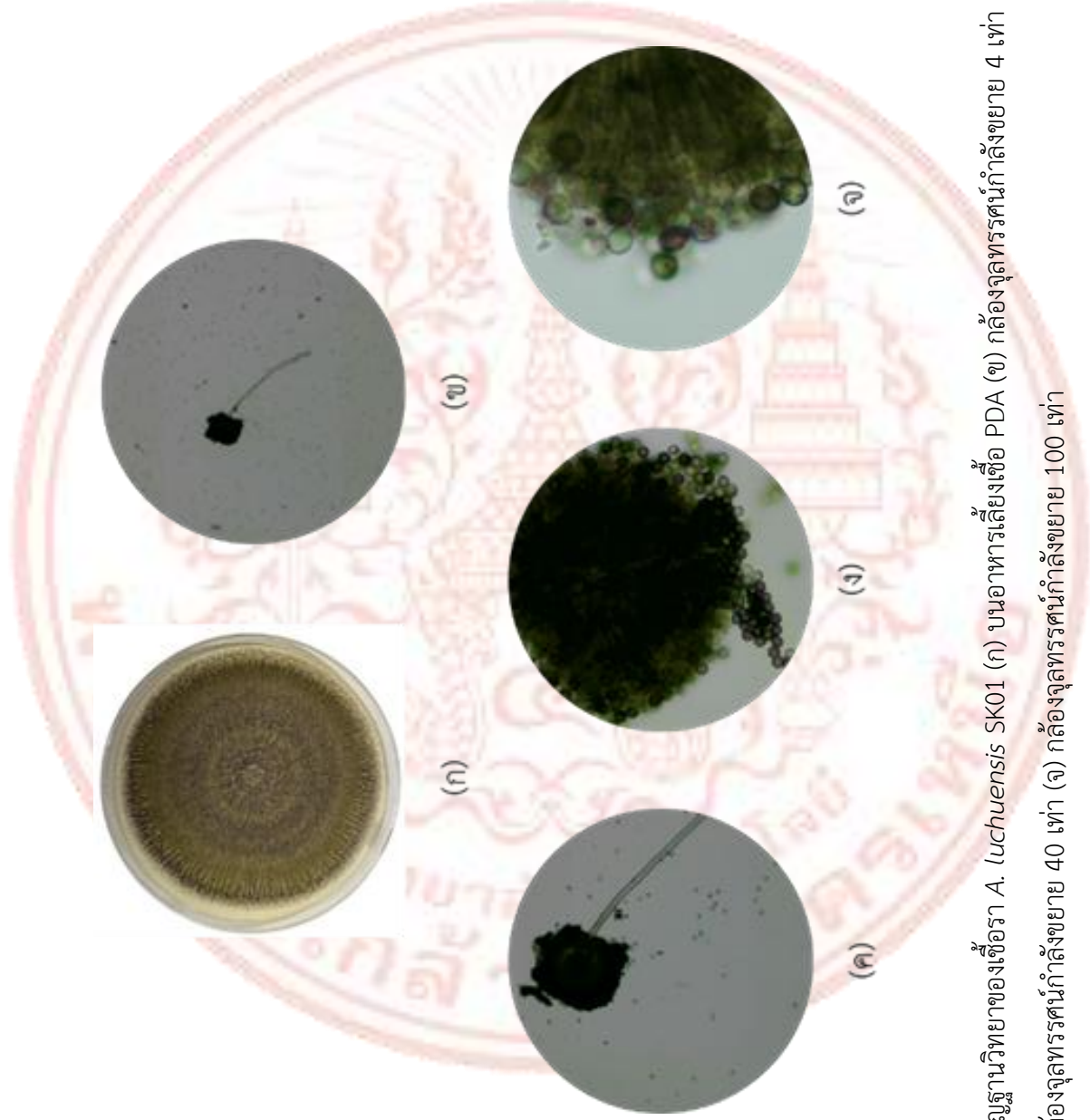
สายพันธุ์เชื้อรา	สมการ	$\mu_{\max}$ h^{-1}	$P_{\max}$ g/L	K_s g/L	R^2_b	R^2_p
<i>A. niger</i> TISTR 3063	Monod	7.93±1.79	25.35±2.53	2.53	0.000	0.986
<i>A. luchuensis</i> SK01		15.20±2.07	32.64±41.80	1.33	0.000	0.999
<i>A. niger</i> TISTR 3063	Logistic	9.14±0.72	26.96±0.45	-	0.000	0.996
<i>A. luchuensis</i> SK01		15.55±-	32.64±0.03	-	0.000	1.000
<i>A. niger</i> TISTR 3063	Gompertz	24.56±-	26.96±0.45	-	0.000	0.996
<i>A. luchuensis</i> SK01		22.27±41.50	32.65±0.14	-	0.000	1.000

R^2_b : ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มวลเซลล์

R^2_p : ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 29 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ข) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 เท่า (ค) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า (ง) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า (จ) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



ภาพที่ 30 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. luchuensis* SK01 (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ข) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 เท่า (ค) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า (ง) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า (จ) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

4.11 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

4.11.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

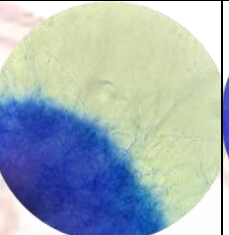
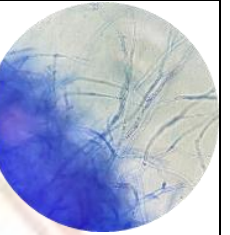
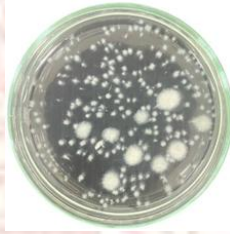
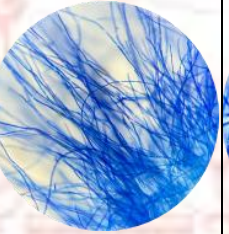
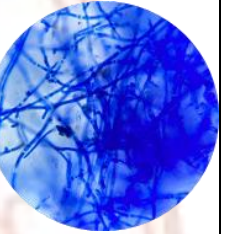
ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นถึงลักษณะเฉพาะที่สำคัญของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 พบว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ภาพที่ 29 ก และ 30 ก) โคลนบนอาหาร PDA มีลักษณะเป็นผงหรือเหมือนกำมะหยี่ สีดำหรือน้ำตาลเข้ม ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งบอกถึงการก่อตัวของสปอร์โคนิเดีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 4 เท่าถึง 10 เท่า (ภาพที่ 29 ข-ค และ 2830 ข-ค) พบโครงสร้างก้านชูโคนิเดีย (conidiophores) ที่มีส่วนของโคนิเดีย (conidia) ต่ออยู่ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการแพร่พันธุ์ของเชื้อรา (Bennett, 2007; เทพ et al., 2017) (ภาพที่ 29 ง-จ และ 30 ง-จ) โดยโคนิเดียของเชื้อราเหล่านี้มีลักษณะกลมรีหรือค่อนข้างกลม มีการสร้างโคนิเดียต่อกันเป็นสายยาว และผิวของสปอร์มีความเรียบ เส้นใยไม่มีสีและมีผนังกัน มีการจัดเรียงของโคนิเดียแบบ biseriate ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่ใช้จำแนกสปีชีส์ในกลุ่ม *Aspergillus* (Samson et al., 2014)

4.11.2 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของมวลเซลล์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

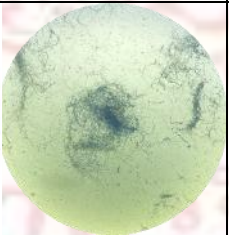
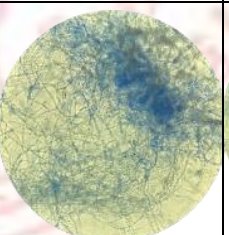
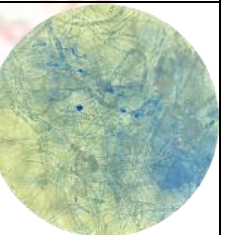
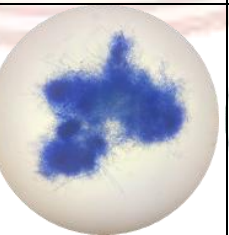
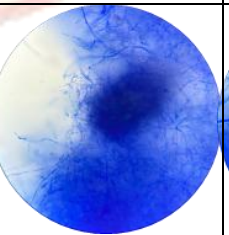
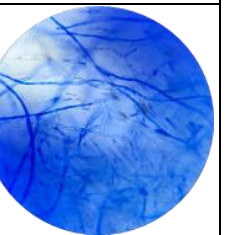
จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของไมซีเลียมเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30°C โดยใช้การกวนที่ 300 รอบต่อนาที พบว่าไมซีเลียมของทั้งสองสายพันธุ์แสดงลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกันในแต่ละสภาวะการเพาะเลี้ยง ในสภาวะการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ เชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ดังแสดงตารางที่ 17 มีลักษณะของไมซีเลียมที่รวมตัวกันเป็นเม็ดทรงกลมกระจายตัวกันอย่างสม่ำเสมอ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 10x, 40x และ 100x พบว่าไมซีเลียมรวมตัวกันเป็นเม็ดกลมและส่วนของไมซีเลียมแตกแขนงเป็นเส้นใยยาวๆ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเติบโตที่ไม่เป็นระเบียบอย่างมากในรูปแบบของการรวมตัวกันในลักษณะเม็ดทรงกลมนี้ การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบการทำลายหรือการตัดขาดของเส้นใย ซึ่งบ่งชี้ว่าไมซีเลียมในสภาวะนี้ยังคงสมบูรณ์และไม่ทำลายจากกระบวนการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จที่มีการกวน 300 รอบต่อนาที และปริมาตรการทำงาน 3 ลิตร ผลการศึกษาพบว่าลักษณะทางกายภาพของไมซีเลียมในทั้งสองสายพันธุ์ของเชื้อรา *A. niger* TISTR

3063 และ *A. luchuensis* SK01 มีความแตกต่างจากในฟลาสก์ ดังแสดงตารางที่ 18 *A. niger* TISTR 3063 มีไมซีเลียมที่กระจายตัวเป็นเส้นใยสีเหลืองที่บางลงและขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 10x, 40x และ 100x พบว่าไมซีเลียมมีการกระจายตัวเป็นเส้นบางๆ โดยไม่มีการก่อตัวเป็นเม็ดกลมๆ ของไมซีเลียม ซึ่งบ่งชี้ว่าไมซีเลียมในสภาวะนี้มีการเจริญเติบโตที่เรียงตัวเป็นเส้นใยยาวๆ และยังคงสมบูรณ์ไม่มีการทำลาย ในทางตรงกันข้าม ลักษณะทางกายภาพของไมซีเลียมของ *A. luchuensis* SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเสิร์ฟมีการรวมตัวกันเป็นเม็ดทรงกลมรีสีขาว และบางเม็ดมีการรวมตัวกันหลวมๆ กระจายอยู่ในการเพาะเลี้ยง เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 10x, 40x และ 100x พบว่าไมซีเลียมมีการซ้อนทับกันอย่างหนาแน่นภายในเม็ดไมซีเลียมแต่ละเม็ด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแม้การซ้อนทับจะเกิดขึ้น ไมซีเลียมก็ยังคงความสมบูรณ์และไม่พบการทำลายหรือการตัดเส้นใยในสภาวะการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน (fed-batch fermentation) ที่มีกระบวนการหมักแบบป้อนและการกวน 300 รอบต่อนาที ผลการศึกษาพบว่าไมซีเลียมทั้ง *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ดังแสดงตารางที่ 19 ยังคงมีลักษณะเป็นเม็ดทรงกลมที่มีการรวมตัวกันอย่างหนาแน่นและกระจายตัวอยู่ภายในถังเพาะเลี้ยง โดยขนาดของเม็ดไมซีเลียมในสภาวะนี้จะมีขนาดเล็กกว่าที่พบในฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเสิร์ฟ และการศึกษาไมซีเลียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 10x, 40x และ 100x พบว่าไมซีเลียมที่เป็นเม็ดกลมนี้มีการกระจายตัวของไมซีเลียมที่เป็นเส้นๆ กระจายตัวอยู่รอบๆ คล้ายกับลักษณะไมซีเลียมในสภาวะการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเสิร์ฟ ผลการทดลองนี้พิสูจน์ได้ว่าในทุกสภาวะการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเสิร์ฟและแบบป้อน ที่มีการกวน 300 รอบต่อนาทีและปริมาตรการทำงาน 3 ลิตร ไม่พบการทำลายหรือการตัดเส้นใยไมซีเลียมเกิดขึ้น ซึ่งบ่งชี้ว่าการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพทั้งสองประเภทเป็นกระบวนการหมักที่สามารถรักษาความสมบูรณ์ของไมซีเลียมได้ดี การควบคุมสภาวะการกวนและการหมักที่เหมาะสมจึงมีผลสำคัญในการรักษาลักษณะทางกายภาพของไมซีเลียมให้คงความสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการผลิตสารชีวภาพต่างๆ แม้ว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์จะช่วยให้เห็นรายละเอียดต่างๆ แต่การใช้ Scanning Electron Microscope อาจช่วยให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะในระดับนาโนซึ่งสามารถมองเห็นลักษณะของเส้นใยและการสร้างโครงสร้างในระดับที่ลึกซึ้งมากขึ้น

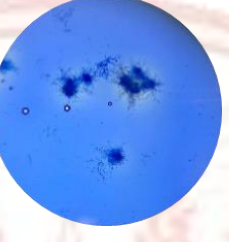
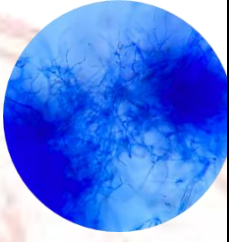
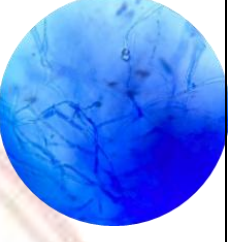
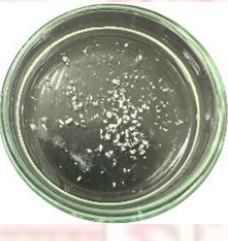
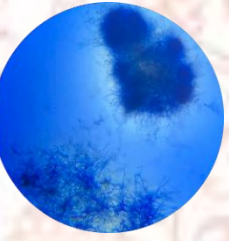
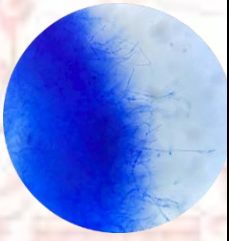
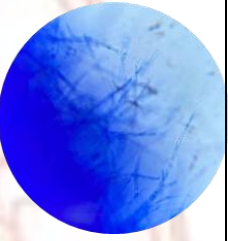
ตารางที่ 17 เปรียบเทียบภาพของมวลเซลล์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สภาวะการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์

Condition	Phenology	10x	40x	100X
<i>A. niger</i> TISTR 3063 cultivations in shake flask.				
<i>A. luchuensis</i> SK01 cultivations in shake flask.				

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบภาพของมวลเซลล์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สภาวะการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ

Condition	Phenology	10x	40x	100X
<i>A. niger</i> TISTR 3063 cultivations in bioreactor				
<i>A. luchuensis</i> SK01 cultivations in bioreactor				

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบภาพของมวลเซลล์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สภาวะการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน

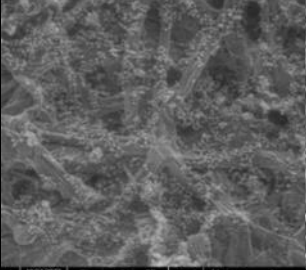
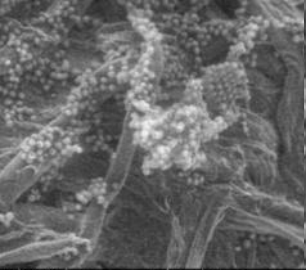
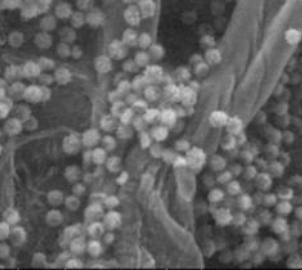
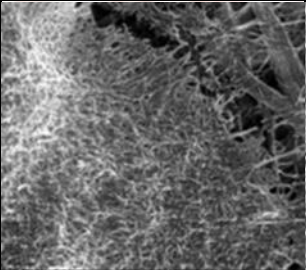
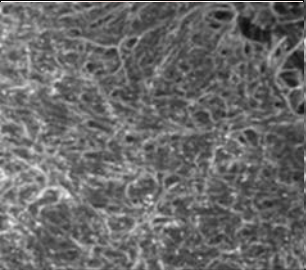
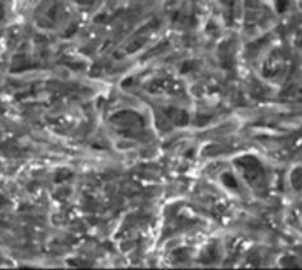
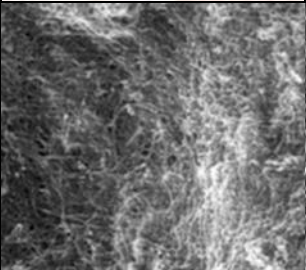
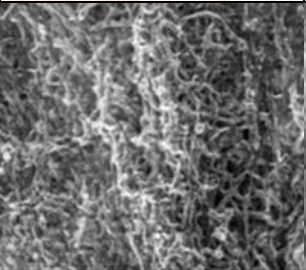
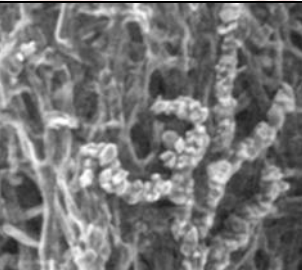
Condition	Phenology	10x	40x	100X
<i>A. niger</i> cultivations in fed-batch fermentation				
<i>A. luchuensis</i> cultivations in fed-batch fermentation				

4.11.2 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของมวลเซลล์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscopy: SEM)

สัณฐานวิทยาของมวลเซลล์เชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีสมรรถนะสูง โดยแสดงดังภาพที่ 31 ก และ 32 ก เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของไมซีเลียมของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ในสภาวะการเพาะเลี้ยงในฟลาस्क พบว่าไมซีเลียมมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ สานกันคล้ายตาข่าย แต่มีความแตกต่างกันเล็กน้อยระหว่างไมซีเลียมของ *A. niger* TISTR 3063 มีเส้นใยที่บางกว่าและสานกันอย่างหนาแน่น เมื่อเทียบกับ *A. luchuensis* SK01 โดยแสดงดังภาพที่ 31 จ และ 32 จ *A. luchuensis* SK01 ไมซีเลียมมีลักษณะเส้นหนาสลับบาง ในขณะที่ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของมวลเซลล์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดสภาวะเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวน พบว่าเส้นใยของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 โดยแสดงดังภาพที่ 31 ช และ 32 ช ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพยังคงรักษาความสมบูรณ์ของโครงสร้างไมซีเลียมอย่างชัดเจน ภาพ SEM แสดงให้เห็นว่าเส้นใยยังคงมีลักษณะเป็นเส้นยาวๆ ซึ่งไม่มีการตัดขาดหรือการทำลายใดๆ เกิดขึ้นจากใบพัด

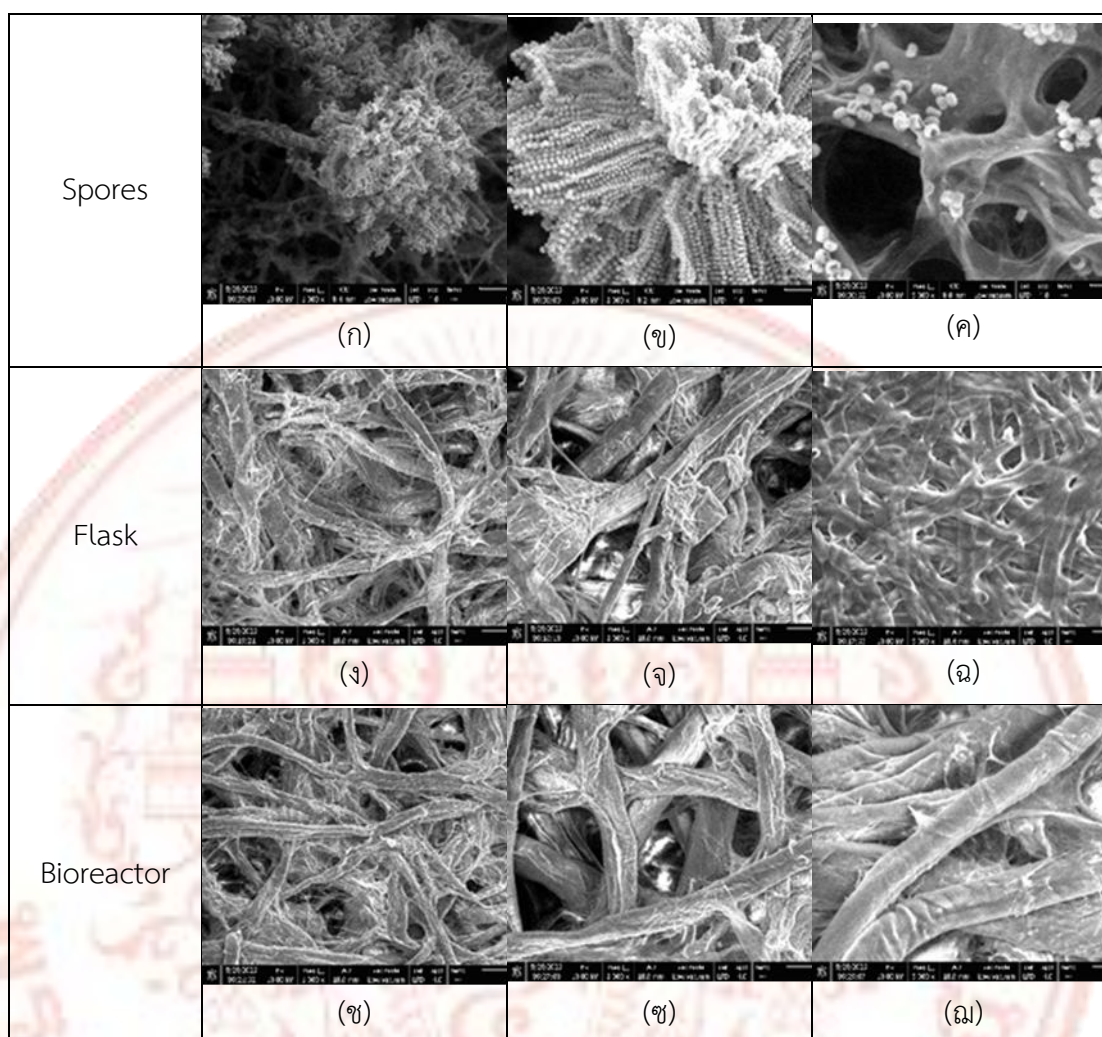
ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แม้จะมีการกวนที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ภาพ SEM ของ *A. niger* TISTR 3063 พบว่าไมซีเลียมมีลักษณะเรียบ กระจายตัวดี และมีเส้นใยที่บางกว่าและสานกันอย่างหนาแน่น คล้ายกับลักษณะไมซีเลียมที่สภาวะการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ ภาพทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าไม่มีความเสียหายจากแรงเฉือนเกิดขึ้นระหว่างการหมัก นอกจากนี้การเติม CaCl_2 จึงมีผลต่อการเจริญเติบโต สัณฐานวิทยา และการผลิตกรดซิตริก การเติม CaCl_2 ลงในอาหารหมักทำให้เกิดการเจริญเติบโตแบบ เม็ดหลวมๆ ลดความเข้มข้นของชีวมวล และเพิ่มผลผลิตเชิงปริมาตร (กรัมกรดซิตริกต่อชั่วโมง) (Pera & Callieri, 1997) ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงการเพาะเลี้ยงเชื้อราในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวน ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นข้อพิสูจน์ที่สำคัญว่าการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถรักษา ความสมบูรณ์ของไมซีเลียมได้ดี โดยไม่มีผลกระทบจากใบพัดในกระบวนการกวน



สภาวะการ เพาะเลี้ยง	กำลังขยาย		
	1000x	2000x	5000x
Plate			
	(ก)	(ข)	(ค)
Flask			
	(ง)	(จ)	(ฉ)
Bioreactor			
	(ช)	(ซ)	(ฅ)

ภาพที่ 31 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 1000, 2000, และ 5000 เท่าของสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ก-ค) มวลเซลล์ของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ที่เพาะเลี้ยงใน ฟลาสก์ (ง-ฉ) และมวลเซลล์ของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (ช-ฅ)

สภาวะการ เพาะเลี้ยง	กำลังขยาย		
	1000x	2000x	5000x



ภาพที่ 32 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 1000, 2000, และ 5000 เท่าของสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ก-ค) มวลเซลล์ของเชื้อรา *A. luchuensis* SK01 ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ (ง-ฉ) และมวลเซลล์ของเชื้อรา *A. luchuensis* SK01 ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (ช-ฅ)

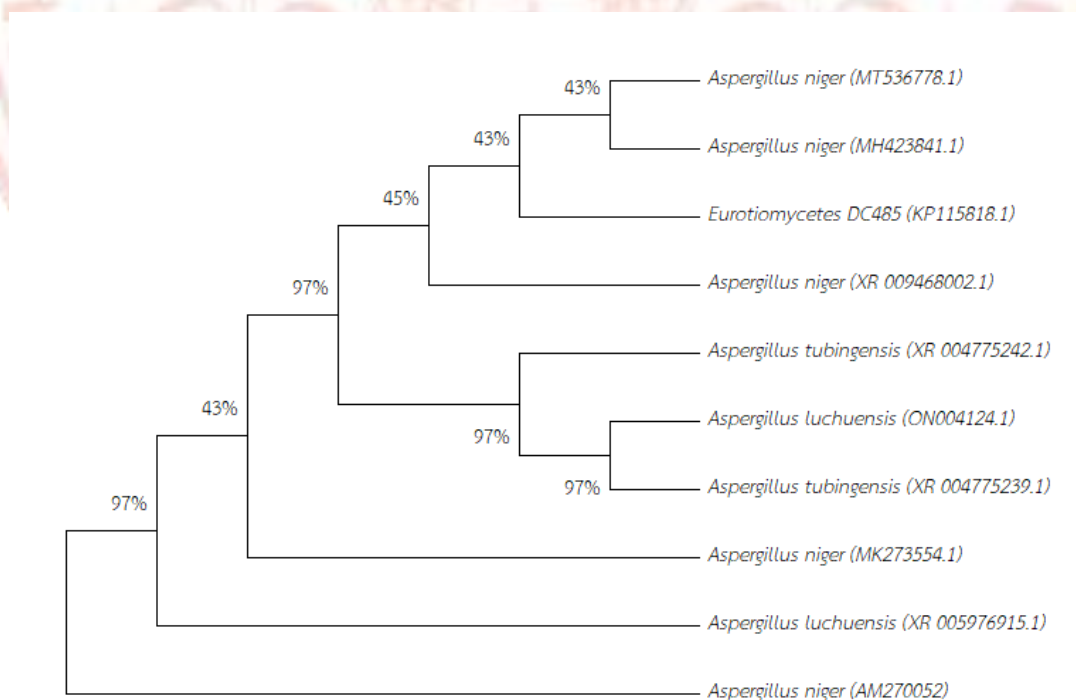
4.12 ผลการวิเคราะห์แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการ

จากการศึกษาลักษณะของเชื้อรา *A. luchuensis* ที่คัดแยกจากธรรมชาติ ได้มีการยืนยันสปีชีส์ของเชื้อราโดยใช้การวิเคราะห์ทั้งฐานนิวคลีโอไทด์และการระบุทางโมเลกุล ผ่านการตรวจสอบส่วน 26S rRNA ของเชื้อราที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และวิเคราะห์หา

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อรา *A. luchuensis* มีลำดับเบสของ 26S rRNA มีความยาว 3,674 คู่เบส ซึ่งแสดงลำดับเบสของเชื้อจุลินทรีย์ *A. luchuensis* ดังต่อไปนี้ (5'-GGGGGACGACGGGGATCCTCCCAAGGCTTCGTACGACCCCCACGCCTGCCTACTCGTCGGGGCATCGTTTCTACCCCGACGGCGAGGTATGGGTAGCACGCTTGAGCGCCATCCATTTTCAGGGCTAGTTCATTGCGCCCGTGAGTTGTTACACACTCCTTAGCGGATTCCGACTTCCATGGCCACCGTCGGGCTGTCTAGATGAACTAACACCTTTTGTGGTGTCTGATGAGCGTGCATTCCGGCACCTTAACCTCGCGTTCGGTTCATCCCGCATCGCCAGTTCTGCTTACCAAAAATGGCCCACTAGTAACGCTCCATTCTAATGCCCACGTTCAACTAAGCAACAAGGGCTTCTTACATATTTAAAGTTTGAGAATAGGTTAAGTTGTTTCAACCCCAATGCCTCTAATCATTCGCTTTACCTCATAAACTGATTTTGCGTTACTGCTATCCTGAGGGAACTTCGGCAGGAACCAGCTACTAGATGGTTCGATTAGTCTTTCGCCCCATACCCAAATTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAACCGCTGCGAGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCGCCCTATTGAGGCATAGTTCACCATCTTTCGGGTCCCCACATTTACGCTCTTACTCAAATCCATCCGAAGACATCAGGATCGGTGATGGTGCGCCCCGCGAGGGGGCTCCACCTCCGTTTCGCTTTCACTGCGCGCACGGGTTTGACACCCGAACACTCGCGTAGATGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCGTTTACGACCATTATGCCAGCGTCCGTGCCGAAGCGCGTTTCCTCGGTCCAGGCTGGCCGCATTGCACCCCTGGCTATAAGGTACCCCGGAGGGTACTACATTCCAGGGGGCCTTTGACCGGCCGCCAAACCGACGCTGGCCCGCCACGGGGAAGTACACCGGCACGAATGCCGGCTGAACCCCGCGGGCGAGTCTGGTCGCAAGCGTTCCCTTTCAACAATTTACGTGCTGTTTAACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCCGGCCAGTATTTAGCTTTAGATGAAATTTACCACCCATTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGAACTCGTCGAAGGAACTTTTACACGGGGCACGGAAACCCCCGCCCAAGAAGGGAATTCTCACCTTTTTGAAGGGCCCGTTCCAGGGGACTTTAAAAGGGGGGCCGCCCAAGCACCTTCGGGAAATTACAATGGGAACTCCCAAAGAACCCC-3') ซึ่งได้ลำดับที่มีความคล้ายคลึง (identity) กับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ถึง 100% (รหัสอ้างอิง ON004124.1). การจับคู่ลำดับเบสให้คะแนนสูงถึง 2449 และ E-Value ต่ำ ที่ 0.0 แสดงให้เห็นถึงความแม่นยำสูงในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อรา *A. luchuensis* และยืนยันความถูกต้องของการตรวจสอบทางพันธุกรรม นอกจากนี้ การเปรียบเทียบทางพันธุกรรม

ของ *A. luchuensis* กับสายพันธุ์อื่น ๆ ในกลุ่ม *Aspergillus* ผ่านการสร้าง phylogenetic tree (ภาพที่ 33) พบว่า *A. luchuensis* SK01 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. tubingensis* ซึ่งเป็นการยืนยันความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ที่ชัดเจนระหว่างเชื้อราเหล่านี้

การใช้เทคนิคการระบุด้วย 26S rRNA PCR ร่วมกับการวิเคราะห์หลักฐานวิธานจึงเป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือและมีความแม่นยำในการจำแนกและยืนยันสายพันธุ์ *A. luchuensis* SK01 การผสมผสานการวิเคราะห์หลักฐานวิธานและการระบุทางโมเลกุลผ่านการใช้ PCR และการสร้าง phylogenetic tree ทำให้การยืนยันสายพันธุ์เชื้อราเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการนำไปใช้ในงานวิจัยและการประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรม เช่น การผลิตกรดซิตริก การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นถึงการใช้เทคนิคทางโมเลกุลที่ทันสมัยเพื่อการระบุสายพันธุ์ของเชื้อราที่มีความแม่นยำและสามารถนำไปใช้ในงานอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ. (Hong et al., 2013) (Samson et al., 2014)



ภาพที่ 33 แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการของเชื้อรา *Aspergillus luchuensis*

4.13 ผลการตกตะกอนกรดซิตริก

จากลักษณะทางกายภาพของกรดซิตริกทั้ง 4 แหล่ง พบว่า กรดซิตริกเกรดวิเคราะห์ มีน้ำหนักโมเลกุล 210.14 กรัมต่อโมล (Sisco Research Laboratories, India) และ กรดซิตริกเกรดอาหาร มีน้ำหนักโมเลกุล 210.14 กรัมต่อโมล (Tokyo Chemical Industry, India) ส่วนกรดซิตริกที่ได้จากกระบวนการตกตะกอนจากน้ำหมัก *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 แสดงในภาพที่ 34 มีลักษณะเป็นผงละเอียดไม่เป็นผลึก ลักษณะเด่นที่คล้ายกันของกรดซิตริกทั้ง 4 แหล่ง คือ เป็นสารไม่มีสีไม่มีกลิ่น และสามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิห้อง



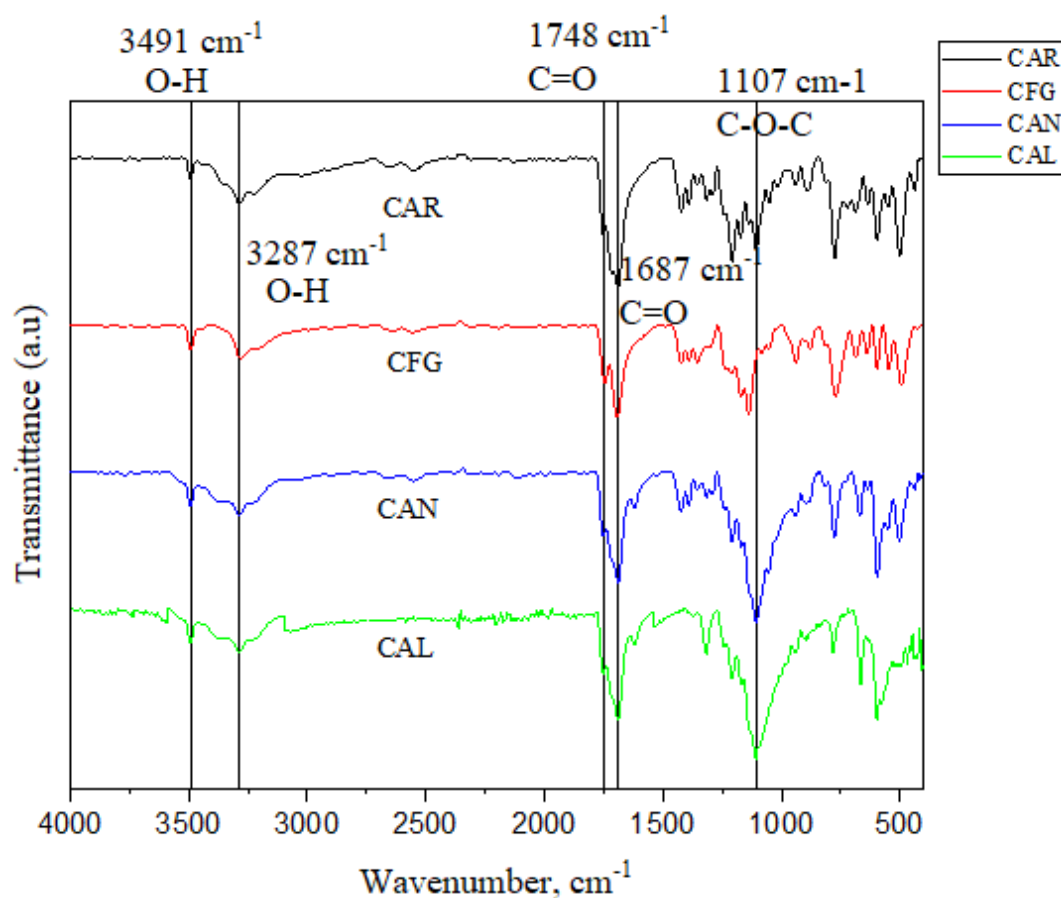
ภาพที่ 34 การเปรียบเทียบลักษณะของกรดซิตริก (ก) กรดซิตริกเกรดวิเคราะห์ (ข) กรดซิตริกเกรดอาหาร (ค) กรดซิตริกจาก *A. niger* TISTR 3063 และ (ง) กรดซิตริกจาก *A. luchuensis* SK01

4.14 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์กรดซิตริกจากเชื้อรา

4.14.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (FT-IR Analysis)

การผลการศึกษาร่วมกันประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี การวิเคราะห์เปรียบเทียบกรดซิตริกที่ผลิตจาก 4 แหล่งที่แตกต่างกัน ได้แก่ CAR CFG CAN และ CAL เส้นสีน้ำเงินแสดงถึงกรดซิตริกที่ได้จาก *A. niger* TISTR 3063 (CAN) และเส้นสีเขียว กรดซิตริก *A. luchuensis* SK01 (CAL) ในขณะที่เส้นสีดำแสดงถึงกรดซิตริกโมโนไฮเดรตจากแหล่งเชิงพาณิชย์ ซึ่งเป็นกรดซิตริกเกรดวิเคราะห์ (CAR) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 210.14 กรัมต่อโมล (Sisco Research Laboratories, India) เส้นสีแดงแสดงถึงกรดซิตริกโมโนไฮเดรต ซึ่งเป็นกรดซิตริกเกรดอาหาร (CFG) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 210.14 กรัมต่อโมล (Tokyo Chemical Industry, India) ดังแสดงในภาพที่ 35 พบพิกัดสำคัญที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันหลักของกรดซิตริก 3491 cm^{-1} ซึ่งเป็นลักษณะการสั่นสะเทือนแบบยืดตัวของไฮดรอกซิล (O-H) ซึ่งเกิดจากทั้งหมู่คาร์บอกซิล ($-\text{COOH}$) และโมเลกุลน้ำในกรดซิตริกโมโนไฮเดรต ในช่วงประมาณ 3287 cm^{-1} พบพิกัดที่แสดงการยืดตัวของ O-H จากพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลในรูปแบบโมโนไฮเดรต ขณะที่พบพิกัดที่สำคัญอีกหนึ่งพิกัดในช่วงประมาณ 1748 cm^{-1} แสดงการยืดตัวของ $\text{C}=\text{O}$ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการสั่นแบบยืดตัวของคาร์บอนิล ($\text{C}=\text{O}$) จากหมู่คาร์บอกซิล ($-\text{COOH}$) ในกรดซิตริก นอกจากนี้ ยังพบการยืดตัวของ $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ในช่วงประมาณ 1107 cm^{-1} เกิดจากความยืดตัวคล้ายเอสเทอร์ในโมเลกุลของกรดซิตริก (Kosa et al., 2017) และยังพบพิกัดในช่วงประมาณ 1687 cm^{-1} เป็นลักษณะการซ้อนทับของ H-O-H กับการยืด $\text{C}=\text{O}$ ของกรดคาร์บอนิล ในการวิเคราะห์ FTIR ของกรดซิตริกจาก *A. niger* TISTR 3063 กรดซิตริกจาก *A. luchuensis* SK01 พบพิกัดสำคัญทั้งหมดที่พบในกรดซิตริกเกรดสำหรับวิเคราะห์และเกรดอาหารเช่นกัน แต่อาจจะมีค่าแปรปรวนในสเปกตรัม FTIR ของตัวอย่างจากกรดซิตริกจาก *A. niger* TISTR 3063 กรดซิตริกจาก *A. luchuensis* SK01 น่าจะเกิดจากความแตกต่างของปริมาณความชื้นและการมีสารปนเปื้อนจากการตกตะกอนที่ไม่บริสุทธิ์มากพอ

การเปรียบเทียบสเปกตรัม FTIR ระหว่างกรดซิตริกที่ได้จากการหมักและกรดซิตริกที่มีจำหน่ายในท้องตลาด เผยให้เห็นความแตกต่างในด้านความบริสุทธิ์ ความชื้นตกค้าง และสิ่งเจือปนที่มีอยู่ในตัวอย่างจากการหมัก (Mirghani & Kabbashi, 2019) ด้วยเหตุนี้ สเปกตรัม FTIR ของกรดซิตริกที่ได้จากการหมักจึงแสดงคุณสมบัติที่โดดเด่นเมื่อเทียบกับกรดซิตริกบริสุทธิ์เชิงพาณิชย์ ได้แก่ จุดสูงสุดที่เข้มข้นน้อยกว่าในบริเวณคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิล และจุดสูงสุดที่เกี่ยวข้องกับสารปนเปื้อนในกระบวนการหมัก



ภาพที่ 35 การวิเคราะห์เปรียบเทียบกรดซิทริกที่ผลิตจากสามแหล่งที่แตกต่างกัน เส้นสีน้ำเงินแสดงถึงกรดซิทริกที่ได้จาก *A.niger* (CAN) และเส้นสีเขียว กรดซิทริก *A. luchuensis* SK01 (CAL) ในขณะที่เส้นสีดำแสดงถึงกรดซิทริกโมโนไฮเดรตจากแหล่งเชิงพาณิชย์ (CAR) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 210.14 กรัมต่อโมล (Sisco Research Laboratories, India) เส้นสีแดงแสดงถึงกรดซิทริกโมโนไฮเดรต ซึ่งเป็นกรดซิทริกเกรดอาหาร (CFG) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 210.14 กรัมต่อโมล (Tokyo Chemical Industry, India)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ภายใต้สภาวะต่างๆ โดยการเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มผลผลิตกรดซิตริก การทดลองพบว่า การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนช่วยเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดถึง 29 กรัมต่อลิตรหลังการหมัก 8 วัน โดยการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ความเร็วรอบในการเขย่า และการเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้ นอกจากนี้ การศึกษาทางเคมีด้วยเทคนิค FT-IR ยืนยันว่า กรดซิตริกที่ผลิตจากการหมักมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับกรดซิตริกเชิงพาณิชย์ และการใช้เทคนิค PCR ช่วยยืนยันเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *A. luchuensis* SK01 ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงและการเลือกเชื้อราที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริก ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.1 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดซิตริก

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลกระทบของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger*. ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นให้ผลดีที่สุดในการผลิตกรดซิตริก โดยสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดถึง 17.40 กรัมต่อลิตรหลังการหมักเป็นเวลา 6 วัน เมื่อเทียบกับซูโครสและส่วนผสมของกลูโคสและซูโครสที่ไม่สามารถผลิตกรดซิตริกได้ดีเท่ากลูโคส แม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างแหล่งคาร์บอนในช่วง 2 ถึง 4 วันแรกของการหมัก แต่ผลการทดลองยังคงชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของแหล่งคาร์บอนในการกระตุ้นการผลิตกรดซิตริกในระยะยาว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนที่ใช้มีผลโดยตรงต่อผลผลิตของกรดซิตริกในกระบวนการหมัก การเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในกระบวนการหมักที่มีความยาวนาน

5.2 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดซิตริก

การทดลองนี้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันในการผลิตกรดซิตริกจาก *A. niger*. ผลการทดลองพบว่า ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุดถึง 29 กรัมต่อลิตรหลังการหมัก 8 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ การใช้ยูเรียและเปปโตनร่วมกับกลูโคสช่วยให้ได้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยที่พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแอมโมเนียมมีแนวโน้มที่จะกระตุ้นกระบวนการผลิตกรดซิตริกได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนประเภทอื่น ส่วน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NaNO_3 ไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการผลิตกรดซิตริก การเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมมีผลสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริกในกระบวนการหมัก ดังนั้น การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนอย่างเหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมและเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกได้ตามเป้าหมาย

5.3 การศึกษาของความเข้มข้นของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตกรดซิตริก

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของคาร์บอนและไนโตรเจนในการผลิตกรดซิตริกจาก *A. niger*. ผลการทดลองพบว่า การใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับกลูโคสในปริมาณสูง (100 กรัมต่อลิตร) ช่วยเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกสูงสุดที่ 28.40 กรัมต่อลิตร โดยการผลิตกรดซิตริกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากนี้ การเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกอย่างชัดเจนในระยะเวลาการหมักที่ยาวนาน การปรับความเข้มข้นของคาร์บอนและไนโตรเจนให้เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริก เพราะการเพิ่มความเข้มข้นของทั้งสององค์ประกอบสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์และเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกในกระบวนการหมักได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการทดลองนี้ย้ำถึงความสำคัญของการปรับสมดุลระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนในการผลิตกรดซิตริกที่มีประสิทธิภาพสูง

5.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา

การทดลองนี้ใช้การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดซิตริกจาก *A. niger* TISTR 3063 ผลการทดลองพบว่า

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่ 97.93 กรัมต่อกรัม ความเร็วรอบในการเขย่า 300 รอบต่อนาที และการเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ 0.1 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่ให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด แม้จะมีการเติมอาหารใหม่ในช่วง 240 ชั่วโมงซึ่งช่วยเพิ่มการผลิตกรดซิตริกเล็กน้อย ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดซิตริกมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในระยะเวลายาวนาน โดยไม่พบการลดลงของผลผลิตกรดซิตริกในช่วงเวลานั้น นอกจากนี้ผลการทดลองยังย้ำถึงความสำคัญของการเลือกตัวแปรที่เหมาะสมในการควบคุมกระบวนการหมักเพื่อให้กระบวนการผลิตกรดซิตริกมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ความเร็วรอบในการเขย่า และการเติมแคลเซียมคลอไรด์ให้ถูกต้องมีผลสำคัญในการเพิ่มผลผลิตของกรดซิตริก

5.5 การยืนยันสภาวะเหมาะสมสูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการของ *A. niger* TISTR 3063

การทดลองนี้ได้ยืนยันสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดซิตริกจาก *A. niger* TISTR 3063 โดยการปรับสภาวะต่างๆ รวมถึงอุณหภูมิและการกวนในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่า การผลิตกรดซิตริกเริ่มต้นที่ 2.56 กรัมต่อลิตรในเวลา 0 ชั่วโมงและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึง 26.88 กรัมต่อลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง การลดลงของความเข้มข้นของกลูโคสและการเพิ่มขึ้นของมวลเซลล์แสดงถึงการเจริญเติบโตของเชื้อราที่สัมพันธ์กับการผลิตกรดซิตริก โดยการลดลงของกลูโคสชี้ให้เห็นถึงการใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานหลักในการผลิตกรดซิตริก การเพิ่มขึ้นของกรดซิตริกในระยะยาวนี้แสดงให้เห็นถึงการสะสมของกรดซิตริกในกระบวนการหมักที่ยังคงมีความสัมพันธ์กับการใช้กลูโคส ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 สามารถผลิตกรดซิตริกได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะที่เหมาะสม และสามารถใช้เป็นพื้นฐานในการปรับกระบวนการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม

5.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus luchuensis* เพื่อยืนยันสภาวะการผลิตกรดซิตริกในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดลองนี้มีจุดประสงค์ในการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *Aspergillus luchuensis* ซึ่งเป็นอีกหนึ่งสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดซิตริกได้ดีในการหมัก การทดลองเริ่มต้นด้วยการปรับเปลี่ยนตัวแปรสำคัญหลายตัว ได้แก่ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N

ratio) ความเร็วรอบในการเขย่า และการเติมแคลเซียมคลอไรด์ เพื่อหาเงื่อนไขที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดซิตริกในห้องปฏิบัติการ

จากผลการทดลอง พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 97.93 กรัมต่อกรัม และการตั้งค่าความเร็วรอบในการเขย่า 300 รอบต่อนาทีให้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด โดยในช่วง 240 ชั่วโมงแรกของการหมัก ปริมาณกรดซิตริกเริ่มต้นที่ 2.56 กรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นเป็น 28.47 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมอาหารใหม่ในช่วงเวลานี้ไม่เพียงแต่ช่วยเพิ่มผลผลิตกรดซิตริก แต่ยังทำให้กรดซิตริกสะสมอย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 240 ชั่วโมง นอกจากนี้ ความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้ในกระบวนการหมักลดลงจาก 96.71 กรัมต่อลิตรเป็น 53.71 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลาเดียวกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อรา *A. luchuensis* SK01 ใช้กลูโคสอย่างมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริก

5.7 การศึกษาการผลิตกรดซิตริก และการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อราในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง

การทดลองนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ภายใต้การใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการดัดแปลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในช่วงการหมักที่ 0 ชั่วโมง การผลิตกรดซิตริกเริ่มต้นที่ 2.56 กรัมต่อลิตรและเพิ่มขึ้นต่อเนื่องจนถึง 28.16 กรัมต่อลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง สำหรับ *A. niger* TISTR 3063 ซึ่งแสดงถึงการสะสมของกรดซิตริกที่สอดคล้องกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานหลัก ในขณะเดียวกัน *A. luchuensis* SK01 เริ่มต้นการผลิตกรดซิตริกที่ 0.67 กรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 29.64 กรัมต่อลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่สูงกว่าในการผลิตกรดซิตริกเมื่อเทียบกับ *A. niger*

การศึกษาจลนพลศาสตร์ในการผลิตกรดซิตริกพบว่าในช่วงเริ่มต้นของการหมัก *A. niger* TISTR 3063 มีการเติบโตอย่างรวดเร็วและใช้กลูโคสจนหมดภายในช่วงแรกของการหมัก ขณะที่ *A. luchuensis* SK01 แสดงอัตราการใช้กลูโคสและการเติบโตที่มีประสิทธิภาพดีกว่า โดยมวลเซลล์ของ *A. luchuensis* SK01 เพิ่มขึ้นจาก 25.31 กรัมต่อลิตรเป็น 45.88 กรัมต่อลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง ขณะที่ *A. niger* TISTR 3063 มีการเติบโตที่ลดลงหลังจาก 240 ชั่วโมง การลดลงของมวล

เซลล์และการลดลงของกรดซิตริกหลังจากจุดสูงสุดอาจเกิดจากการสะสมของกรดซิตริกในระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์

5.8 ผลการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดซิตริกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ

การศึกษาการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดซิตริกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จในงานนี้มีเป้าหมายเพื่อทำนายพฤติกรรมของการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 รวมถึงการผลิตกรดซิตริกในสภาวะการหมักที่มีการควบคุมพารามิเตอร์ต่าง ๆ โดยแบบจำลองนี้พัฒนาเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของการผลิตกรดซิตริกตลอดระยะเวลาการหมัก การเจริญเติบโตของเชื้อรา และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองที่ใช้สามารถทำนายการเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริกได้อย่างแม่นยำ โดยอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราและการใช้กลูโคสในระบบหมักได้ดี แบบจำลองนี้ใช้ข้อมูลเชิงสถิติเพื่อหาค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง เช่น อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด (μ_{max}) และปริมาณกรดซิตริกสูงสุด (P_{max}) ซึ่งผลการทดลองพบว่า *A. luchuensis* SK01 มีค่า μ_{max} และ P_{max} สูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 สะท้อนถึงประสิทธิภาพที่สูงกว่าในการใช้กลูโคสและการผลิตกรดซิตริก โดยเฉพาะการประเมินค่า P_{max} ใน *A. luchuensis* SK01 ที่สูงกว่าช่วยยืนยันว่าเชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดซิตริกได้มากกว่า *A. niger* TISTR 3063 ภายใต้สภาวะการหมักที่เหมาะสม การสร้างแบบจำลองนี้ไม่เพียงแต่ช่วยให้เข้าใจถึงการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริกในเชิงทฤษฎี แต่ยังสามารถนำไปใช้ในการออกแบบและปรับปรุงกระบวนการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนในกระบวนการผลิตกรดซิตริก

5.9 การศึกษาการผลิตกรดซิตริก และการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชื้อราในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง

การทดลองการผลิตกรดซิตริกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงมุ่งเน้นการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 โดยใช้ระบบหมักแบบป้อนที่เติมสารอาหารใหม่ตลอดระยะเวลาเพื่อให้เชื้อราได้รับสารอาหารอย่างต่อเนื่อง

และสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด ผลการทดลองพบว่า *A. niger* TISTR 3063 เริ่มผลิตกรดซิตริกที่ 0.97 กรัมต่อลิตรในเวลา 0 ชั่วโมงและเพิ่มขึ้นถึง 28.16 กรัมต่อลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง โดยการลดลงของกลูโคสจาก 97.41 กรัมต่อลิตรเป็น 78.98 กรัมต่อลิตร. ในขณะที่ *A. luchuensis* SK01 เริ่มผลิตกรดซิตริกที่ 0.96 กรัมต่อลิตรและสามารถเพิ่มผลผลิตถึง 29.52 กรัมต่อลิตรในเวลา 384 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการใช้กลูโคสและการผลิตกรดซิตริกที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 ผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าเมื่อการเติมอาหารใหม่ในช่วงเวลา 240 ชั่วโมง การผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การศึกษาจลนพลศาสตร์ในระหว่างกระบวนการหมักแสดงให้เห็นว่า *A. luchuensis* SK01 มีอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิตริกที่ดีกว่า โดยสามารถใช้กลูโคสได้มากขึ้นและผลิตกรดซิตริกในปริมาณที่สูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 การสะสมของกรดซิตริกในระดับสูงสุดแสดงให้เห็นว่าเชื้อราเริ่มเข้าสู่สภาวะการเติบโตที่ช้าลงหลังจากการใช้กลูโคสหมดไป ซึ่งอาจเกิดจากการสะสมของกรดซิตริกที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดลองนี้เน้นย้ำถึงความสำคัญของการควบคุมสภาวะการหมักและการเติมสารอาหารอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมได้

5.10 การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตกรดซิตริกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน

การทดลองนี้เน้นการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อทำนายและเข้าใจพฤติกรรมการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน โดยใช้แบบจำลอง Gompertz และ Logistic เพื่อประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริกในระบบการหมักที่เติมสารอาหารใหม่อย่างต่อเนื่อง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโมเดลทั้งสองสามารถจับพฤติกรรมของกระบวนการหมักได้อย่างแม่นยำ โดยสามารถอธิบายการเจริญเติบโตของเชื้อราและการสะสมของกรดซิตริกในช่วงต่าง ๆ ของการหมักได้อย่างถูกต้อง โดยเฉพาะใน *A. luchuensis* SK01 ซึ่งแสดงผลการผลิตกรดซิตริกที่สูงกว่า *A. niger* TISTR 3063 โมเดล Gompertz และ Logistic สามารถทำนายค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่น อัตราการเติบโตสูงสุด (μ_{max}) และปริมาณกรดซิตริกสูงสุด (P_{max}) ได้แม่นยำ ซึ่งแสดงถึงความสามารถของเชื้อราในการใช้กลูโคสและการผลิตกรดซิตริก โมเดลเหล่านี้ยังช่วยให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตกรดซิตริกและปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อกระบวนการหมัก เช่น ความเร็วในการเติมสารอาหาร ความเข้มข้นของกลูโคส และความสมดุลของระบบ ผลการทดลองนี้ช่วยให้สามารถคาดการณ์ผลลัพธ์จากการปรับตัวแปรต่าง

ๆ ในกระบวนการหมัก ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมได้ โดยทำให้สามารถควบคุมกระบวนการหมักให้ได้ผลผลิตสูงสุดในต้นทุนที่มีประสิทธิภาพ

5.11 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

5.11.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อให้เห็นรายละเอียดการเจริญเติบโตของไมซีเลียมและโครงสร้างอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตกรดซิตริก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไมซีเลียมของ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 มีลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างการเจริญเติบโต โดย *A. niger* TISTR 3063 แสดงเส้นใยที่บางและกระจายตัวเป็นเส้นใยที่สานกันอย่างหนาแน่น ขณะที่ *A. luchuensis* SK01 มีการกระจายตัวของไมซีเลียมในลักษณะของเม็ดทรงกลมที่หนาแน่นมากขึ้น การศึกษาไมซีเลียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นว่าไมซีเลียมของทั้งสองสายพันธุ์ยังคงสมบูรณ์และไม่ได้รับความเสียหายจากกระบวนการกวนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งบ่งชี้ถึงความสามารถของทั้งสองสายพันธุ์ในการรักษาความสมบูรณ์ของโครงสร้างในสภาวะที่มีการกวนที่ความเร็วสูง นอกจากนี้ ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของเชื้อราในรูปแบบที่ไม่ทำลายเส้นใย ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการรักษาคุณภาพของการผลิตกรดซิตริกในกระบวนการหมัก การศึกษาสัณฐานวิทยานี้ให้ข้อมูลสำคัญเกี่ยวกับลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อราและช่วยในการควบคุมสภาวะการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตกรดซิตริกที่สูงสุดในกระบวนการอุตสาหกรรม

5.11.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของมวลเซลล์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การศึกษาสัณฐานวิทยาของมวลเซลล์เชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงมีวัตถุประสงค์เพื่อสังเกตการเจริญเติบโตของไมซีเลียมและโครงสร้างเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมัก ผลการทดลองพบว่าไมซีเลียมของทั้งสองสายพันธุ์มีลักษณะการเติบโตที่แตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาสก์และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ในสภาวะการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ ไมซีเลียมของ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 มัก

รวมตัวกันเป็นเม็ดทรงกลมกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งแสดงถึงการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างไม่เป็นระเบียบ ในขณะเดียวกัน ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวน ไมซีเลียมของ *A. niger* TISTR 3063 แสดงการกระจายตัวเป็นเส้นใยบาง ๆ ขณะที่ *A. luchuensis* SK01 ยังคงมีลักษณะการรวมตัวเป็นเม็ดทรงกลมที่หนาแน่น การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงให้เห็นว่าไมซีเลียมของทั้งสองสายพันธุ์ยังคงสมบูรณ์และไม่มีการทำลายหรือการตัดขาดของเส้นใยในกระบวนการหมัก ซึ่งบ่งชี้ถึงความสามารถของเชื้อราในการเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะการหมักที่มีการกวน ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า การควบคุมสภาวะการหมัก โดยเฉพาะการกวน ไม่ได้ส่งผลเสียต่อโครงสร้างไมซีเลียมและสามารถรักษาความสมบูรณ์ของเชื้อราได้ ข้อมูลเหล่านี้มีความสำคัญในการปรับปรุงกระบวนการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม โดยการรักษาคูณภาพของไมซีเลียมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตและลดความเสี่ยงจากการทำลายโครงสร้างเซลล์ที่อาจส่งผลต่อผลผลิตกรดซิตริก

5.11.3 การศึกษาสัณฐานวิทยาของมวลเซลล์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscopy: SEM)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของมวลเซลล์เชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ได้ทำการวิเคราะห์โครงสร้างของไมซีเลียมและมวลเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมัก โดยการใช้ SEM ช่วยให้สามารถเห็นรายละเอียดของเซลล์ในระดับนาโนเมตร ซึ่งช่วยให้เข้าใจถึงความสมบูรณ์ของไมซีเลียมที่เกิดขึ้นในระบบการหมัก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไมซีเลียมของ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 ยังคงรักษาความสมบูรณ์ได้ดีแม้ในระหว่างการหมักที่มีการกวนที่ความเร็วสูงและมีการใช้สารอาหารที่สูง ในกรณีของ *A. niger* TISTR 3063 ไมซีเลียมมีลักษณะเป็นเส้นใยบาง ๆ ซึ่งกระจายตัวเป็นระเบียบและไม่พบการทำลายหรือการตัดขาดของเส้นใยจากกระบวนการกวน สำหรับ *A. luchuensis* SK01 ไมซีเลียมแสดงลักษณะของเม็ดทรงกลมที่หนาแน่นและกระจายตัวอย่างหนาแน่น แสดงถึงการเจริญเติบโตที่มีความหนาแน่นสูง ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าในทั้งสองสายพันธุ์ไมซีเลียมยังคงสมบูรณ์และไม่ได้รับความเสียหายจากการหมัก โดยการกวนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพไม่ได้ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของไมซีเลียม นอกจากนี้ การศึกษาผ่าน SEM ยังช่วยยืนยันว่าการหมักในระบบนี้สามารถรักษาความสมบูรณ์ของไมซีเลียมและไม่ทำให้เกิดความเสียหายที่อาจส่งผลต่อการผลิตกรดซิตริก การรักษาความสมบูรณ์ของไมซีเลียมถือเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริก เนื่องจากไมซีเลียมที่สมบูรณ์

สามารถช่วยเพิ่มการย่อยสลายสารตั้งต้นและผลิตกรดซิตริกได้มากขึ้น ข้อมูลเหล่านี้จึงมีความสำคัญในการพัฒนากระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในระดับอุตสาหกรรม

5.12 การวิเคราะห์แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการ

การวิเคราะห์แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree) ในการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *A. luchuensis* SK01 ที่คัดแยกจากธรรมชาติ โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของส่วน 26S rRNA กับสายพันธุ์อื่น ๆ ในกลุ่ม *Aspergillus* ผ่านเทคนิค PCR. ผลการทดลองพบว่า *A. luchuensis* SK01 มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับ *A. niger* TISTR 3063 และ *A. tubingensis* ซึ่งสามารถยืนยันได้จากแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการที่แสดงถึงความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน การใช้แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการช่วยให้เห็นภาพความสัมพันธ์ของเชื้อราในกลุ่มเดียวกันและยืนยันความถูกต้องในการระบุสายพันธุ์ โดยมีข้อมูลที่แม่นยำในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราในกระบวนการผลิตกรดซิตริก ข้อมูลจากการวิเคราะห์แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการนี้สำคัญในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดซิตริก เนื่องจากการเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่เหมาะสมสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตและปรับปรุงคุณภาพของกรดซิตริกได้ การยืนยันเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมนี้ยังเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการศึกษาพันธุกรรมของเชื้อราในงานวิจัยทางอุตสาหกรรมและการเกษตร ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกรดซิตริกในอนาคต

5.13 การตกตะกอนกรดซิตริก

จากลักษณะทางกายภาพของกรดซิตริกทั้ง 4 แหล่ง พบว่า กรดซิตริกเกรดวิเคราะห์ มีน้ำหนักโมเลกุล 210.14 กรัมต่อโมล (Sisco Research Laboratories, India) และ กรดซิตริกเกรดอาหาร มีน้ำหนักโมเลกุล 210.14 กรัมต่อโมล (Tokyo Chemical Industry, India) ส่วนกรดซิตริกที่ได้จากกระบวนการตกตะกอนจากน้ำหมัก *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 มีลักษณะเป็นผงละเอียดไม่เป็นผลึก ลักษณะเด่นที่คล้ายกันของกรดซิตริกทั้ง 4 แหล่ง คือ เป็นสารไม่มีสีไม่มีกลิ่น และสามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิห้อง

5.13.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์กรดซิตริกจากเชื้อรา

การศึกษาด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (FT-IR) ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกรดซิตริกที่ผลิตจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางเคมีของกรดซิตริกที่ผลิตจากการหมักและกรดซิตริกเชิงพาณิชย์ ผลการทดลองพบว่า กรดซิตริกจากทั้งสองสายพันธุ์เชื้อรามีลักษณะการดูดซับในช่วงพิกที่

สำคัญซึ่งแสดงถึงการยืดตัวของหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) และคาร์บอนิล (C=O) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของกรดซิตริก พิกการยืดตัวของ O-H ที่พบในสเปกตรัม FT-IR ชี้ให้เห็นถึงการมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของกรดซิตริก สะท้อนถึงความสามารถในการละลายน้ำของกรดซิตริกที่ได้ นอกจากนี้พิกที่เกี่ยวข้องกับคาร์บอนิล (C=O) ยังแสดงให้เห็นถึงลักษณะของกรดคาร์บอนิกในกรดซิตริก แม้ว่ามีความแตกต่างเล็กน้อยในสเปกตรัมระหว่างกรดซิตริกที่ผลิตจาก *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* ข้อมูลนี้ยังคงแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบทางเคมีของกรดซิตริกจากการหมักมีลักษณะคล้ายคลึงกับกรดซิตริกเชิงพาณิชย์ที่จำหน่ายในตลาด การใช้เทคนิค FT-IR จึงเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการยืนยันคุณภาพของกรดซิตริกที่ผลิตจากกระบวนการหมัก และสามารถใช้ในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในกระบวนการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างแม่นยำ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเทคนิค FT-IR เป็นเครื่องมือที่สำคัญในการวิเคราะห์และตรวจสอบคุณภาพของกรดซิตริกทั้งในแง่ของการผลิตในห้องปฏิบัติการและการผลิตเชิงพาณิชย์

5.14 ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาที่ได้จากงานวิจัยนี้ พบว่าการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 สามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ยังมีบางปัจจัยที่สามารถพัฒนาและปรับปรุงเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ดียิ่งขึ้นในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นข้อเสนอแนะในการพัฒนางานวิจัยเพิ่มเติมมีดังนี้

5.14.1 การปรับปรุงกระบวนการหมัก

การควบคุม pH ในระหว่างการหมักเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตกรดซิตริก เนื่องจากการสะสมของกรดซิตริกในระหว่างการหมักอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อราและกระบวนการผลิตกรดซิตริกโดยรวม ดังนั้นควรศึกษาและพัฒนา ระบบควบคุม pH อย่างเหมาะสมตลอดการหมัก เพื่อให้การผลิตกรดซิตริกมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยการควบคุม pH ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดซิตริก เช่น การควบคุม pH ให้อยู่ในช่วง 3-4 นอกจากนี้การเติมสารอาหารในระหว่างการหมัก เช่น แหล่งไนโตรเจน หรือ แหล่งแร่ธาตุ อาจส่งผลดีต่อการผลิตกรดซิตริก ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเติมสารอาหารที่จำเป็นในช่วงต่าง ๆ ของกระบวนการหมักเพื่อเพิ่มผลผลิตกรดซิตริกในระยะยาว และลดต้นทุนการผลิต

5.14.2 การพัฒนาระบบการหมักในระดับการผลิตนำร่อง (Pilot scale)

จากห้องปฏิบัติการสู่ระดับการผลิตนำร่อง (Pilot scale) แม้ว่าการทดลองในห้องปฏิบัติการจะสามารถทดสอบการผลิตกรดซิตริกได้ในระดับหนึ่ง แต่ในระดับอุตสาหกรรมต้องพิจารณาหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องมากขึ้น เช่น อัตราการเติมสารอาหาร ความเร็วในการเขย่า อุณหภูมิ และการควบคุม pH ซึ่งอาจมีผลกระทบที่แตกต่างจากในห้องปฏิบัติการ ควรทำการทดลองในระดับ pilot scale หรือ industrial scale เพื่อตรวจสอบว่า กระบวนการหมัก ที่ใช้ในระดับห้องปฏิบัติการยังคงได้ผลลัพธ์ที่ดีเมื่อขยายไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมหรือไม่ การศึกษาในระบบขนาดใหญ่จะช่วยให้สามารถควบคุมปัจจัยเหล่านี้ได้ดียิ่งขึ้น และช่วยให้ข้อมูลที่เหมาะสมในการปรับกระบวนการให้เหมาะสมกับการผลิตในปริมาณมาก

5.14.3 การใช้โมเดลทางคณิตศาสตร์ที่แม่นยำ

การใช้ โมเดลทางคณิตศาสตร์ ที่หลากหลายสามารถช่วยเพิ่มความแม่นยำในการทำนายการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 โดยผลการศึกษาล่าสุดชี้ให้เห็นว่า โมเดล Gompertz และ Logistic เป็นโมเดลที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีในการทำนายการผลิตกรดซิตริก แต่ โมเดล Monod อาจไม่สามารถทำนายได้อย่างแม่นยำ เนื่องจากไม่คำนึงถึงปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก เช่น การสะสมของกรดซิตริกหรือการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ในการศึกษาครั้งถัดไป ควรพิจารณาใช้ Contois model หรือ Hybrid models ซึ่งมีความสามารถในการจับความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนของการผลิตกรดซิตริกได้ดีกว่า นอกจากนี้ การใช้ ข้อมูลจากการทดลองจริง เพื่อพัฒนา โมเดลทางคณิตศาสตร์ จะช่วยเพิ่มความแม่นยำในการทำนายการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม การพัฒนา แบบจำลองการหมัก ที่สามารถคำนวณและปรับปรุงกระบวนการผลิตให้เหมาะสมยิ่งขึ้นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริกในระยะยาว

5.14.4 การพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อรา

การพัฒนาสายพันธุ์ที่ทนทานเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 เนื่องจากเชื้อราเหล่านี้อาจมีข้อจำกัดในการเจริญเติบโตเมื่อเจอกับความเข้มข้นของกรดซิตริกที่สูงหรือภาวะเครียดจากการขาดสารอาหาร การพัฒนาสายพันธุ์ genetically modified (GM) หรือ mutagenized strains ที่ทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมสามารถช่วยเพิ่มการผลิตกรดซิตริกในปริมาณสูงได้ การพัฒนาสายพันธุ์ที่สามารถทนทาน

ต่อกรดซิตริกที่สะสมในกระบวนการหมักและยังคงมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดซิตริกเป็นสิ่งสำคัญที่ควรศึกษาต่อไป นอกจากนี้ การคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมก็เป็นอีกหนึ่งวิธีที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริก โดยการเลือกใช้ สายพันธุ์เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูง ในการผลิตกรดซิตริก ควรคัดเลือกจากเชื้อราที่สามารถผลิตกรดซิตริกในปริมาณสูงและมีความสามารถในการทนทานต่อการสะสมของกรดซิตริกที่มาก

5.14.5 การใช้เทคนิคการวิเคราะห์ที่หลากหลาย

การใช้เทคนิคการวิเคราะห์ที่แม่นยำ โดยการใช้ FT-IR เพื่อวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีของกรดซิตริกที่ผลิตจากเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 และ *A. luchuensis* SK01 เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ หมู่ฟังก์ชัน และ สารปนเปื้อน ในกรดซิตริกที่ผลิตจากแหล่งต่าง ๆ แต่ควรใช้ เทคนิคการวิเคราะห์อื่น ๆ เช่น HPLC หรือ GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดมากขึ้นเกี่ยวกับคุณสมบัติของกรดซิตริก ความบริสุทธิ์ และการแยกแยะสารต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิต

5.14.6 การศึกษาความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์

5.14.6.1 การใช้แหล่งคาร์บอนทางเลือกที่มีต้นทุนต่ำและยั่งยืน

การทดแทนกลูโคสด้วยแหล่งคาร์บอนทางเลือก เช่น ซูโครส มอลโตส ฟรุคโตส หรือแป้งที่ย่อยแล้ว (hydrolyzed starch) สามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ แหล่งคาร์บอนเหล่านี้มีความสามารถในการทดแทนกลูโคสได้ดี โดยมีผลต่ออัตราการเผาผลาญของเชื้อรา และการผลิตกรดซิตริกที่มีคุณภาพเทียบเท่ากับการใช้กลูโคส การเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสามารถทำได้โดยการทดลองเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ในกระบวนการหมักเพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดที่จะให้ผลผลิตสูงและต้นทุนต่ำ การใช้แหล่งคาร์บอนที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้ง เช่น กากน้ำตาล หรือแป้งที่ได้จากข้าวโพดและมันสำปะหลัง ยังสามารถช่วยลดต้นทุนในการจัดหาวัตถุดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่กระทบต่อการผลิตกรดซิตริกในปริมาณที่ต้องการ

5.14.6.2 ปรับปรุงกระบวนการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิต

การปรับปรุงกระบวนการหมักโดยการควบคุมพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ ค่า pH และระยะเวลาในการหมักสามารถมีผลอย่างมากต่อผลผลิตของกรดซิตริก ตัวอย่างเช่น การปรับอุณหภูมิในระหว่างการตกตะกอนหรือการควบคุมการระบายอากาศในกระบวนการหมักจะช่วยให้การผลิตกรดซิตริกมีประสิทธิภาพสูงขึ้นและลดต้นทุนได้ นอกจากนี้ การใช้เทคนิคการหมักแบบในอาหารเหลว (Submerged Fermentation) ซึ่งสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมได้ง่ายและมีผลผลิตสูง ยังสามารถช่วยลดการใช้กลูโคสในกระบวนการได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น อีกทั้งการพิจารณาการใช้เทคนิคการหมักแบบป้อน (Fed-batch) ในกระบวนการผลิตกรดซิตริก ก็สามารถช่วยให้กระบวนการมีความยืดหยุ่นสูงขึ้นและช่วยลดการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีต้นทุนสูงลงได้

5.14.6.3 การใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร

การใช้วัสดุเหลือทิ้งจากเกษตรกรรม เช่น กากน้ำตาลหรืออาหารเลี้ยงเชื้อจากแบ่งในการผลิตกรดซิตริกจะช่วยให้กระบวนการมีต้นทุนที่ต่ำและมีความยั่งยืนสูงขึ้น วัสดุเหล่านี้สามารถทดแทนแหล่งคาร์บอนที่มีราคาสูงได้ โดยที่ไม่กระทบต่อผลผลิตของกรดซิตริก ซึ่งจะทำให้กระบวนการผลิตกรดซิตริกมีต้นทุนที่ลดลง และยังเป็นการสนับสนุนการใช้ทรัพยากรท้องถิ่นและการหมุนเวียนของวัสดุในอุตสาหกรรม

5.14.6.4 การเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการฟื้นฟูกรดซิตริก

การใช้เทคนิคต่าง ๆ ในการฟื้นฟูกรดซิตริก เช่น การตกตะกอน การกรอง หรือการใช้เรซินดูดซับ เพื่อแยกกรดซิตริกจากน้ำหมักสามารถเพิ่มผลผลิตและลดของเสียที่เกิดจากการใช้สารเคมีต่าง ๆ ในกระบวนการ การศึกษาวิธีการฟื้นฟูที่เหมาะสมจะช่วยให้กรดซิตริกที่ได้มีคุณภาพสูงและสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ต้องใช้ต้นทุนสูงในการกำจัดของเสียจากกระบวนการผลิต

บรรณานุกรม

- Akram, M. (2014). Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. *Cell Biochemistry and Biophysics (Cell Biochem. Biophys.)*, 475-478.
- Amato, A., Becci, A., & Beolchini, F. (2020). Citric acid bioproduction: the technological innovation change. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-14. doi:10.1080/07388551.2019.1709799
- Amato, A., Becci, A., & Beolchini, F. (2020). Citric acid bioproduction: The technological innovation change. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 199-212.
- Anastassiadis, S., Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V., & Finogenova, T. V. (2008). Citric acid production patent review. *Recent Pat Biotechnol.*, 107-123.
- Anastassiadis, S., Morgunov, I., Kamzolova, S., & Finogenova, T. (2008). Citric acid production patent review. *Recent Patents on Biotechnology*, Volume 2, Pages 107-123. doi:https://doi.org/10.2174/187220808784619757
- Angumeenal, A., & Venkappayya, D. (2013). An overview of citric acid production. *LWT-Food Science and Technology*, 367-370. doi:10.1016/j.lwt.2012.05.016
- Apelblat, A. (2014). *Citric acid*. Springer eBooks. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-11233-6
- Apelblat, A. (2014). *Citric Acid*. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer International Publishing.
- Araújo, E., Coelho, F., Balarini, J., Miranda, T., & Salum, A. (2017). Solvent Extraction of Citric Acid with Different Organic Phases. *Advances in Chemical Engineering and Science (Adv. Chem. Eng. Sci.)*, 7, 304-324. doi:10.4236/aces.2017.7302
- Arisan-Atac, I., Wolschek, M., & Kubicek, C. (1996). Trehalose-6-phosphate synthase A affects citrate accumulation by *Aspergillus niger* under conditions of high glycolytic flux. *FEMS Microbiology Letters (FEMS Microbiol. Lett.)*, 77-83.
- Bauweleers, H., Groeseneken, D., & Van Peij, N. (2014). *Patent No. US8637280B2*.
- Behera, B. (2020). Citric acid from *Aspergillus niger*: A comprehensive overview. *Critical Reviews in Microbiology (Crit. Rev. Microbiol.)*, 727-749.

- Behera, B. C., Mishra, R., & Mohapatra, S. (2021). Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. *Food Front*, 62-76.
- Benghazi, L., Record, E., Suárez, A., Gomez-Vidal, J., Martínez, J., & de la Rubia, T. (2014). Production of the *Phanerochaete flavidio-alba* laccase in *Aspergillus niger* for synthetic dyes decolorization and biotransformation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology (World J Microbiol Biotechnol)*, Volume 30, Pages 201–211.
- Berg, J., Jeremy, M., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. W.H. Freeman.
- Berovic, M., & Legisa, M. (2007). Citric acid production. *Biotechnology Annual Review*, 303–343. doi:[https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13011-8](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13011-8)
- Bhattacharjee, I., & Baruah, P. (2015). *Isolation and screening of citric acid producing Aspergillus spp. and optimisation of citric acid production by Aspergillus niger* S-6. Figshare. doi:10.6084/m9.figshare.1347401.v1
- Bízek, V., Horáček, J., & Koušová, M. (1993). Amine extraction of citric acid: effect of diluent. *Chemical Engineering Science*, 48(8), 1447–1457. doi:[https://doi.org/10.1016/0009-2509\(93\)80051-q](https://doi.org/10.1016/0009-2509(93)80051-q)
- Chen, H., He, X., Geng, H., & Liu, H. (2014). Physiological characterization of ATP-citrate lyase in *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1-11.
- Cheng, K., Zhao, X., Zeng, J., Wu, R., Xu, Y., Liu, D., & Zhang, J. (2012). Downstream processing of biotechnologically produced succinic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(4), 841-850. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4214-x>
- Chergui, D., Akretche-Kelfat, S., Lamoudi, L., Al-Rshaidat, M., Boudjelal, F., & Ait-Amar, H. (2021). Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* using two downgraded Algerian date varieties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 7134–7141.
- Choi, Y., & Verpoorte, R. (2019). Green Solvents for the Extraction of Bioactive Compounds from Natural Products Using Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents. *Current Opinion in Food Science (Curr. Opin. Food Sci.)*, 26, 87–93. doi:10.1016/j.cofs.2019.04.003

- Cordes, T., Michelucci, A., & Hiller, K. (2015). Itaconic Acid: The Surprising Role of an Industrial Compound as a Mammalian Antimicrobial Metabolite. *Annual Review of Nutrition (Annu. Rev. Nutr.)*, 451-473.
- Couto, S., & Sanromán, M. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291–302. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022
- Currie, J. (1917). The citric acid fermentation of *A. niger*. *Journal of Biological Chemistry (J. Biol. Chem.)*, 5.
- Daneshfar, A., Baghlani, M., Sarabi, R., Sahraei, R., Abassi, S., Kaviyan, H., & Khezeli, T. (2012). Solubility of citric, malonic, and malic acids in different solvents from 303.2 to 333.2K. *Fluid Phase Equilibria*, 11-15.
- Daniel, A., & Gonen, D. (1991). *Patent No. US4994609A*.
- Darouneh, E., Alavi, A., Vosoughi, M., Arjmand, M., Sifkordi, A., & Rabaji, R. (2009). Citric acid production: surface culture versus submerged culture. *African Journal of Microbiology Research*, Volume 3, Pages 541–545.
- Datta, D., Aşçi, Y., & Tuyun, A. (2015). Intensification of citric acid extraction by a mixture of trioctylamine and tridodecylamine in different diluents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 60(3), 960-965. doi:10.1021/je5010577
- Datta, D., Kumar, S., & Uslu, H. (2015). Status of the reactive extraction as a method of separation. *Journal of Chemistry*, 1-16. doi:https://doi.org/10.1155/2015/853789
- De Carvalho, J., Medeiros, A., Vandenberghe, L., Magalhães, A., & Soccol, C. (2017). Approaches for the Isolation and Purification of Fermentation Products. In J. De Carvalho, A. Medeiros, L. Vandenberghe, A. Magalhães, & C. Soccol, *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 783–805). Amsterdam, Netherlands: Elsevier. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00034-8
- Dhillon, G., Brar, S., Kaur, S., & Verma, M. (2013). Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. *Ind. Crops Prod.*, 78-84. doi:10.1016/j.indcrop.2012.04.001
- Djas, M., & Henczka, M. (2016). Reactive Extraction of Citric Acid Using Supercritical

- Carbon Dioxide. *Journal of Supercritical Fluids (J. Supercrit. Fluids)*, 117, 59–63. doi:10.1016/j.supflu.2016.05.005
- Dobladez, J., Maté, V., Santos, D., Torrellas, S., & Larriba, M. (2018). Citric Acid Purification by Simulated Moving Bed Adsorption with Methanol as Desorbent. *Separation Science and Technology*, 54(6), 930–942. doi:10.1080/01496395.2018.1524909
- Drysdale, C., & McKay, A. (1995). Citric acid production by *Aspergillus niger* in surface culture on inulin. *Letters in Applied Microbiology (Lett Appl Microbiol)*, Volume 20, Pages 252–254.
- Dziezak, J. (2003). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Falony, G., Armas, J., Mendoza, J., & Hernández, J. (2006). Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technol Biotech*, 235–240.
- Felman, S., Patel, C., Patwardhan, B., & Solow, D. (1998). *Patent No. US5712131A*.
- Fiume, M., & Heldreth, B. (2012, June 22). *On the Safety Assessment of Citric Acid, Inorganic Citrate Salts, and Alkyl Citrate Esters as Used in Cosmetics*. Retrieved from Cosmetic Ingredient Review (CIR).
- Harrison, R., Todd, P., Todd, P., Rudge, S., & Petrides, D. (2015). *Bioseparations Science and Engineering*. New York: Oxford University Press, USA.
- Heding, L., & Gupta, J. (1975). Improvement of conditions for precipitation of citric acid from fermentation mash. *Biotechnology and Bioengineering*, 1363–1364. doi:10.1002/bit.260170910
- Hong, S., Lee, M., Kim, D., Varga, J., Frisvad, J., Perrone, G., . . . Samson, R. (2013). *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS ONE*, e63769.
- Hong, Y., Hong, W., & Han, D. (2001). Application of reactive extraction to recovery of carboxylic acids. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(6), 386–394. doi:https://doi.org/10.1007/bf02932319
- Hu, Y., Kwan, T., Daoud, W., & Lin, C. (2017). Continuous ultrasonic-mediated solvent extraction of lactic acid from fermentation broths. *Journal of Cleaner*

- Production*, 142-150. doi:10.1016/j.jclepro.2017.01.055
- Ikram-ul, H., Ali, S., Qadeer, M., & Iqbal, J. (2004). Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. *Bioresource Technology*, Volume 93, Pages 125–130. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.018>
- IMARC Group. (3 October 2023). *Citric Acid Market Size, Trends and Forecast 2023–2028*. เข้าถึงได้จาก IMARC Group.: <https://www.imarcgroup.com/citric-acid-manufacturing-plant>
- Käppeli, O., Müller, M., & Fiechter, A. (1978). Chemical and structural alterations at the cell surface of *Candida tropicalis*, induced by hydrocarbon substrate. *Journal of Bacteriology*, 952–958.
- Karaffa, L., & Kubicek, C. (2003). *Aspergillus niger* citric acid accumulation: Do we understand this well working black box? *Applied Microbiology and Biotechnology (Appl. Microbiol. Biotechnol.)*, 189-196.
- Kareem, S., Akpan, I., & Alebiowu, O. (2010). Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste. *Malaysian Journal of Microbiology*, 161-165.
- Keshav, A., Norge, P., & Wasewar, K. (2012). Reactive Extraction of Citric Acid Using Tri-n-octylamine in Nontoxic Natural Diluents: Part 1 — Equilibrium Studies from Aqueous Solutions. *Applied Biochemistry and Biotechnology (Appl. Biochem. Biotechnol.)*, 167, 197–213. doi:10.1007/s12010-012-9682-z
- Kiel, H., Guvrin, R., & Henis, Y. (1981). Citric acid fermentation by *Aspergillus niger* on low sugar concentrations and cotton waste. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 42, Pages 1–4.
- Kishore, K., Kumar, M., Krishna, V., & Reddy, G. (2008). Optimization of process variables of citric acid production using *Aspergillus niger* in a batch fermentor. *Engineering Letters*, Volume 16, Pages 572–577.
- Kristiansen, B., Linden, J., & Matthey, M. (1998). *Citric acid biotechnology*. London: CRC Press.
- Kristiansen, B., Matthey, M., & Linden, J. (1999). Biochemistry of citric acid production by yeasts. In M. Matthey, *Citric Acid Biotechnology* (pp. 33-54). London: Taylor and Francis.
- Książek, E. (2023). Citric acid: Properties, microbial production, and applications in

- industries. *Molecules*, 22.
- Kulprathipanja, S. (1988). *USA Patent No. US4720579*.
- Kulprathipanja, S. (1989). *USA Patent No. US4851574*.
- Kulprathipanja, S. (1991). *USA Patent No. US5068419*.
- Lambros, M., Tran, T. H., Fei, Q., & Nicolaou, M. (2022). Citric Acid: A Multifunctional Pharmaceutical Excipient. *Pharmaceutics*, 972.
- Ledakowicz, S., Jamroz, T., Sencio, B., & Gluszczyk, P. (2004). Equilibrium and dynamic investigations of organic acids adsorption onto ion-exchange resins. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(3), 185–190. doi:10.1007/s00449-003-0348-7
- Legiša, M., & Matthey, M. (2007). Changes in primary metabolism leading to citric acid overflow in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters (Biotechnol. Lett.)*, 181–190.
- Lende, S. V., Karemore, H., & Umekar, M. J. (2021). Review on production of citric acid by fermentation technology. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 85–93.
- LeŚniak, W. (2002). *Biotechnologia Żywności: Procesy Fermentacji i Biosyntezy*. Wrocław, Poland: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu.
- Li, C., Yang, X., Gao, S., Wang, H., & Lin, C. (2017). High efficiency succinic acid production from glycerol via in situ fibrous bed bioreactor with an engineered *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology (Bioresour. Technol.)*, 9–16.
- Li, Q., Jiang, X., Feng, X., Wang, J., Sun, C., Zhang, H., . . . Liu, H. (2016). Recovery Processes of Organic Acids from Fermentation Broths in the Biomass-Based Industry. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1–8. doi:https://doi.org/10.4014/jmb.1505.05049
- Liu, L., Wei, Q., Zhou, Y., & Ren, X. (2020). Using Dialkyl Amide: Via Forming Hydrophobic Deep Eutectic Solvents to Separate Citric Acid from Fermentation Broth. *Green Chemistry (Green Chem.)*, 22, 2526–2533. doi:10.1039/c9gc04401a
- López-Garzón, C., & Straathof, A. (2014). Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. *Biotechnol. Adv.*, 873–904. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.04.002
- Magalhães, A., De Carvalho, J., Medina, J., & Soccol, C. (2016). Downstream process

development in biotechnological itaconic acid manufacturing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 1–12.

doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7972-z>

Majumder, L., Khalil, I., Munshi, M., Alam, K., Rashid, H., Begum, R., & Alam, N. (2010). Citric acid production by *Aspergillus niger* using molasses and pumpkin as substrates. *European Journal of Biological Sciences*, Volume 2, Pages 01–08.

Markets, R. a. (2023, November 30). *Citric Acid Global Market Report 2023*. Retrieved from Research and Markets:

<https://www.researchandmarkets.com/reports/5741687/citric-acid-global-market-report>

Mattedi, A., Sabbi, E., Farda, B., Djebaili, R., Mitra, D., Ercole, C., . . . Pellegrini, M. (2023). Solid-State Fermentation: Applications and Future Perspectives for Biostimulant and Biopesticides Production. *Microorganisms*, 1408. doi:10.3390/microorganisms11061408

Max, B., Salgado, J., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A., & Domínguez, J. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology (Braz. J. Microbiol.)*, Volume 41, Pages 862–875.

Mores, S., de Vandenberghe, L., Magalhães Júnior, A., de Carvalho, J., de Mello, A., Pandey, A., & Soccol, C. (2021). Citric acid bioproduction and downstream processing: Status, opportunities, and challenges. *Bioresource Technology*. doi:10.1016/j.biortech.2020.124426

Oliveira, M., Malagoni, R., & Franco, M. (2013). Solubility of citric acid in water, ethanol, n-propanol and in mixtures of ethanol+water. *Fluid Phase Equilibria*, 110-113.

Pais, C., Franco-Duarte, R., Sampaio, P., Wildner, J., Carolas, A., Figueira, D., & Ferreira, B. (2016). Production of Dicarboxylic Acid Platform Chemicals Using Yeasts: Focus on Succinic Acid. In E. Inc., *Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products: The Food, Feed, Fibre, Fuel (4F) Economy* (pp. 237-269). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-803622-8.00009-4

Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology*

Advances (Biotechnol. Adv.), 244-263.

Papagianni, M., Matthey, M., & Kristiansen, B. (1999). The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzyme and Microbial Technology (Enzyme Microb. Technol.)*, Volume 25, Pages 710–717.

Pietkiewicz, J. (2015, September 29). Biosynteza Kwasu Cytrynowego Przez *Aspergillus niger* w Warunkach Jedno-i Wielostopniowych Hodowli Ciągłych. *Prace Naukowe Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu. Seria Monograficzna*, p. Not specified in the data. Retrieved from <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.ekon-element-000000010784>

Poerwono, H., Higashiyama, K., Kubo, H., Poernomo, A., Suharjono, Sudiana, I., & Indrayanto, G. (2001). Citric Acid. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients (Anal. Profiles Drug Subst. Excip.)*, 1-76.

Rani, K., Kumar, T., Murthy, J., Sankarshana, T., & Vishwanadham, B. (2010). Equilibria, Kinetics, and Modeling of Extraction of Citric Acid from Aqueous Solutions with Alamine 336 in 1-Octanol. *Separation Science and Technology*, 45(5), 654-662. doi:<https://doi.org/10.1080/01496390903566804>

Rongjie, L., Shenglong, P., & Haitao, S. (2017). *Patent No. CN107281778A*.

Roukas, T. (1991). Production of citric acid from beet molasses by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Journal of Food Science (J Food Sci)*, Volume 56, Pages 878–880. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb05409.x>

Saeed, M., Iqbal, H., Ahmad, A., Rizwan, M., Bashir, S., & Asim, M. (2020). Recovery of citric acid from fermentation broth by solvent extraction: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(6), 104562.

Sakurai, A., Imai, H., Ejiri, T., Endoh, K., & Usami, S. (1991). Citric acid production by surface culture using *Aspergillus niger*: kinetics and simulation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Volume 72, Pages 15–19.

Sándor, E., Karaffa, L., & Fekete, E. (2001). The biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger* (A review). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (Acta Microbiol. Immunol. Hung.)*, 429–440.

- Sangsurasak, P., & Mitchell, D. (1995). The investigation of transient multidimensional heat transfer in solid state fermentation. *Chem Eng J/Biochem Eng J*, 199-204. doi:[https://doi.org/10.1016/0923-0467\(95\)03016-6](https://doi.org/10.1016/0923-0467(95)03016-6)
- Shishikura, A., Kimbara, H., Yamaguchi, K., & Arai, K. (1992). *Patent No. EP0477928*.
- Show, P., Oladele, K., Siew, Q., Aziz Zakry, F., Lan, J.-W., & Ling, T. (2015). Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Frontiers in Life Science*, 271–283. doi:10.1080/21553769.2015.1033653
- Shu, P., & Johnson, M. (1948). Citric acid. *Industrial & Engineering Chemistry*, 1202–1205.
- Soccol, C., Vandenberghe, L., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology & Biotechnology*, 141–149.
- Straathof, A. (2011). The Proportion of Downstream Costs in Fermentative Production Processes. In A. Straathof, *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (pp. 811-814). Amsterdam: Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00492-X
- Sun, X., Lu, H., & Wang, J. (2017). Recovery of citric acid from fermented liquid by bipolar membrane electrodialysis. *J. Clean. Prod.*, 250-256. doi:10.1016/j.jclepro.2016.12.118
- Thakre, N., Prajapati, A., Mahapatra, S., Kumar, A., Khapre, A., & Pal, D. (2016). Modeling and optimization of reactive extraction of citric acid. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 61(7), 2614-2623. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jced.6b00274>
- Thapa Magar, S. (2021, September 14). *Fed-batch Culture- Definition, Principle, Process, Types, Applications, Limitations*. Retrieved from Microbe Notes: <https://microbenotes.com/fed-batch-culture/>
- The National Center for Biotechnology Information (NCBI). (22 June 2023). *Citric Acid*. เข้าถึงได้จาก The National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=311>
- Torres, N., & Voit, E. (2002). A Model of Citric Acid Production in the Mold *Aspergillus niger*. In N. Torres, & E. Voit, *Pathway Analysis and Optimization in Metabolic Engineering* (pp. 75-133). Cambridge: Cambridge University Press.

- Van Den Bergh, M., Van De Voorde, B., & De Vos, D. (2017). Adsorption and Selective Recovery of Citric Acid with Poly(4-vinylpyridine). *ChemSusChem*(10(24)), 4864–4871. doi:<https://doi.org/10.1002/cssc.201701672>
- Vandenbergh, L., Pandey, A., Carvalho, J., Letti, L., Woiciechowski, A., Karp, S., . . . Herrmann, L. (2021). Solid-state fermentation technology and innovation for the production of agricultural and animal feed bioproducts. *Syst. Microbiol. Biomanuf.*, 142–165. doi:10.1007/s43393-020-00015-7
- Vergano, M., Soria, M., & Kerber, N. (1996). Short communication: influence of inoculum preparation on citric acid production by *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 655–656.
- Verhoff, F. (2011). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Verser, D., Mariansky, G., Carlin, K., Gallegos-Westling, E., Coutu, J., & Eggeman, T. (2014). *Patent No. US20140148615*.
- Wang, J., Cui, Z., Li, Y., Cao, L., & Lu, Z. (2019). Techno-economic analysis and environmental impact assessment of citric acid production through different recovery methods. *Journal of Cleaner Production*, 249, 119315. doi:10.1016/j.jclepro.2019.119315
- Wang, J., Cui, Z., Li, Y., Cao, L., & Lu, Z. (2019). Techno-economic analysis and environmental impact assessment of citric acid production through different recovery methods. *Journal of Cleaner Production*, 249, 119315. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119315>
- Wang, L., Wang, Z., Liu, X., & Chi, Z. (2013). Citric acid production from extract of Jerusalem artichoke tubers by the genetically engineered yeast *Yarrowia lipolytica* strain 30 and purification of citric acid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1759–1766. doi:10.1007/s00449-013-0951-1
- Wei Hu, Wen-Jian Li, Hai-Quan Yang, และ Ji-Hong Chen. (2019). Hong Current strategies and future prospects for enhancing microbial production of citric acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 201-209.
- Wennersten, R. (1983). The extraction of citric acid from fermentation broth using a solution of a tertiary amine. *Journal of Chemical Technology and*

- Biotechnology*, 33(2), 85-94. doi:<https://doi.org/10.1002/jctb.280330202>
- West, T. (2023). Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Using Solid-State Fermentation of Agricultural Processing Coproducts. *Applied Biosciences (Appl. Biosci.)*, 1-13.
- Widiasa, I., Sutrisna, P., & Wenten, I. (2004). Performance of a novel electrodeionization technique during citric acid recovery. *Sep. Purif. Technol.*, 89-97. doi:10.1016/j.seppur.2003.12.020
- Wu, J., Peng, Q., Arlt, W., & Minceva, M. (2009). Model-based design of a pilot-scale simulated moving bed for purification of citric acid from fermentation broth. *J. Chromatogr. A*, 8793-8805. doi:10.1016/j.chroma.2009.03.028
- Wu, J., Peng, Q., Arlt, W., & Minceva, M. (2009). Model-based design of a pilot-scale simulated moving bed for purification of citric acid from fermentation broth. *Journal of Chromatography A*(1216(50)), 8793–8805. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.028>
- Wyrzykowski, D., Hebanowska, E., Nowak-Wicz, G., Makowski, M., & Chmurzyński, L. (2010). Thermal behaviour of citric acid and isomeric aconitic acids. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry (J. Therm. Anal. Calorim.)*, 731-735.
- Xavier. (2024, November 30). กลยุทธ์การผลิตแบบ Fed-Batch เพื่อเพิ่มผลผลิตผลิตภัณฑ์. Retrieved from Editverse : <https://editverse.com/th/fed-batch-strategies-for-improved-product-yields/>
- Yamada, O., Machida, M., Hosoyama, A., Goto, M., Takahashi, T., Takahashi, T., . . . Gomi, K. (2016). Genome sequence of *Aspergillus luchuensis* NBRC 4314. *DNA Research*, 507-515.
- Yang, H., & Wang, J. (2011). Solubilities of 3-Carboxy-3-hydroxypentanedioic Acid in Ethanol, Butan-1-ol, Water, Acetone, and Methylbenzene. *Journal of Chemical & Engineering Data (J. Chem. Eng. Data)*, 1449–1451.
- Yang, H., & Wang, J. (2011). Solubilities of 3-Carboxy-3-hydroxypentanedioic Acid in Ethanol, Butan-1-ol, Water, Acetone, and Methylbenzene. *Journal of Chemical & Engineering Data (J. Chem. Eng. Data)*, 1449-1451.
- Yang, L., Lübeck, M., & Lübeck, P. (2017). *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. *Fungal Biology Reviews (Fungal Biol. Rev.)*, 33-49.

Yang, X., Kim, D., Choi, H., Kim, C., Thapa, L., Park, C., & Kim, S. (2017). Repeated batch production of 1,3-propanediol from biodiesel derived waste glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Chemical Engineering Journal (Chem. Eng. J.)*, 660-669.



บรรณานุกรม

พิมพ์รายการอ้างอิงลงในนี้ หรือทำการย้ายรายการอ้างอิงที่สร้างจาก Endnote หรือ Zotero ทำ
เล่มมายังบริเวณนี้



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการทำวิจัย

1. พารามิเตอร์จลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด

ตารางที่ 20 พารามิเตอร์จลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของชีวมวลและการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ

r_x (g cell/L·h)	r_s (g glucose/L·h)	r_p (g product/L·h)	q_x (g cell/g glucose)	q_s (g glucose/g cell)	q_p (g product/g cell)
NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
0.32	-0.59	0.32	-0.54	-1.84	1.00
0.06	-0.10	0.11	-0.59	-1.70	1.73
-0.01	-0.05	0.05	0.11	9.04	-0.02
0.07	-0.10	0.03	-0.69	-1.44	0.80
0.03	-0.01	0.03	-3.86	-0.26	0.00
0.01	-0.06	-0.01	-0.13	-7.72	7.45
-0.05	-0.04	-0.01	1.28	0.78	0.00
0.01	-0.15	-0.02	-0.05	-21.78	0.00

ตารางที่ 21 พารามิเตอร์จลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของชีวมวลและการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา *A. luchuensis* SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบ็ดเสร็จ

r_x	r_s	r_p	q_x	q_s	q_p
(g cell/L·h)	(g glucose/L·h)	(g product/L·h)	(g cell/g glucose)	(g glucose/g cell)	(g product/g cell)
NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
0.18	-0.46	0.23	-3.18	-0.31	1.69
0.04	-0.04	0.18	-0.67	-1.49	1.06
0.07	-0.10	0.04	-1.89	-0.53	0.08
0.04	-0.11	0.07	5.22	0.19	-0.12
0.02	-0.09	0.08	4.62	0.22	-0.07
0.02	-0.12	-0.01	-2.64	-0.38	0.17
0.09	-0.04	-0.03	-3.78	-0.26	0.00
0.04	-0.04	-0.02	-2.46	-0.41	0.00

ตารางที่ 22 พารามิเตอร์จลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของชีวมวลและการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3063 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน

r_x	r_s	r_p	q_x	q_s	q_p
(g cell/L·h)	(g glucose/L·h)	(g product/L·h)	(g cell/g glucose)	(g glucose/g cell)	(g product/g cell)
NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
-0.04	-0.38	0.20	0.10	10.50	-5.40
0.21	-0.18	0.39	-1.17	-0.86	1.88
-0.15	-0.08	-0.01	1.79	0.56	0.05
-0.14	-0.08	-0.03	1.62	0.62	0.23
-0.03	-0.02	-0.01	1.24	0.81	0.18

0.00	0.64	-0.02	0.00	345.63	-8.50
-0.05	-0.21	0.01	0.22	4.53	-0.31
0.01	-0.06	-0.01	-0.08	-11.90	-1.06

ตารางที่ 23 พารามิเตอร์จลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของชีวมวลและการผลิตกรดซิตริกของเชื้อรา *A. luchuensis* SK01 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบป้อน

r_x (g cell/L·h)	r_s (g glucose/L·h)	r_p (g product/L·h)	q_x (g cell/g glucose)	q_s (g glucose/g cell)	q_p (g product/g cell)
NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
0.01	-0.56	0.33	-0.03	-37.93	22.05
0.15	-0.05	0.41	-2.85	-0.35	2.68
-0.05	-0.07	-0.03	0.71	1.40	0.54
-0.04	-0.02	-0.05	2.50	0.40	1.08
-0.07	-0.02	-0.08	2.90	0.34	1.21
-0.03	0.62	0.01	-0.05	-21.14	-0.33
-0.02	-0.01	0.00	3.03	0.33	-0.26
-0.03	-0.21	0.00	0.14	7.20	-0.05

ภาคผนวก ข

1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกด้วยเทคนิค HPLC

1.1 Standard curve and analytical of Citric acid

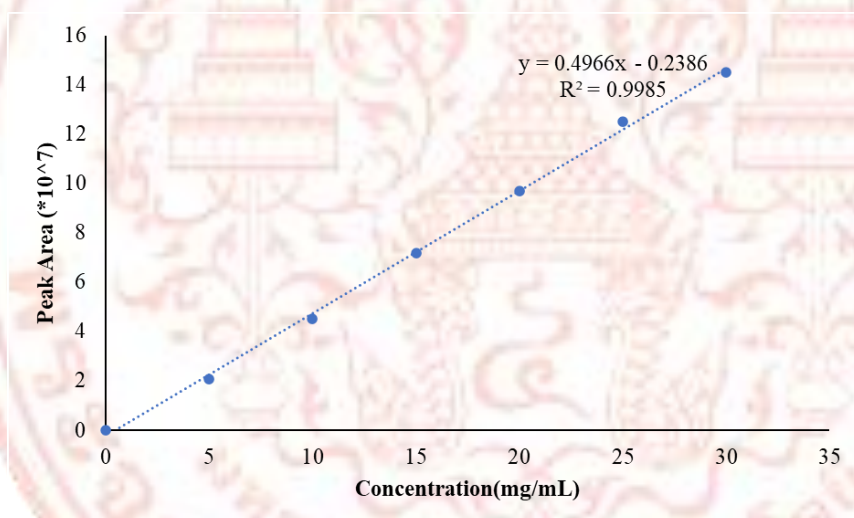
Sample Name : Citric acid

Data Filename : StdOrganic009.lcd

Method Filename : Organic acid.lcm

Batch Filename : Organic acid.lcb

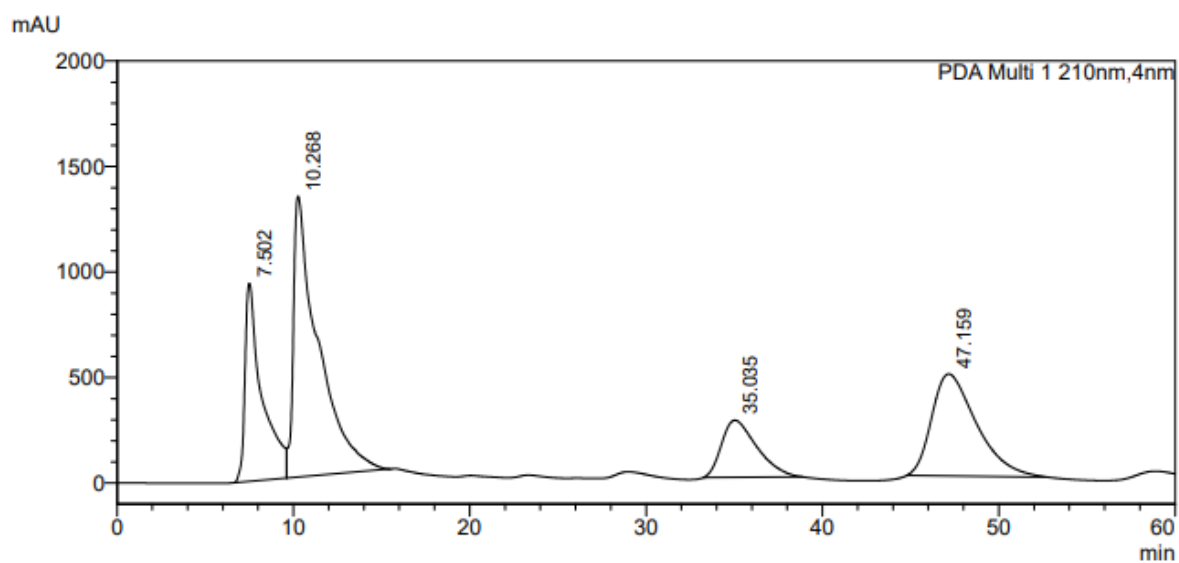
Type : Standard

Injection Volume : 50 μ LFunction : $y = 0.4966x - 0.2386$, $R^2 = 0.9985$

FitType : Linear

Detector Name : PDA

ภาพที่ 36 กราฟมาตรฐานกรดซิตริก



<Chromatogram>

<Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Mark	Name
1	7.502	62832165	938648		
2	10.268	130322741	1331099	V	
3	35.035	37546762	269910		
4	47.159	85540765	483257		
Total		316242463	3022915		

ภาพที่ 37 โครมาโทแกรมโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ของน้ำหมักจากไบโอดีเซล
เตอรืโดย *A. niger* TISTR 3063

ภาคผนวก ค

1. การวิเคราะห์สารประกอบในตะกอนกรดซิตริกด้วยเทคนิค XRF

ตารางที่ 24 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์กรดซิตริกเกรดวิเคราะห์กับการดัดจริตที่ตกตะกอนได้น้ำหนัก

Certificate of Analysis			
Product	49897-Citric Acid Monohydrate extrapure, 99.5%		
Batch No	[5949-29-1]		
Analysis Date	6596774		
Date of Manufure	4-Jul-22		
Expiry Data/Re-Test Date	July 2022		
Molecular Formula	July 2027		
Molecular Weight	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$		
	210.14		
Test Parameters		Standards	Actual Results
Appearance (Colour)		White	White
Appearance (Form)		Crystalline compound	Crystalline compound
Solubility (Turbidity) 10% aq. Solution		Clear	Clear
Solubility (Colour) 10% aq. Solution		colourless	colourless
			Our result
			White
			Crystalline compound
			Clear
			colourless

Assay (T)	min. 99.5%	99.80%	-
Sulphated Ash	max. 0.02%	0.004%	-
Sulphated (SO4)	max. 0.01%	Passes	-
Iron (Fe)	max. 0.0005%	Passes	0.15
Heavy Metals (Pb)	max.0.0005%	Passes	0.15

ตารางที่ 25 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์กรดซิตริกเกรดอาหารกับกรดซิตริกที่ตกตะกอนได้น้ำหมัก

Certificate of Analysis For Citric acid Anhydrous

Production Date: Feb 05,2023

Expiry Date: Feb 04,2026

Date of Analysis: Feb 07,2023

Quantity: 10 MT

Lot No: AA-23020213-FG

CAS#77-92-9

Invoice#: 20230310-1

NO.	TEST ITEM	SPECIFICATION	TEST RESULTS	Our result
1	DESCRIPTION	COLOURLESS CRYSTALS OR WHITE CRYSTALLINE POWDER	COLOURLESS CRYSTALS OR WHITE CRYSTALLINE POWDER	COLOURLESS CRYSTALS OR WHITE CRYSTALLINE POWDER
2	IDENTIFICATION	PASS TEST	PASS TEST	-



3	CLARITY & COLOR OF SOLUTION	PASS TEST	PASS TEST	-
4	BARIUM	PASS TEST	PASS TEST	0
5	ASSAY	99.5-100.5%	99.81	-
6	MOISTURE	≤0.3%	0.10	-
7	CALCIUM	≤100 mg/kg	<0.10	>100 mg/kg
8	IRON	≤5 mg/kg	<1	0.15
9	ARSENIC	≤1 mg/kg	<1	0
10	OXALATE	≤100 mg/kg	<25	-
11	HEAVY METALS (es Pb)	≤5 mg/kg	<3	0.15
12	READILY CARBONISABLE SUBSTANCES	PASS TEST	PASS TEST	-
13	SULPHATE	≤150 mg/kg	<10	>150 mg/kg
14	SULPHATED ASH/RESIDUE ON IGNITION	≤0.05%	0.02	-
15	CHLORIDE	≤50 mg/kg	<1	-
16	BACTERIAL ENDOTOXINS	≤0.5 IU/mg	<0.5	-
17	NICKEL	≤1 mg/kg	Less than 0.10	Less than 0.10
18	COBALT	≤1 mg/kg	Not detected	Not detected
19	MERCURY	≤0.5 mg/kg	Not detected	0.005
20	LEAD	≤0.5 mg/kg	Less than 0.03	0.15
21	CHROMIUM	≤1 mg/kg	Not detected	0.05

22	ALUMINIUM	≤0.2 mg/kg	Not detected	470.2
23	MESH SIZE	30-80	30-80	-



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวกาญจนา เดชชมภู
ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดซิตริกแบบป้อนจากการคัดแยกเชื้อ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ประวัติ	เกิดวันที่ 26 มิถุนายน พ.ศ. 2543 ร้อยเอ็ด ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2566 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
ข้อมูลการติดต่อ	โทรศัพท์: 083-3072137 E-mail: kanjanadetchomphoo@gmail.com
งานประชุมวิชาการนานาชาติ	Detchomphoo, K., Rungruang, R., & Kongruang, S. (2024). "Exploring Fatty Acid Production and the Potential of Carotenoid-derived <i>Rhodotorula graminis</i> Cell Factory: An investigation into Tyrosinase and Elastase Inhibition for Cosmetic Application, " The 46th Symposium on Biomaterials, Fuels, and Chemicals (SBFC 2024), The Westin Alexandria, Old Town, Virginia, USA. (Poster Presentation) Detchomphoo, K., Wisuthiphaet, N., Rungruang, R., & Kongruang, S. (2025). "Mathematical Modeling of Citric Acid Production and Microbial Growth Kinetics Using <i>Aspergillus niger</i> in Batch Fermentation, " The 6th Research, Invention, and Innovation Congress (RI²C

2025), The Asawin Grand Convention Hotel, Bangkok, Thailand. (Oral Presentation)

ผลงานตีพิมพ์

Detchomphoo, K., Wisuthiphaet, N., Rungruang, R., & Kongruang, S. (2026). "Citric Acid Production by *Aspergillus niger* in Stirred Tank Bioreactor, " *Applied Science and Engineering Progress*, Vol. 19, No. 1, 7864.

Buaroy, C., **Detchomphoo, K.**, Pasriwong, N., Thane, L., & Kongruang, S. (2025). Effect of agitation rate for enhanced growth, metabolite production and kinetic modelling of *Bifidobacterium bifidum* fermentation. *International Journal of Agricultural and Statistical Sciences*, 22(4), 2025162. [https://doi.org/10.6703/IJASE.202512_22\(4\).001](https://doi.org/10.6703/IJASE.202512_22(4).001)

