

การแยกและการตกผลึกกรดมะนาวจากน้ำหมัก



นายรัชชัย มงคลวิย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2536

ISBN 974-583-339-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018978 i 117371004

Separation and Crystallization of Citric Acid
from Fermentation Broth



Mister Thawatchai Mongkolwai

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-339-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแยกและการตกผลึกกรดมะนาวจากน้ำหมัก
โดย นายรัชชัย มงคลวัย
หลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรณ
 รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
 รองศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

Shanon Kojasthaya
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชรภักย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

Worrasamee Jom
..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

Wini Jom
..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรณ)

Nalin Nilubol
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

Songseri Kulpreecha
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สงศรี กุลปรีชา)

Piwee Pinphanichakorn
..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ธวัชชัย มงคลวัย : การแยกและการตกผลึกกรดมะนาวจากน้ำหมัก
(SEPARATION AND CRYSTALLIZATION OF CITRIC ACID FROM FERMENTATION
BROTH) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.วิจิตร ขำวิวรรณ์, รศ.ดร.นลินี นิลอุบล และ
รศ.ดร.สงศรี กุลปรีชา, 63 หน้า. ISBN 974-583-339-8

การแยกกรดมะนาวจากน้ำหมักโดยวิธีตกตะกอนด้วยแคลเซียมออกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าเมื่อใช้สารละลายแขวนลอยแคลเซียมออกไซด์เข้มข้น 25 % เติมน้ำหมักที่อุณหภูมิ 90°-100°ซ. จนกระทั่งค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มให้เกิดตะกอน 30 นาที สามารถตกตะกอนกรดมะนาวในรูปแคลเซียมซิเตรท เก็บเกี่ยวกรดมะนาวได้ 99.10 % หลังจากละลายตะกอนแคลเซียมซิเตรทด้วย 70 % กรดซัลฟูริกที่อุณหภูมิ 60°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวกรดมะนาวได้ 97.30 % เทียบกับน้ำหมัก เมื่อนำสารละลายตะกอนกรดมะนาวไปฟอกสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ในอัตราส่วน 5.4 % (w/w) ที่อุณหภูมิ 70°ซ. เป็นเวลา 30 นาที ได้ผลผลิตกรดมะนาวที่ฟอกสี 96.11 % เทียบกับขั้นตอนการละลายตะกอน แคลเซียมซัลเฟตที่เหลือในสารละลายกรดมะนาวจะถูกแยกด้วยเรซินจำประจุบวก (Dowex-50) และเรซินจำประจุลบ (Dowex-1) ได้กรดมะนาวที่ผ่านเรซิน 95.18 % เทียบกับขั้นตอนฟอกสี เมื่อระเหยน้ำออกให้ได้สารละลายกรดมะนาวเข้มข้น 68°บริกซ์ ตกผลึกที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลึกกรดมะนาวโมโนไฮเดรท 46 % เทียบกับขั้นตอนจำประจุ ผลึกที่ได้มีความบริสุทธิ์ 99.08 %



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา
สาขาวิชา
ปีการศึกษา

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

##C226449 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: : CITRIC ACID / SEPARATION / CRYSTALLIZATION

THAWATCHAI MONGKOLWAI : SEPARATION AND CRYSTALLIZATION
OF CITRIC ACID FROM FERMENTATION BROTH. THESIS ADVISOR :
ASSIS. PROF. VINICH KHAMVIWATH, ASSO. PROF. NALIN NILUBOL,
Ph.D., ASSO. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph.D. 63 pp.
ISBN 974-583-339-8

Citric acid was recovered from fermentation broth by precipitating with lime calcium oxide, calcium hydroxide or calcium carbonate. Twenty five percent of colloidal suspension of calcium oxide was the most appropriate to recover the calcium citrate. The optimal conditions for neutralization of the acid was at 90°-100°C, pH 7 for 30 minutes. In this step, the recovery of citric acid was about 99.20 %. Calcium citrate was converted to citric acid and calcium sulfate by acidified with 70 % sulfuric acid at 60°C for 2 hours. Recovery of citric acid was about 97.30 % with respected to fermentation broth. It was then decolorized with 5.40 % (w/w) activated carbon powder at 70°C for 30 minutes. The recovery of citric acid was about 96.11 % with respected to acidified step. The residual of calcium sulfate in citric acid solution was removed by passing through cation exchange resin (Dowex-50) and anion exchange resin (Dowex-1). The recovery of citric acid was about 95.18 % with respected to carbon adsorption step. Citric acid solution was then evaporated to 68°Brix and further crystallized at 25°C for 24 hours. The yield of citric acid monohydrate was about 46 % with purity of 99.08 %.



ภาควิชา.....

ลายมือชื่อนิสิต..... *ทิวดี อดิสา*

สาขาวิชา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *วิจิตร*

ปีการศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *วิจิตร*

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง "การแยกและการตกตะกอนกรดมะนาวจากน้ำหมัก" สำเร็จลุล่วงก็ด้วยความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรณ รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา ที่กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ และแนวความคิดอันมีค่ายิ่งตลอดระยะเวลาการดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนและอนุญาตให้ใช้สถานที่ ตลอดจนอุปกรณ์และสารเคมี จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับการสนับสนุนเงินทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญให้การวิจัยนี้สามารถดำเนินการและบรรลุความสำเร็จได้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ท่านคณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อมเรศ ภูมิรัตน์ รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา มีวุฒิสม ดร.อภิญา อัครนิก และโครงการการพัฒนาการอุตสาหกรรมขนาดย่อมโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และกำลังทรัพย์

ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาและขอบคุณ ทิดแอ๊ด พี่ต้อย พี่อุ๊ด พี่หม่อม พี่จันทร์เพ็ญ พี่จันนี่ จันท์ธิดา ใหม่ เสือ ประเสริฐ ต่อ ป้าทีป คุณแข่ง คุณชานาญ ชุติมา วารุณี และผู้อยู่เบื้องหลังทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ กำลังใจและกำลังทรัพย์ ในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ต้นจนจบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
คำย่อ.....	ถ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ.....	14
1 สารเคมี	15
2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	16
3 วิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	16
4 การเตรียมน้ำหมัก	16
5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว	17
6 การแยกเส้นใยรา.....	18
7 การตกตะกอนกรดมะนาวจากน้ำหมัก.....	18
7.1 หาชนิดของด่างที่เหมาะสมสำหรับตกตะกอนกรดมะนาว จากน้ำหมัก.....	18
7.2 หาอุณหภูมิกับช่วงเวลาที่เหมาะสมในการตกตะกอนแยก กรดมะนาวจากน้ำหมัก.....	18
7.3 หาความเข้มข้นกรดมะนาวในน้ำหมักกับช่วงเวลาในการ ตกตะกอนกรดมะนาว.....	19
8 หาอุณหภูมิกับช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับละลายตะกอนแคลเซียมซิเตรท..	20
9 หาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกสีสารละลายกรดมะนาวด้วยผงถ่านกัมมันต์	20
10 การจับสารปนเปื้อนที่มีประจุในสารละลายตะกอนกรดมะนาว ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนประจุ.....	20
11 การตกผลึกกรดมะนาว.....	21
12 การวิเคราะห์สมบัติกรดมะนาว.....	21

	หน้า
3 ผลการทดลอง	
3.1 ชนิดของด่างที่เหมาะสมในการตกตะกอนกรดมะนาวจากน้ำหมัก	23
3.2 อุณหภูมิกับช่วงเวลาที่เหมาะสมในการตกตะกอน กรดมะนาวจากน้ำหมัก	25
3.3 ความเข้มข้นกรดมะนาวในน้ำหมักกับช่วงเวลาที่เหมาะสม ในการตกตะกอน.....	28
3.4 อุณหภูมิกับช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับละลายตะกอน แคลเซียมซิติเรทด้วยกรดซัลฟูริก.....	31
3.5 อัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์กับปริมาณของแข็งทั้งหมด ที่เหมาะสมสำหรับฟอกสีสารละลายตะกอนกรดมะนาว.....	34
3.6 การจับสารปนเปื้อนที่มีประจุในสารละลายกรดมะนาว ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนประจุ.....	38
3.7 การตกผลึกกรดมะนาวโมโนไฮเดรท.....	40
4 สรุปและวิจารณ์.....	43
รายการอ้างอิง.....	46
ภาคผนวก	
1 สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา <i>A. niger</i> A 185 เพื่อผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลว.....	50
2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	51
3 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรดมะนาว ด้วยวิธีเพนตาโบรโมอะซิโตน.....	51
4 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC.....	52
5 การละลายตะกอนไตรแคลเซียมซิติเรท เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว.....	53
6 การฟอกสีสารละลายตะกอนกรดมะนาว.....	53
7 การเตรียมแคทไอออนเรซินและแอนไอออนเรซินแลกเปลี่ยนประจุ.....	54
8 กราฟมาตรฐานหาปริมาณซัลเฟตโดยวิธีวัดความขุ่น.....	55
9 กราฟมาตรฐานหาปริมาณเหล็กโดยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์พชัน.....	56

10	กราฟมาตรฐานหาปริมาณแคลเซียมด้วยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์พชัน.....	57
11	กราฟมาตรฐานหาปริมาณโปตัสเซียมด้วยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์พชัน....	58
12	กราฟมาตรฐานหาปริมาณโซเดียมด้วยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์พชัน.....	59
13	วิธีคำนวณผลการวิเคราะห์.....	60
	ประวัติของผู้เขียน.....	63



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 สมบัติของกรดมะนาว	5
2 สมบัติของเรซิน Amberite Absorbance.....	7
3 ปริมาณกรดมะนาวที่ตกตะกอนได้ เมื่อตกตะกอนด้วยสารละลายแขวนลอยแคลเซียมออกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์และแคลเซียมคาร์บอเนต ในช่วงเวลา 10, 30, 60 และ 90 นาที.....	24
4 ปริมาณกรดมะนาวที่ตกตะกอนจากน้ำหมักด้วยสารละลายแขวนลอยแคลเซียมออกไซด์เมื่อผันแปรอุณหภูมิในการตกตะกอนที่ 70 °, 80 °, 90 ° และ 100 °ซ. ในช่วงเวลา 10, 30, 60 และ 90 นาที	26
5 ปริมาณกรดมะนาวที่ตกตะกอนได้จากน้ำหมักด้วยสารละลายแขวนลอยแคลเซียมออกไซด์ เมื่อผันแปรความเข้มข้นในน้ำหมักร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 ในช่วงเวลา 10, 30, 60 และ 90 นาที	29
6 ปริมาณกรดมะนาวที่ละลายจากตะกอนแคลเซียมซีเตรทด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 70 เมื่อผันแปรอุณหภูมิ 50°, 60°, 70° และ 80 °ซ. ในช่วงเวลาการละลาย 30, 60 นาที 1.5, 2, 2.5 และ 3 ชั่วโมง.....	32
7 เปอร์เซนต์ฟอสฟอรัสสารปนเปื้อนในสารละลายตะกอนกรดมะนาวเมื่อฟอกสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดเป็น 1.35, 2.70, 4.05, 5.40, 6.75 และ 8.10 % . ที่อุณหภูมิ 70 ° ซ. ในช่วงเวลา 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที.....	35
8 ปริมาณกรดมะนาวในสารละลายกรดมะนาวหลังจากฟอกสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดเป็น 1.35, 2.70, 4.05, 5.40, 6.75 และ 8.10 % . ที่อุณหภูมิ 70 ° ซ. ในช่วงเวลาฟอกสี 30 นาที.....	37
9 ปริมาณกรดมะนาวที่แยกได้หลังผ่านคอลัมน์จับประจุด้วยเรซินจับประจุบวกและจับประจุลบด้วยอัตราไหล 1, 2, 3, 4 และ 5 มล. / นาที.....	38
10 เปรียบเทียบปริมาณสารปนเปื้อนที่มีประจุในสารละลายกรดมะนาวก่อนผ่านและหลังผ่านเรซินจับประจุที่อัตราไหล 4 มล. / นาที.....	39

	หน้า
11 การตกผลึกกรดมะนาวโมโนไฮเดรตที่ตกผลึกที่อุณหภูมิ 25 ^o ซ.....	40
12 เปรียบเทียบจุดหลอมเหลวของกรดมะนาวมาตรฐานและกรดมะนาว โมโนไฮเดรตที่เตรียมได้.....	41
13 สมบัติทางเคมีของกรดมะนาวที่เตรียมได้เทียบกับมาตรฐานอุตสาหกรรม.....	42



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 โครงสร้างของกรดมะนาว.....	4
2 การตกตะกอนกรดมะนาวจากน้ำหมัก.....	19
3 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่ตกตะกอนได้ เมื่อตกตะกอนด้วย สารละลายแวนลอยแคลเซียมออกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์และแคลเซียม คาร์บอเนต ในช่วงเวลา 10, 30, 60 และ 90 นาที.....	25
4 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่ตกตะกอนแยกจากน้ำหมักด้วยสารละลาย แวนลอยแคลเซียมออกไซด์ เมื่อผันแปรอุณหภูมิในการตกตะกอนที่ 70 °, 80 °, 90 ° และ 100 °ซ. ในช่วงเวลา 10, 30, 60 และ 90 นาที	27
5 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่ตกตะกอนได้จากน้ำหมักด้วยสารละลาย แวนลอยแคลเซียมออกไซด์ เมื่อผันแปรความเข้มข้น ในน้ำหมักร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 ในช่วงเวลา 10, 30, 60 และ 90 นาที	30
6 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่ละลายจากตะกอนแคลเซียมซิติเรท ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น ร้อยละ 70 เมื่อผันแปรอุณหภูมิ 50 °, 60 °, 70 ° และ 80 °ซ.ในช่วงเวลาการละลาย 30, 60 นาที 1.5, 2, 2.5 และ 3 ชั่วโมง	33
7 เปอร์เซนต์ฟอกสีสารปนเปื้อนในสารละลายตะกอนกรดมะนาวเมื่อฟอกสี ด้วยผงถ่านกัมมันต์ ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดเป็น 1.35, 2.70, 4.05, 5.40, 6.75 และ 8.10 % ที่อุณหภูมิ 70 ° ซ. ในช่วงเวลา 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที	36
8 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี เพนตาโบรโมอะซิโตน.....	51
9 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC.....	52
10 แสดงความสัมพันธ์ของค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณของแข็งทั้งหมดในสาร ละลายตะกอนกรดมะนาว.....	53
11 แสดงการจับประจุสารปนเปื้อนด้วยเรซินจับประจุบวกและจับประจุลบ.....	54
12 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเซลล์เฟด.....	55
13 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก.....	56
14 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม.....	57

15	แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปตัสเซียม.....	58
16	แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโซเดียม.....	59
17	ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดมะนาวเมื่อใช้กรดอะซิติกเป็นสารมาตรฐาน เปรียบเทียบภายใน.....	62



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

°ซ.	=	องศาเซลเซียส
มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
ชม.	=	ชั่วโมง
ซม.	=	เซนติเมตร
%	=	เปอร์เซ็นต์
g/ cc	=	กรัม / ลูกบาศก์เซนติเมตร
m ² / g	=	ตารางเมตร / กรัม
v/v	=	ปริมาตร / ปริมาตร
w/v	=	น้ำหนัก / ปริมาตร
HPLC	=	ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโตกราฟี
ID.	=	เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน (internal diameter)
° brix	=	องศาบริกซ์
\bar{X}	=	ค่าเฉลี่ย
SD.	=	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)
OD	=	optical density
nm	=	นาโนเมตร
sec	=	วินาที
L / min	=	ลิตร / นาที
DE	=	dextrose equivalent