

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากสับปะรดเหลือทิ้ง
โดย *Candida metapsilosis* CPRU001 ด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง

ศักดิ์ชาย เพ็ชรตรา^{1*}

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากสับปะรดเหลือทิ้งภาคเกษตรกรรมโดย *Candida metapsilosis* CPRU001 โดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) ในรูปแบบส่วนประกอบกลาง (Central Composite Design, CCD) ซึ่งทำการคัดเลือก 3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก ซึ่งประกอบด้วย 1.ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น (Initial pH) ของสับเสตรท 2. ปริมาณยีสต์สกัด (yeast extract) และ 3. ปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

ผลการวิจัยพบว่า สมการพหุนามกำลังสอง (quadratic equation) สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก (response; Y) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังนี้ ที่ระดับความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของสับเสตรท ที่ 5.34 ปริมาณยีสต์สกัด 0.32 กรัมต่อลิตร และปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.69 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 144 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที สามารถผลิตกรดซิตริก เท่ากับ 11.62 ± 0.54 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ : กรดซิตริก สับปะรดเหลือทิ้ง *Candida metapsilosis* CPRU001 วิธีการพื้นผิวตอบสนอง การออกแบบส่วนประกอบกลาง

¹ อาจารย์ประจำ สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏชัยภูมิ จังหวัดชัยภูมิ

* ผู้นิพนธ์หลัก e-mail: sakpattr@gmail.com

STUDY ON OPTIMIZATION OF CITRIC ACID PRODUCTION FROM PINEAPPLE WASTE
BY *Candida metapsilosis* CPRU001 WITH RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Sakchai Pattra^{1*}

Abstract

The objective of this research to study the optimization of citric acid production from pineapple waste in the agricultural sector by *Candida metapsilosis* CPRU001 with response surface methodology on central composite design (CCD). There selected three factors that influence the production of citric acid, including 1. Initial pH of substrate, 2. yeast extract and 3. Potassium Dihydrogenphosphate (KH_2PO_4).

The result show that: the quadratic equation can explain the relationship between factor effecting on citric acid production (response; Y) at significant ($P > 0.05$) i.e. initial pH of 5.34 , 0.32 g/L of yeast extract and 0.69 g/L of KH_2PO_4 using 144 hours fermentation time at room temperature on a shaker speed is around 150 rpm. There can produce citric acid at 11.62 ± 0.54 g/L.

Keywords : Citric Acid, Pineapple Waste, *Candida metapsilosis* CPRU001,
Response Surface Methodology, Central Composite Design

¹Department of Public Health, Faculty of Art and Science, Chaiyaphum Rajabhat University

* Corresponding e-mail: sakpattra@gmail.com

บทนำ

กรดซิตริกเป็นกรดอ่อนใช้ประโยชน์เพื่อการถนอมอาหารโดยมีบทบาทสำคัญ ในการเพิ่มรสชาติให้กับอาหารให้มีความเปรี้ยว มีกลิ่นหอมชวนรับประทาน ได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค สามารถเติมลงไปในการอาหารโดยไม่เกิดอันตราย และเป็นสารช่วยทำความสะอาดผลิตภัณฑ์ในห้องน้ำที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม การผลิตกรดซิตริกจากมะนาวในปัจจุบันกำลังลดลงเนื่องจากต้นทุนสูง และภาคอุตสาหกรรมนิยมผลิตกรดซิตริกโดยใช้กระบวนการหมักน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์ประเภทเชื้อราซึ่งมีต้นทุนต่ำกว่าเป็นหลัก ซึ่งผลิตด้วยวิธีการสังเคราะห์กรดซิตริกจากน้ำตาลกลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis Pathway) ได้เป็นสารออกซาโลอะซิเตต (Oxaloacetate) แล้วสะสมเป็นกรดซิตริก โดยจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ เชื้อรา *Aspergillus niger* (Betiku E, Adesina OA., 2013) และยีสต์ *Candida lipolytica* (Grewal HS, Kalra KL., 1995) สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต โดยการหมักกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 ด้วยเชื้อรา *A. niger* พันธุ์ GCBT7 เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลในกากน้ำตาลเป็นกรดซิตริกในถังหมัก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือการควบคุมสภาวะความเป็นกรดต่างที่ pH ระดับ 6 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C เติมนอกซิเจนที่ระดับ 1 ลิตร/ลิตร/นาที่ และเติม แอมโมเนียมไนเตรท (Ammonium nitrate) ปริมาณ ร้อยละ 0.2 เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนให้เชื้อรา *A. niger* ใช้เวลาหมัก 144 ชั่วโมง จะได้กรดซิตริกที่มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ระดับระหว่าง 96.06-103.06 กรัม/1 ลิตรกากน้ำตาล โดยจะได้เซลแห้งและอัตราการใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลของเชื้อรา *A. niger* ที่ 18.5 กรัม/1 ลิตรกากน้ำตาล และ 96.55 กรัม/1 ลิตรกากน้ำตาล ตามลำดับ (Vandenbergh LPS, et al., 1999) ดังนั้นการผลิตกรดซิตริกจึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อเกิดประโยชน์ในภาคอุตสาหกรรมผลิตเครื่องดื่ม ขนม และสารช่วยทำความสะอาดผลิตภัณฑ์ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้พัฒนาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากสับปะรดเหลือทิ้งทางการเกษตร

การใช้เทคนิคทางสถิติและคณิตศาสตร์โดยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) โดยการออกแบบส่วนประสมกลาง (central composite design, CCD) มีประโยชน์ทางด้านการปรับปรุง พัฒนาและหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิต เทคนิคดังกล่าวถูกคิดค้นโดย Box และ Wilson เมื่อปี ค.ศ. 1951 (Myers, 1995) ซึ่งวิธีการทางสถิตินี้จะใช้หลักการของการวิเคราะห์สมการการถดถอย (Regression equation) เพื่อใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรต้น (Variables) ที่มีผลต่อตัวแปรตาม (Responses) รวมไปถึงปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างตัวแปรสองชนิดขึ้นไป และยังสามารถใช้สมการดังกล่าวทำนายการหาปริมาณตัวแปรต้นที่เหมาะสมต่อตัวแปรตามที่ผลิตได้สูงสุดอีกด้วย (Myers, 1995)

สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (*Ananas comosus* (L.) Merr. cv., Pattavia) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการปลูกสับปะรดกระจายอยู่ทั่วไปเนื่องจากสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศของประเทศไทยมีความเหมาะสมต่อพืชชนิดนี้ (ปิยวดี เจริญวัฒนะ, 2559) ในส่วนของจังหวัดชัยภูมิ มีแหล่งผลิตสับปะรดแหล่งใหม่ของจังหวัดอยู่ในเขตพื้นที่ตำบลท่าหินโงม ตำบลขี้เหล็กและตำบลห้วยต้อน อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ ซึ่งมีพื้นที่ปลูกสับปะรดจำนวน 8,974 ไร่ ผลสับปะรดส่วนใหญ่ที่มีขนาดมากกว่า 0.5 กิโลกรัมขึ้นไป จะรวบรวมและขายส่งให้โรงงานผลิตสับปะรดโดยผ่านพ่อค้าคนกลาง ส่วนสับปะรดที่มีน้ำหนักน้อยกว่า 0.5 กิโลกรัมเกษตรกรจะปล่อยให้สุกแล้วนำไปแปรรูปสับปะรด บางส่วนก็นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสัตว์ เช่น วัว ควาย เป็นต้น ซึ่งสับปะรดที่ไม่ได้มาตรฐานเหล่านี้จะมีประมาณร้อยละ 10 ของผลผลิตสับปะรดต่อไร่ (สำนักงานเกษตรอำเภอเมืองชัยภูมิ, 2557) ซึ่งงานวิจัยนี้จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตผลทางการเกษตรโดยนำสับปะรดที่ไม่ได้ขนาดเหล่านี้มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดซิตริก โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากสับปะรดเหลือทิ้งภาคเกษตรกรรมโดยยีสต์สายพันธุ์ประจำถิ่นด้วยวิธีการพื้นที่ผิวตอบสนอง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากสับประรดเหลือทิ้งโดย *Candida metapsilosis* CPRU001 ด้วยวิธีการพื้นผิวดอปสนอง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมยีสต์

การเตรียม *Candida metapsilosis* CPRU001 ที่คัดแยกได้จากสับประรดในพื้นที่วิจัย (ต.ท่าหินโงม อ.เมือง จ.ชัยภูมิ) โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงมาจาก Kamzolova et al.,(2011) ประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัม/ลิตร, KH_2PO_4 1.0 กรัม/ลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.4 กรัม/ลิตร, NaCl 0.5 กรัม/ลิตร, K_2HPO_4 0.1 กรัม/ลิตร, ยีสต์สกัด 0.1 กรัม/ลิตรและธาตุอาหาร $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 110 มิลลิกรัม/ลิตร, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 21.0 มิลลิกรัม/ลิตร, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร, H_3BO_3 40 มิลลิกรัม/ลิตร, KI 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้น ถ่ายเชื้อในอาหารวุ้นเอียงลง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปบ่มใน Incubator shaker ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะได้ปริมาณยีสต์เท่ากับ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร

การเตรียมสับประรดเหลือทิ้งเพื่อเป็นสับสเตรท

นำผลสับประรดที่เหลือทิ้งมาล้างน้ำทำความสะอาดจากนั้นนำมาสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำเข้าเครื่องปั่นจนละเอียด และนำเข้าเครื่องบีบน้ำ นำน้ำสับประรดที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง และเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -4°C

การวางแผนการทดลอง

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากสับประรดเหลือทิ้งภาคเกษตรกรรมโดยยีสต์สายพันธุ์ *Candida metapsilosis* CPRU001 ด้วยวิธีการพื้นผิวดอปสนอง

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากสับประรดเหลือทิ้งภาคเกษตรกรรมโดยยีสต์สายพันธุ์ประจำถิ่นด้วยวิธีการพื้นผิวดอปสนองโดยศึกษา 3 ปัจจัยดังนี้ 1. ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น (Initial pH, X_1) ที่เหมาะสมของสับสเตรทในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสับประรดที่เหลือทิ้ง 2. ปริมาณยีสต์สกัด (yeast extract, X_2) ที่เหมาะสมของสับสเตรท และ 3. ปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4 , X_3) ที่เหมาะสมของสับสเตรทโดยการหมักแบบกะ (Batch fermentation) ตามแผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (CCD) โดยนำน้ำสับประรดมาเติมแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรผสมให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรดต่าง (X_1) ด้วย 1 N แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) และ 1 N กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เติมปริมาณยีสต์สกัด (X_2) และเติมปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (X_3) ตามตารางที่ 1 และ 2 จากนั้นทำการทดลองโดยใช้ปริมาตรทั้งหมด (Working volume) เท่ากับ 1,800 มิลลิลิตร โดยนำน้ำสับประรดที่ปรับความเป็นกรดต่างเริ่มต้น ปริมาณยีสต์สกัด และ ปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แต่ละค่าแล้วอย่างละ 2 ขวดวัดปริมาตร (flasks) มาเติมกล้ำเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง (6วัน) มาทำการวิเคราะห์ ทำการทดลองแบบ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 1 ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริกโดยการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (CCD)

ตัวแปรอิสระ	ระดับของตัวแปร				
	$-\alpha(-1.68)$	-1	0	1	$+\alpha(1.68)$
X ₁ = ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น (Initial pH)	4.66	5.00	5.50	6.00	6.34
X ₂ = yeast extract (g/L)	0.13	0.20	0.30	0.40	0.47
X ₃ = KH ₂ PO ₄ (g/L)	0.36	0.50	0.70	0.90	1.04

จากผลการทดลอง เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลโดยใช้เทคนิคในการหาพื้นที่การตอบสนองทางสถิติ เพื่อหาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษากับผลการตอบสนอง (response) โดยใช้สมการทั่วไปแบบจำลองพหุนามกำลังสองในการทำนายค่า Y แสดงในสมการที่ 1

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 \quad (1)$$

เมื่อ Y คือ ผลการทดลองที่ติดตาม (response)

β_0 คือ ค่าคงที่ $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ quadratic term

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ interaction term

X_1, X_2, X_3 คือ ตัวแปรอิสระ

2. การตรวจสอบยืนยันผล (Confirmation experiments)

การตรวจสอบยืนยันผลที่ได้จากสมการทำนายค่าปัจจัยที่เหมาะสมทั้ง 3 ปัจจัยในการผลิตกรดซิตริก ในปริมาณที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อที่ 1

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ความเป็นกรดต่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวม Total sugar โดยวิธี Phenol sulfuric (Dubois et al., 1956) และการวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Sylwester et al. (2017) โดยเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 5 มิลลิลิตรทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีเพื่อแยกเซลล์ยีสต์ออกจากสารละลายปิเปตสารละลาย 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย HCl เข้มข้น 0.25 โมล/ลิตรในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร (v/v) ผสมให้เข้ากันนำมาวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงโดยเครื่อง UV-vis spectrophotometer (JASCO International Co., Ltd., Japan) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดซิตริก

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Design-Expert 7.0 Demo (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) ในการวางแผนการทดลองตามวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (RSM) และการออกแบบส่วนประสมกลาง (CCD) ซึ่งสามารถสร้างสมการพหุนามกำลังสอง (quadratic equation) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตกรดซิตริก

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากสับปะรดเหลือทิ้งภาคเกษตรกรรมโดยยีสต์สายพันธุ์ *Candida metapsilosis* CPRU001 ด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง

การวางแผนการทดลองตามวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (RSM) และการออกแบบส่วนประสมกลาง (CCD) ซึ่งสามารถสร้างสมการพหุนามกำลังสอง (quadratic equation) จากผลการทดลอง พบว่าสามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงที่สุด คือ 12.34±0.02 กรัมต่อลิตรที่เวลา 144 ชั่วโมง โดยมีระดับของตัวแปรดังนี้ ความเป็นกรดต่ำเริ่มต้นที่ 5.5 เติมปริมาณยีสต์สกัดที่ 0.3 กรัม/ลิตร และเติมปริมาณ KH₂PO₄ 0.7 กรัม/ลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

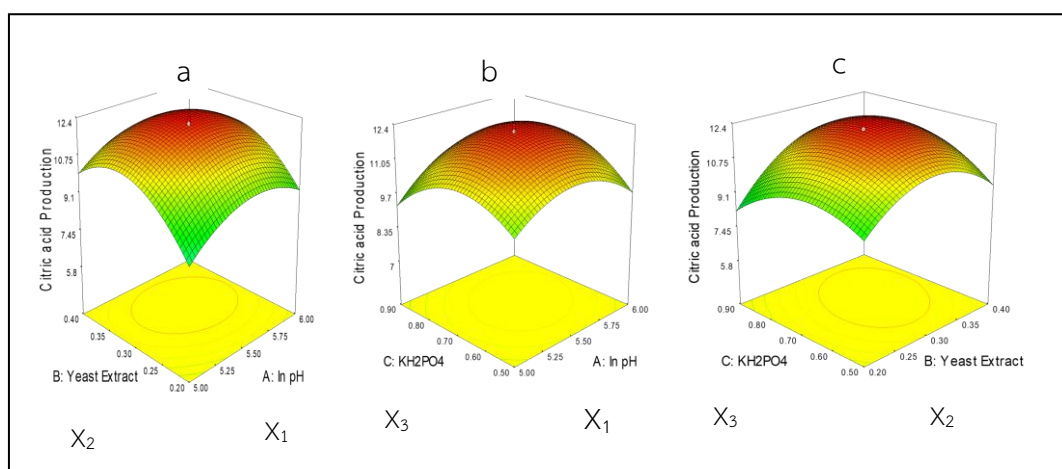
ตารางที่ 2 แผนการทดลองแบบ CCD ทั้งหมด 20 การทดลอง ประกอบด้วยรหัสและค่าความเข้มข้นของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองทั้ง 3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดซิตริก

การทดลองที่	รหัสตัวแปรอิสระ*			ระดับความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)			กรดซิตริก ($\bar{x} \pm SD$, กรัม/ลิตร)
	x ₁ *	x ₂ *	x ₃ *	X ₁	X ₂	X ₃	
1	0	0	+ α	5.50	0.30	1.04	7.08±0.01
2	+1	-1	+1	6.00	0.20	0.90	9.11±0.01
3	0	0	0	5.50	0.30	0.70	12.23±0.02
4	0	0	- α	5.50	0.30	0.36	9.45±0.03
5	0	- α	0	5.50	0.13	0.70	5.82±0.05
6	0	0	0	5.50	0.30	0.70	12.34±0.02
7	-1	+1	+1	5.00	0.40	0.90	10.22±0.04
8	+1	+1	+1	6.00	0.40	0.90	10.67±0.03
9	0	0	0	5.50	0.30	0.70	12.01±0.05
10	+ α	0	0	6.34	0.30	0.70	9.37±0.03
11	0	0	0	5.50	0.30	0.70	12.19±0.04
12	-1	-1	+1	5.00	0.20	0.90	7.34±0.06
13	0	0	-1	5.50	0.30	0.50	12.11±0.16
14	+1	+1	-1	6.00	0.40	0.50	8.11±0.01
15	-1	-1	-1	5.00	0.20	0.50	8.38±0.05
16	0	+ α	0	5.50	0.47	0.70	8.56±0.04
17	0	0	0	5.50	0.30	0.70	12.24±0.04
18	- α	0	0	4.66	0.30	0.70	7.66±0.07
19	-1	+1	-1	5.00	0.40	0.50	8.32±0.05
20	+1	-1	-1	6.00	0.20	0.50	7.85±0.05

หมายเหตุ: *รหัสตัวแปรอิสระ x_1^* , x_2^* , และ x_3^* คือ รหัสทั้ง 3 ตัวแปรอิสระ ส่วน คือ X_1 , X_2 และ X_3 ค่าระดับความเป็นกรดต่างเริ่มต้น (Initial x_1 , X_1) ของสับสเตรท ปริมาณ yeast extract (x_2 , X_2) และ KH_2PO_4 (x_3 , X_3) ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อให้ได้แบบจำลองโครงสร้างที่ใช้ในการทำนายความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นกับค่าผลการทดลองที่ติดตาม (response) ซึ่งใช้อธิบายปัจจัยที่เป็นอิทธิพลหลัก (main effect) และปัจจัยที่เป็นอิทธิพลร่วม (interaction effect) แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ศึกษากับค่าตอบสนองด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) ดังตารางที่ 3 ในรูปสมการพหุนามกำลังสอง (Quadratic model) พบว่ามีค่า R^2 เท่ากับ 0.88 จะเห็นได้ว่าค่า R^2 มีค่าสูง ซึ่งโดยทั่วไปค่า R^2 ยอมรับได้ในช่วง 0.75-1.0 (Niladevi et al., 2009) เป็นการยืนยันว่าสามารถใช้ในการทำนายการผลิตกรดซิตริก และอธิบายความสัมพันธ์ของการผลิตกรดซิตริกกับความเป็นกรดต่างเริ่มต้น (X_1) ปริมาณยีสต์สกัด (X_2) และ KH_2PO_4 (X_3) โดยพิจารณาของแต่ละปัจจัย คือ ระดับความเป็นกรดต่างเริ่มต้น และปริมาณ KH_2PO_4 พบว่าไม่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในขณะที่ปริมาณยีสต์สกัด มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และทั้ง 3 ปัจจัย ส่งผลกระทบโดยตรงต่อการผลิตกรดซิตริกในทางบวก มีค่าเท่ากับ 0.32, 0.68 และ 0.05 ตามลำดับ และในส่วนของปฏิสัมพันธ์ต่อกัน (interaction term) ระหว่างผลของระดับความเป็นกรดต่างเริ่มต้นกับปริมาณยีสต์สกัด (X_1X_2) และ KH_2PO_4 (X_1X_3) และปริมาณยีสต์สกัดกับ KH_2PO_4 (X_2X_3) พบว่าความเป็นปฏิสัมพันธ์ต่อกันของปัจจัยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แสดงว่าทั้ง 3 ปัจจัย ไม่มีอิทธิพลร่วมต่อกัน และพิจารณาในส่วนกำลังสองของปัจจัย (Quadratic term) โดยอธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัย พบว่าระดับความเป็นกรดต่างเริ่มต้น (X_1^2) ปริมาณยีสต์สกัด (X_2^2) และ KH_2PO_4 (X_3^2) มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และส่งผลกระทบต่อการผลิตกรดซิตริกในทางบวก เท่ากับ 16.94, 34.73 และ 19.81 ตามลำดับ ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ในรูปสมการกำลังสองของแบบจำลอง โดยค่าทำนายสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2

$$\text{กรดซิตริก} = -137.38 + 46.49X_1 + 95.12X_2 + 12.98X_3 - 2.50X_1X_2 + 3.70X_1X_3 + 26.50X_2X_3 - 4.34X_1^2 - 155.25X_2^2 - 29.31X_3^2 \quad (2)$$



ภาพที่ 1 พื้นผิวตอบสนอง (a) (b) และ (c) ระหว่าง ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น (X_1) ปริมาณ yeast extract (X_2) และปริมาณ KH_2PO_4 (X_3) ต่อการผลิตกรดซิตริก

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของการผลิตกรดซิตริกโดยการออกแบบการทดลองแบบ ส่วนประสมกลาง (CCD)

Source	Sum of squares	Coefficients Estimate	Mean square	F -value	P-value Prob > F
Model	71.28	-	7.92	8.14	0.00*
intercept	-	12.15	-	-	-
X ₁	1.39	0.32	1.39	1.43	0.26
X ₂	6.26	0.68	6.26	6.44	0.02*
X ₃	0.04	0.05	0.04	0.04	0.85
X ₁ X ₂	0.13	-0.12	0.13	0.13	0.73
X ₁ X ₃	1.10	0.37	1.10	1.13	0.31
X ₂ X ₃	2.25	0.53	2.25	2.31	0.16
X ₁ ²	16.94	-1.08	16.94	17.41	0.00*
X ₂ ²	34.73	-1.55	34.73	35.70	0.00*
X ₃ ²	19.81	-1.17	19.81	20.36	0.00*

$R^2 = 0.88$, *P<0.05

ในการสร้างพื้นผิวตอบสนอง (3D surface response plot) ของปริมาณกรดซิตริก เมื่อได้สมการสำหรับการทำนายการผลิตกรดซิตริก จึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนอง ของปริมาณกรดซิตริก ระหว่างค่าระดับความเป็นกรดต่างเริ่มต้น และปริมาณ yeast extract (ภาพที่ 1a) พบว่าปริมาณกรดซิตริกจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อ ค่าระดับความเป็นกรดต่างเริ่มต้น และปริมาณ yeast extract เพิ่มขึ้นเช่นกัน จะสังเกตได้ว่าการได้ผลผลิตกรดซิตริกที่มากที่สุดนั้น จะมีองค์ประกอบของ ค่าระดับความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.5 และปริมาณ yeast extract 0.3 กรัมต่อลิตร จากภาพที่ 1b แสดงลักษณะพื้นผิวตอบสนองระหว่าง ค่าระดับความเป็นกรดต่างเริ่มต้น และ ปริมาณ KH₂PO₄ และรูปที่ 1c แสดงลักษณะพื้นผิวตอบสนอง ระหว่าง ปริมาณ yeast extract และ ปริมาณ KH₂PO₄ พบว่ากรดซิตริกมากขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของปัจจัยเหล่านั้นอยู่ที่ ระดับสูงเช่นกัน

2. การตรวจสอบยืนยันผล (Confirmation experiments)

ผลการตรวจสอบยืนยันระหว่างค่าการทำนายจากสมการและค่าจากการทดลอง โดยทำการตรวจสอบยืนยันผลที่ได้จากการทดลองพื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) ในการออกแบบส่วนประสมกลาง (CCD) โดยใช้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ได้จากการทำนาย (predicted value) ประกอบด้วย ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 5.34 ปริมาณ yeast extract 0.32 กรัมต่อลิตร และ KH₂PO₄ 0.69 กรัมต่อลิตร พบว่าในการทดลองเพื่อยืนยันผลพบว่าสามารถผลิตกรดซิตริก เท่ากับ 11.62±0.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งการทำนายกับผลการทดลองสอดคล้องกันที่ระดับ %Bias เท่ากับ 3.28 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตารางแสดงปริมาณกรดซิตริกและปัจจัยต่างๆที่ใช้ในการทดสอบความสอดคล้องของค่าที่ได้จากทำนายและค่าที่ได้จากการทดลอง

การทดลองที่	ระดับความเข้มข้น			กรดซิตริก ($\bar{x} \pm SD$, g/L)		Bias% ^a
	X ₁	X ₂	X ₃	Predicted	Measured	
21	5.01	0.21	0.84	7.81	7.41±0.18	5.12
22	5.34	0.32	0.69	12.01	11.62±0.54	3.28

^a % Bias คำนวณจากสูตร: [(ค่าที่ได้จากการทำนาย - ค่าที่ได้จากการทดลอง)/ค่าที่ได้จากการทำนาย] x 100 (Cuetos et al., 2007)

สรุป

จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากสับปะรดเหลือทิ้งภาคเกษตรกรรมโดย *Candida metapsilosis* CPRU001 ด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (RSM) ด้วยการออกแบบส่วนประสมกลาง (CCD) ซึ่งสามารถสร้างสมการพหุนามกำลังสอง (quadratic equation) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและค่าการผลิตรกรดซิตริก (response; Y) ดังสมการที่ 2 มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับร้อยละ 88 ซึ่งถือว่าเป็นค่ายอมรับได้ ดังนั้นจึงสามารถทำนายระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรกรดซิตริกสูงสุดของ เชื้อ *Candida metapsilosis* CPRU001 เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 144 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที และทำการตรวจสอบยืนยันผลที่ได้จากการออกแบบการทดลองพื้นผิวตอบสนอง (RSM) ด้วยการออกแบบส่วนประสมกลาง (CCD) โดยใช้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ได้จากการทำนาย (predicted value) ประกอบด้วย ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 5.34 ปริมาณ yeast extract 0.32 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 0.69 กรัมต่อลิตร พบว่าในการทดลองเพื่อยืนยันผลพบว่าสามารถผลิตรกรดซิตริก เท่ากับ 11.62 ± 0.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลการทำนายกับผลการทดลองสอดคล้องกันที่ระดับร้อยละของ Bias เท่ากับ 3.28

ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยครั้งต่อไปควรศึกษาการใช้สายพันธุ์ยีสต์ชนิดอื่นๆและปัจจัยที่มีผลทำให้การผลิตรกรดซิตริกให้ได้ผลผลิตที่สูงสุดและนำผลวิจัยในครั้งนี้พัฒนาการผลิตรกรดซิตริกแบบต่อเนื่องเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตรกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏชัยภูมิ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี 2560

เอกสารอ้างอิง

- ปิยวดี เจริญวัฒน์. (2559). ผลของไซโตไคนินและออกซินต่อการเจริญและพัฒนาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สับปะรด. วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 11 (3),65-74.
- สำนักงานเกษตรจังหวัดเมืองชัยภูมิ. (2557). ข้อมูลการผลิตพืชประจำปี 2555.เอกสารเย็บเล่ม:ชัยภูมิ
- Betiku E, Adesina OA. (2013). Statistical approach to the optimization of citric acid production using filamentous fungus *Aspergillus niger* grown on sweet potato starch hydrolyzate. Biomass and Bioenergy, (55),350–354.
- Cuetos MJ, Gomez X, Escapa A, Moran A. (2007). Evaluation and simultaneous optimization of bio-hydrogen production using 3^2 factorial design and the desirability function. J Power Sources, 169: 131-139.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamiton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.(1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356.
- Grewal HS, Kalra KL. (1995).Fungal production of citric acid. Biotechnol Adv, 13(2):209-34.
- Imandi SB, Bandaru VVR, Somanlanka SR, Bandaru SR, Garapati HR. (2008). Application of statistical experimental design for the optimization of medium constituents for the production citric acid from pineapple waste. BioresourTechnol, 99(10):4445-4450.
- Myers, R.H. (1995). Response surface methodology: process and production optimization using designed experiments. John Wiley and Sons. New York.
- Niladevi KN, Sukumaran RK, Jacob N, Anisha GS, Prema P. Optimization of laccase production from a novel strain *Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. Microbiol Res 2009; 164(1): 105-113.
- Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck PW. (2002).On the safety of *Aspergillus niger* a review. Appl Microbiol Biotechnol, 59(5): 426-435.
- Sylwester Krukowski, Mateusz Karasiewicz, Wacław Kolodziejski. (2017). Convenient UV-spectrophotometric determination of citrates in aqueous solutions with applications in the pharmaceutical analysis of oral electrolyte formulation. Journal of food and drug analysis, 25 (1), 717-722.
- Vandenberghe LPS, Soccol CR, Pandey A, Lebeault J-M. (1999). Review: microbial production of citric acid. Braz Arch Biol Technol, 42(3) :263-76.