การผลิตกรดมะนาวจากแป้งที่ผ่านการย่อยแล้ว ด้วยแบคทีเรีย

นางสาว สรัญญา ดิลกกัลยากุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-989-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19424973

CITRIC ACID PRODUCTION FROM HYDROLYSED STARCH BY BACTERIA

Miss Sarunya Dilokallayakool

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Program of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-331-989-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดมะนาวจากแป้งที่ผ่านการย่อยแล้ว ด้วยแบคทีเรีย
โดย	นางสาว สรัญญา ดิลกกัลยากุล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง)

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

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สรัญญา ดิลกกัลยากุล : การผลิตกรดมะนาวจากแป้งที่ผ่านการย่อยแล้ว ด้วยแบคทีเรีย (CITRIC ACID PRODUCTION FROM HYDROLYSED STARCH BY BACTERIA) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. นลิน นิลอุบล, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ และ อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง, 111 หน้า. ISBN 974-331-989-1.

งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์ โดยแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ATCC 21667, *Bacillus subtilis* ATCC 21610, *Brevibacterium flavum* ATCC 21682, *Achromobacter nucleoacidoves* ATCC 21683 และ *Corynebacterium fascians* ATCC 21684 พบว่า *B. subtilis* ATCC 21610 มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดมะนาวสูงสุด ดังนั้นจึงเลือก *B. subtilis* ATCC 21610 มาศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว ผลการศึกษาพบว่าองค์ประกอบของอาหารเตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสมใน 1 ลิตรประกอบด้วย กลูโคส 5.00 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 1.30 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.25 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.37 กรัม เฟร์ริกคลอไรด์ 0.02 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 0.07 กรัม และสารสกัดจากยีสต์ 4.00 กรัม ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวที่เหมาะสมใน 1 ลิตร ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์ ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 100.00 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 2.00 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.25 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.30 กรัม เฟร์ริกคลอไรด์ 0.02 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 0.07 กรัม และแคลเซียมคาร์บอเนต 50.00 กรัม เมื่อเลี้ยง *B. subtilis* ATCC 21610 เพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm พบว่า สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 48.93 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตกรดมะนาว (Yp/s) เท่ากับ 0.56 โดยการผลิตกรดมะนาวจะเริ่มขึ้นหลังจากที่ระยะเวลาการหมักผ่านไป 16 ชั่วโมงและเพิ่มขึ้นจนเกือบคงที่ที่ 40 ชั่วโมง การหมักในภาวะดังกล่าวพบว่าน้ำหมักไม่มีความหนืดและไม่พบกรดไอโซซิทริก

ภาควิชา ..... เทคโนโลยีทางชีวภาพ .....
สาขาวิชา ..... 2541 .....
ปีการศึกษา .....

ลายมือชื่อนิสิต ..... สรัญญา ดิลกกัลยากุล .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C827221 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: CITRIC ACID / HYDROLYSED CASSAVA STARCH / BACTERIA / PRODUCTION

SARUNYA DILOKKALLAYAKOOL : CITRIC ACID PRODUCTION FROM HYDROLYSED STARCH BY BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NALINE NILUBOL, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. SURAPONG NAVANKASATTUSAS, Ph.D. AND VASANA TOLEING, M.Sc. 111 pp. ISBN 974-331-989-1.

The efficiency of citric acid production from hydrolysed cassava starch by *Bacillus licheniformis* ATCC 21667, *Bacillus subtilis* ATCC 21610, *Brevibacterium flavum* ATCC 21682, *Achromobacter nucleoacidoves* ATCC 21683 and *Corynebacterium fascians* ATCC 21684 were determined and *B. subtilis* ATCC 21610 was selected for this study. The optimal conditions for citric acid production by *B. subtilis* ATCC 21610 were investigated. The suitable medium for inoculum preparation contained per liter : 5.00 g of glucose, 1.30 g of $(NH_4)_2SO_4$, 0.25 g of $MgSO_4.7H_2O$, 0.37 g of KH_2PO_4, 0.02 g of $FeCl_3$, 0.07 g of $CaCl_2.2H_2O$ and 4.00 g of yeast extract, while the suitable medium for citric acid production contained enzyme-hydrolysate of cassava starch equivalent to 100.00 g of glucose, 2.00 g of $(NH_4)_2SO_4$, 0.25 g of $MgSO_4.7H_2O$, 0.30 g of KH_2PO_4, 0.02 g of $FeCl_3$, 0.07 g of $CaCl_2.2H_2O$ and 50.00 g of $CaCO_3$. Cultivation of *B. subtilis* ATCC 21610 in a 5 liter-fermentor by using this medium at 37 ^{O}C, agitation speed of 600 rpm and aeration rate of 1 vvm, maximum citric acid production of 48.93 g/l with yield coefficient ($Y_{p/s}$) of 0.56 was obtained. Citric acid was observed after 16 h of cultivation and the maximum yield was reached after 40 h of cultivation with no viscosity and no accumulation of isocitric acid during cultivation.

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งตลอดการทำวิจัย และช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ และอาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ให้คำแนะนำแนวทางการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ ที่ได้กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ได้กรุณาให้ความดูแลและให้คำแนะนำปรึกษา ช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ และกรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ อันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณณรงค์ หอมจันทร์ และคุณกมลชัย มังกรฤทธิ์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของสถาบันฯ ทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจกำลังกาย ตลอดจนกำลังทรัพย์ที่สำคัญสำหรับการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณคุณอัครพล วงศ์กังแหที่ให้ความเข้าใจและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดการทำวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ เพื่อนๆ และพี่ๆทุกคน ตลอดจนถึงน้องๆ ทุกคน คุณอังสุมาริน อุนบูรณะวรรณและคุณศิษ พฤกษวันที่ให้ความช่วยเหลือให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ความดีของการศึกษาและคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ข้าพเจ้าขออุทิศแด่บูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญรูป..... ฒ
คำย่อ..... ถ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา..... 1
1.2 คุณสมบัติของกรดมะนาว..... 3
1.3 มาตรฐานของกรดมะนาว..... 4
1.4 ประโยชน์ของกรดมะนาว..... 5
1.5 การผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรีย..... 6
1.6 ชีวเคมีของการผลิตกรดมะนาว..... 8
1.7 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาว..... 11
1.8 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย..... 14
1.9 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 15
1.10 ขั้นตอนงานวิจัย..... 16

2 วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 17
2.2 เชื้อจุลินทรีย์..... 19
2.3 การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อ..... 20
2.4 วิธีวิเคราะห์..... 21

สารบัญ(ต่อ)

บทที่		หน้า
3	ผลการทดลอง	
	3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ.....	24
	3.2 การเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดมะนาวในอาหาร Bacillus Medium (BM) สูตรปรับปรุง.....	36
	3.3 เปรียบเทียบสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า.....	39
	3.4 การเจริญและการผลิตกรดมะนาวของ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารที่มีแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนในระดับขวดเขย่า.....	44
	3.5 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวของ *B. subtilis* ATCC 21610 ในระดับขวดเขย่าในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน.....	47
	3.5.1 ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตกรดมะนาว.....	47
	3.5.2 ผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตกรดมะนาว.....	51
	3.5.3 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว.....	54
	3.5.4 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลต่อการผลิตกรดมะนาว.....	57
	3.5.5 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว.....	60
	3.5.6 ปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสม.....	65
	3.5.7 ผลของเฟร์ริกคลอไรด์ที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว.....	68
	3.5.8 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการผลิตกรดมะนาว.....	68
	3.5.9 ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม.....	73
	3.5.10 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมและอาหารที่ได้จากการหาภาวะที่เหมาะสม	76
	3.5.11 การเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ในระดับขวดเขย่า.....	79
	3.6 การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	82

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	88
รายการอ้างอิง		93
ภาคผนวก		
	ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	98
	ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	104
	ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน	106
	ภาคผนวก ง สูตรการคำนวณ	109
	ภาคผนวก จ โครมาโทแกรมของกรดมะนาวเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC	110
	ประวัติผู้เขียน	111

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	คุณลักษณะทางเคมีตามมาตรฐานของกรดมะนาว.....	4
1-2	ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ากรดมะนาวในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2531-2542.....	15
3-1	เปรียบเทียบการเจริญของ *B. licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ BHI และ NB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	25
3-2	เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ BHI และ NB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	26
3-3	เปรียบเทียบการเจริญของ *B. licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ NB ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคสและมีน้ำตาลกลูโคสที่ระดับ 5 และ 10 กรัมต่อลิตรที่30 องศาเซลเซียส.....	28
3-4	เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ NB ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคสและมีน้ำตาลกลูโคสที่ระดับ 5 และ 10 กรัมต่อลิตรที่ 30 องศาเซลเซียส.....	29
3-5	เปรียบเทียบการเจริญของ *B. licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตรและในอาหาร NB ที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรที่ 30 องศาเซลเซียส.....	31
3-6	เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตรและในอาหาร NB ที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรที่ 30 องศาเซลเซียส.....	32
3-7	เปรียบเทียบการเจริญของ *B. licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรและสารสกัดจากยีสต์ที่ระดับ 1, 2, 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตรที่ 30 องศาเซลเซียส.....	34

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3-8	เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรและสารสกัดจากยีสต์ที่ระดับ 1, 2, 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตรที่ 30 องศาเซลเซียส	35
3-9	เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ATCC 21667, *B. subtilis* ATCC 21610, *Brevibacterium flavum* ATCC 21682, *Achromobacter nucleoacidoves* ATCC 21683 และ *Corynebacterium fascians* ATCC 21684 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ BM ที่ปรับปรุงแล้วที่ 30 องศาเซลเซียส	37
3-10	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เพื่อผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้หัวเชื้อที่เวลา 6, 8 และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ	40
3-11	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลที่เหลือในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 เพื่อผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้หัวเชื้อที่เวลา 4, 6 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ	42
3-12	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เพื่อผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน	45
3-13	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ตั้งแต่ 1-4 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3-14	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ตั้งแต่ 0-1 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน.....	49
3-15	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ตั้งแต่ 1-5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน.....	52
3-16	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ที่อุณหภูมิการหมักเป็น 28,30,33 37และ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน.....	55
3-17	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเริ่มต้นในการผลิตเป็น 75 และ 100 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	58
3-18	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)ในอาหาร 0.00-1.00 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน.....	61

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3-19	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)ในอาหาร 0.10-0.30 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน.....	63
3-20	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)ในอาหารเริ่มต้น 0.00-0.40 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน.....	66
3-21	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง. ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อในอาหารมีเฟร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$)ในปริมาณ 0.00-0.04 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน.....	69
3-22	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อในอาหารมีแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ในปริมาณ 0.00-0.11 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน.....	71
3-23	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณสารควบคุมความเป็นกรด-ด่าง (แคลเซียมคาร์บอเนต, $CaCO_3$) 30-50 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน.....	74

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3-24	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ระหว่างอาหารสูตรเดิมและอาหารสูตรที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว(สูตรใหม่).....	77
3-25	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ได้รับการปรับปรุงให้เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับขวดเขย่า.....	80
3-26	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ค่า Yp/s, Yx/s, Yp/x, Yp/s', Yx/s' และ Yp/x' ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ได้รับการปรับปรุงให้เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	83

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1-1	โครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว.....	3
1-2	วัฏจักรเครบส์หรือวัฏจักรกรดมะนาว.....	9
1-3	ความสัมพันธ์ของวัฏจักรเครบส์และปฏิกิริยาการสร้างทดแทน	10
3-1	เปรียบเทียบการเจริญของ *B.licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ BHI และ NB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส....	25
3-2	เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ BHI และ NB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	26
3-3	เปรียบเทียบการเจริญของ *B.licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ NB ที่ไม่มีกลูโคส, มีกลูโคสที่ระดับ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส.....	28
3-4	เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ NB ที่ไม่มีกลูโคส, มีกลูโคสที่ระดับ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส.....	29
3-5	เปรียบเทียบการเจริญของ *B.licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่ระดับกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตรกับอาหาร NB ที่มีกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร.....	31
3-6	เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่ระดับกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตรกับอาหาร NB ที่มีกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร.....	32
3-7	เปรียบเทียบการเจริญของ *B.licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ทีมีกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรและสารสกัดจากยีสต์ที่ระดับ 1, 2, 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร.....	34
3-8	เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่มีกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรและสารสกัดจากยีสต์ที่ระดับ 1, 2, 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร.....	35
3-9	เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ATCC 21667, *Bacillus subtilis* ATCC 21610, *Brevibacterium flavum* ATCC 21682, *Achromobacter nucleoacidoves* ATCC 21683 และ *Corynebacterium fascians* ATCC 21684 ในอาหาร BM ที่ดัดแปลง.....	38

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3-10	ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการหมักโดยเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อมีอายุหัวเชื้อเป็น 6 (รูป ก) 8 (รูป ข) 9 ชั่วโมง (รูป ค) ตามลำดับ.....	41
3-11	ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการหมักโดยเชื้อ *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อมีอายุหัวเชื้อเป็น 4 (รูป ก) 6 (รูป ข) และ 8 ชั่วโมง (รูป ค) ตามลำดับ.....	43
3-12	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว, น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เพื่อผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน.....	46
3-13	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ตั้งแต่ 1-4กรัมต่อลิตรในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน....	50
3-14	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ตั้งแต่ 0-1กรัมต่อลิตรในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน....	50
3-15	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งที่หมักโดย *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตั้งแต่ 1.0-5.0 กรัมต่อลิตร ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง.....	53
3-16	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ที่อุณหภูมิการหมักเป็น 28, 30, 33 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง.....	56
3-17	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเริ่มต้นในการผลิตเป็น 75-100 กรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง.....	59

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3-18	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งที่หมักโดย *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ในอาหาร 0.00-1.00 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง.....	62
3-19	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งที่หมักโดย *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ในอาหาร 0.10-0.30 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง.....	64
3-20	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งที่หมักโดย *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเริ่มต้นในอาหารตั้งแต่ 0.0-0.4 กรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง.....	67
3-21	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งที่หมักโดย *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณเฟร์ริกคลอไรด์ 0.00-0.04 กรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง.....	70
3-22	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งที่หมักโดย *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ 0.00-0.11 กรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง.....	72
3-23	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยง *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 30-50 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง.....	75
3-24	เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งของ*B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมและอาหารที่ได้รับการปรับปรุงแล้วในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง.....	78

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3-25	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว, น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ได้รับการปรับปรุงให้เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่า.....	81
3-26	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง,ปริมาณกรดมะนาว, น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร BM ที่ได้รับการปรับปรุงแล้วที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	85
3-27	ค่า Yp/s, Yx/s และ Yp/x ในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	86
3-28	ค่า Yp/s', Yx/s' และ Yp/x' ในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	87
ค-1	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้กรดไดไนโทรซาลิไซลิก.....	106
ค-2	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส โดยใช้เอนไซม์ พี.จี.โอ.....	106
ค-3	กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว โดยวิธีเพนทะโบรโมเอซีโทน.....	107
ค-4	กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว โดยวิธี HPLC.....	107
ค-5	กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิทริก โดยวิธี HPLC.....	108
จ-1	ลักษณะโครมาโทแกรมของกรดมะนาว เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC.....	110

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
vvm	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที
rpm	รอบต่อนาที
Yp/s	สัมประสิทธิ์ของผลผลิตกรดมะนาวเมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ใช้
Yx/s	สัมประสิทธิ์ของผลผลิตมวลเซลล์เมื่อเทียบกับปริมาณกลูโคสที่ใช้
Yp/x	สัมประสิทธิ์ของผลผลิตกรดมะนาวเมื่อเทียบกับมวลเซลล์
Yp/s'	สัมประสิทธิ์ของผลผลิตกรดมะนาวเมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ณ เวลาการหมักนั้น
Yx/s'	สัมประสิทธิ์ของผลผลิตมวลเซลล์เมื่อเทียบกับปริมาณกลูโคสที่ใช้ ณ เวลาการหมักนั้น
Yp/x'	สัมประสิทธิ์ของผลผลิตกรดมะนาวเมื่อเทียบกับมวลเซลล์ ณ เวลาการหมักนั้น
ATCC	American Type Cultue Collection
IBGE	The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย