# บทที่ 3

## ผลการทดลอง

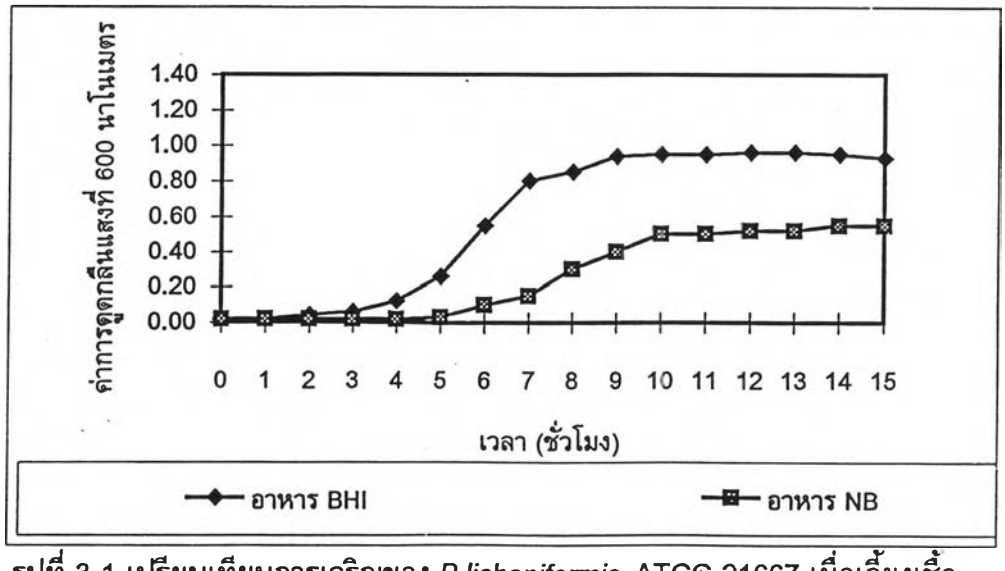
### 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ

งานวิจัยนี้จะศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรีย ซึ่งสายพันธุ์ที่นำมาคัดเลือกได้มาจาก American Type Culture Collection (ATCC) ซึ่งแนะนำให้ใช้อาหาร Brain Heart Infusion (BHI) (ภาคผนวก ก 1.1) เนื่องจากเป็นอาหารสูตรสำเร็จสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีราคาแพง ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ซึ่งต้องใช้หัวเชื้อปริมาณมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีราคาไม่แพงและให้ผลการเจริญที่ดี จึงทำการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก 1.3) ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียโดยทั่วไป เปรียบเทียบกับอาหาร BHI ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3-1,รูปที่ 3-1 และตารางที่ 3-2, รูปที่ 3-2 พบว่าทั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 21610 และ *Bacillus licheniformis* ATCC 21667 เจริญในอาหาร BHI ได้ดีกว่าอาหาร NB โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 21610และ *Bacillus licheniformis* ATCC 21667 มีระยะการเจริญแบบทวีคูณในอาหาร BHI ที่ชั่วโมงที่ 6 และ 8 ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเป็น 0.55 และ 0.75 ตามลำดับ แต่ในอาหาร NB แบคทีเรียทั้งสอง มีระยะการเจริญแบบทวีคูณที่ชั่วโมงที่ 8 และ 11 ที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.30 และ 0.50 ตามลำดับ

ตารางที่ 3-1 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ BHI และ NB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

| เวลา | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | |
|---|---|---|
| (ชั่วโมง) | อาหาร BHI | อาหาร NB |
| 0 | 0.02 | 0.02 |
| 1 | 0.02 | 0.02 |
| 2 | 0.04 | 0.02 |
| 3 | 0.06 | 0.02 |
| 4 | 0.12 | 0.02 |
| 5 | 0.26 | 0.03 |
| 6 | 0.55 | 0.10 |
| 7 | 0.80 | 0.15 |
| 8 | 0.85 | 0.30 |
| 9 | 0.94 | 0.40 |
| 10 | 0.95 | 0.50 |
| 11 | 0.95 | 0.50 |
| 12 | 0.96 | 0.52 |
| 13 | 0.96 | 0.52 |
| 14 | 0.95 | 0.55 |
| 15 | 0.93 | 0.55 |

หมายเหตุ ตัวเลขที่อยู่ในแถบสีดำ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ

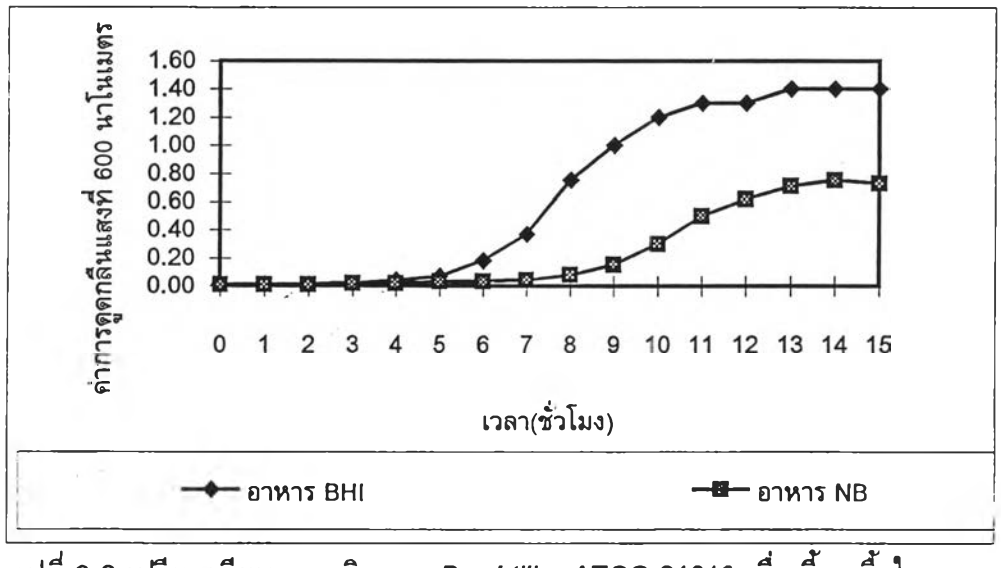



รูปที่ 3-1 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ BHI และNB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-2 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ BHI และ NB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

| เวลา | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | |
|---|---|---|
| (ชั่วโมง) | อาหาร BHI | อาหาร NB |
| 0 | 0.01 | 0.01 |
| 1 | 0.01 | 0.01 |
| 2 | 0.01 | 0.01 |
| 3 | 0.02 | 0.02 |
| 4 | 0.04 | 0.02 |
| 5 | 0.07 | 0.03 |
| 6 | 0.18 | 0.03 |
| 7 | 0.37 | 0.04 |
| 8 | 0.75 | 0.08 |
| 9 | 1.00 | 0.15 |
| 10 | 1.20 | 0.30 |
| 11 | 1.30 | 0.50 |
| 12 | 1.30 | 0.62 |
| 13 | 1.40 | 0.71 |
| 14 | 1.40 | 0.75 |
| 15 | 1.40 | 0.73 |

หมายเหตุ ตัวเลขที่อยู่ในแถบสีดำ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ



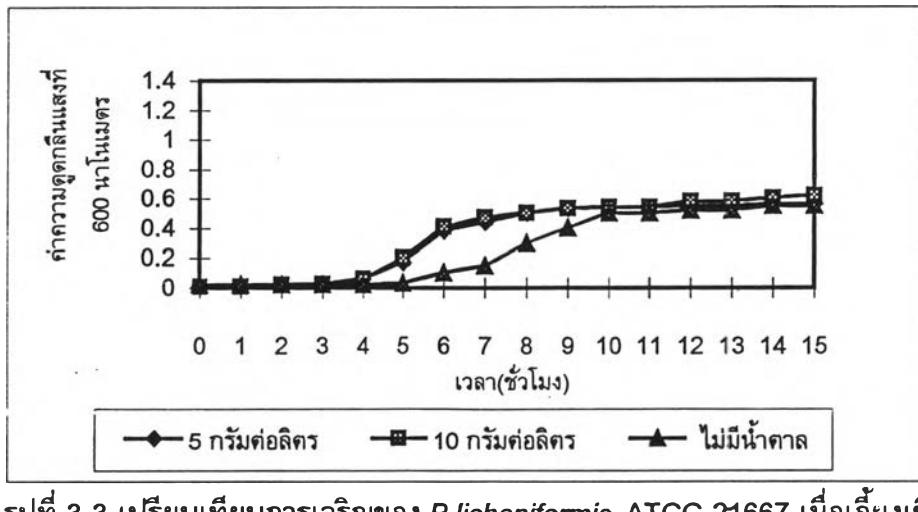

รูปที่ 3-2 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ BHI และ NB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จะเห็นได้ว่าในอาหาร NB การเจริญของแบคทีเรียต่ำกว่าในอาหาร BHI เมื่อพิจารณาสูตรอาหาร BHI พบว่ามีกลูโคสเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย การเพิ่มกลูโคสลงไปในอาหาร NB อาจช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งของคาร์บอน ดังนั้นจึงทำการปรับปรุงอาหาร NB โดยการเพิ่มกลูโคสลงไปเป็น 2 ระดับคือ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ดำเนินการทดลองตามข้อ 2.3.2.1 ผลการทดลองแสดงดัง ตารางที่ 3-3 รูปที่ 3-3 และ ตารางที่ 3-4 รูปที่ 3-4 จากผลการทดลองพบว่าการเติมกลูโคสมีผลทำให้การเจริญเร็วขึ้นและความเข้มข้นของกลูโคสทั้งสองระดับให้ผลการเจริญของ *B. licheniformis* ATCC 21667 และ *B. subtilis* ATCC 21610 ไม่แตกต่างกัน ทำให้เชื้อทั้งสองมีระยะการเจริญแบบทวีคูณที่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งเร็วกว่าที่ไม่เติมกลูโคส เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับอาหาร BHI แล้ว พบว่าเชื้อ *B. licheniformis* ATCC 21667 มีค่าการดูดกลืนแสงในอาหาร BHI เป็น 0.55 ในอาหาร NB ที่มีกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เป็น 0.38 และ 0.41 ตามลำดับ ที่ระยะการเจริญแบบทวีคูณเดียวกันคือ ชั่วโมงที่ 6 ส่วน *B. subtilis* ATCC 21610 มีค่าการดูดกลืนแสงในอาหาร BHI เป็น 0.75 ที่ชั่วโมงที่ 8 และในอาหาร NB ที่มีกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตรมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากันคือ 0.43 ที่ชั่วโมงที่ 6

ตารางที่ 3-3 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ NB ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคสและมีน้ำตาลกลูโคสที่ระดับ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส

| เวลา | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | | |
|---|---|---|---|
| | น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร) | | |
| (ชั่วโมง) | 0 | 5 | 10 |
| 0 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 1 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 2 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| 3 | 0.02 | 0.02 | 0.03 |
| 4 | 0.02 | 0.06 | 0.06 |
| 5 | 0.03 | 0.17 | 0.20 |
| 6 | 0.10 | 0.38 | 0.41 |
| 7 | 0.15 | 0.44 | 0.47 |
| 8 | 0.30 | 0.50 | 0.50 |
| 9 | 0.40 | 0.53 | 0.53 |
| 10 | 0.50 | 0.54 | 0.54 |
| 11 | 0.50 | 0.54 | 0.54 |
| 12 | 0.52 | 0.55 | 0.58 |
| 13 | 0.52 | 0.55 | 0.58 |
| 14 | 0.55 | 0.56 | 0.60 |
| 15 | 0.55 | 0.56 | 0.62 |

หมายเหตุ ตัวเลขที่อยู่ในแถบสีดำ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ

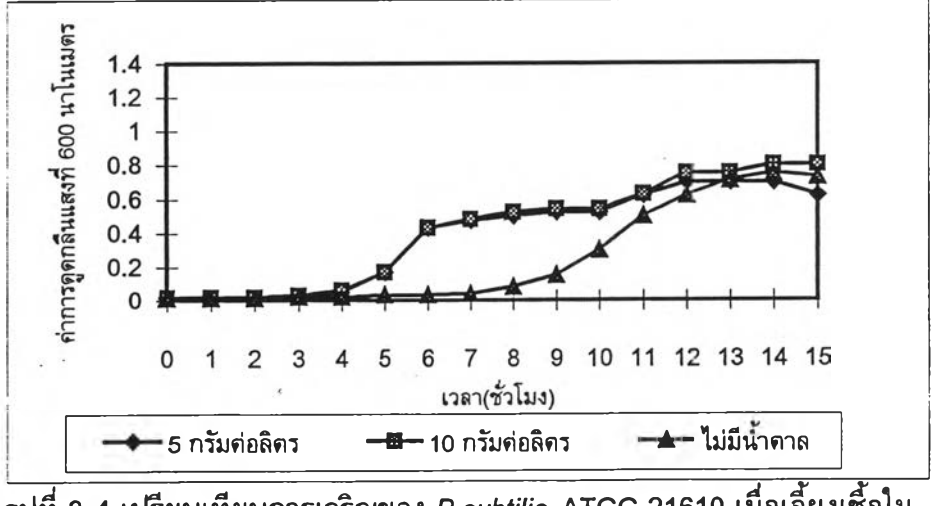



รูปที่ 3-3 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ NB ที่ไม่มีกลูโคส,มีกลูโคสที่ระดับ5 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-4 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ NB ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคสและมีน้ำตาลกลูโคสที่ระดับ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส

| เวลา | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | | |
|---|---|---|---|
| | น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร) | | |
| (ชั่วโมง) | 0 | 5 | 10 |
| 0 | 0.01 | 0.02 | 0.02 |
| 1 | 0.01 | 0.02 | 0.02 |
| 2 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| 3 | 0.02 | 0.03 | 0.03 |
| 4 | 0.02 | 0.05 | 0.06 |
| 5 | 0.03 | 0.17 | 0.17 |
| 6 | 0.03 | **0.43** | **0.43** |
| 7 | 0.04 | 0.47 | 0.48 |
| 8 | 0.08 | 0.50 | 0.52 |
| 9 | 0.15 | 0.52 | 0.54 |
| 10 | 0.30 | 0.52 | 0.54 |
| 11 | **0.50** | 0.62 | 0.63 |
| 12 | 0.62 | 0.70 | 0.75 |
| 13 | 0.71 | 0.70 | 0.75 |
| 14 | 0.75 | 0.70 | 0.80 |
| 15 | 0.73 | 0.62 | 0.80 |

**หมายเหตุ ตัวเลขที่อยู่ในแถบสีดำ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ**



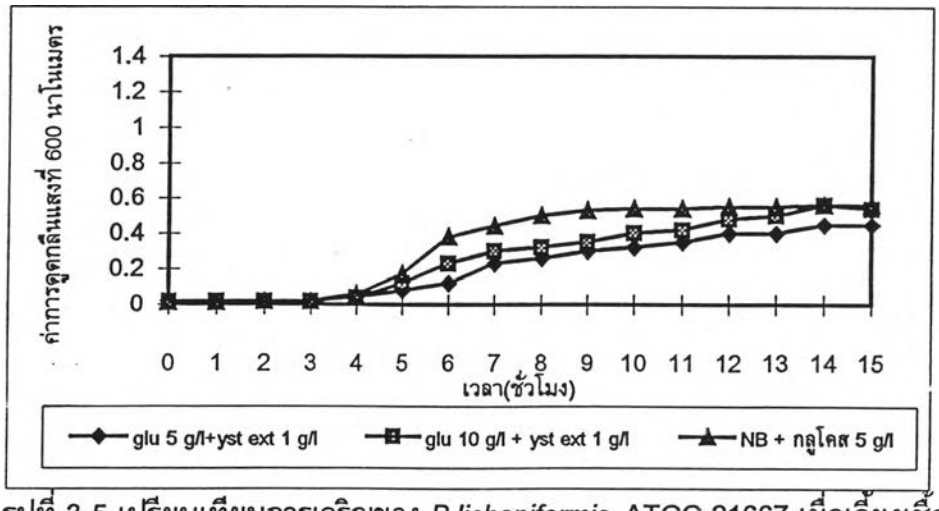

**รูปที่ 3-4 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ NB ที่ไม่มีกลูโคส,มีกลูโคสที่ระดับ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส**

อย่างไรก็ตามแม้การน้ำตาลลงในอาหาร NB สามารถให้ผลการเจริญดีขึ้นแล้ว แต่ยังให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดต่ำกว่าสูตร BHI และสูตรอาหาร NB ยังคงมีราคาแพงเนื่องจากมีสารสกัดจากเนื้อ (beef extract) และ peptone เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกสูตรอาหารใหม่ที่มีองค์ประกอบของสูตรอาหารเป็นสารประกอบอนินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ราคาไม่แพง คือสูตรอาหาร Bacillus medium (BM) (Cote, 1989) (ภาคผนวก ก 1.6) ซึ่งองค์ประกอบในสูตรอาหาร BM ใกล้เคียงกับอาหารที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรีย (Suzuki *et al*, 1974; Kimura and Nakanishi, 1975) เนื่องจากการทดลองเติมน้ำตาลลงในอาหาร NB มีผลทำให้การเจริญของ *B. licheniformis* ATCC 21667 และ *B. subtilis* ATCC 21610 ดีขึ้น ในสูตรอาหาร BM มีน้ำตาลเพียง 1 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเติมน้ำตาลลงในอาหารที่ระดับน้ำตาล 5 และ 10 กรัมต่อลิตร จากการเปรียบเทียบ พบว่าการเติมน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตรให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าการเติมน้ำตาล 5 กรัมต่อลิตร แสดงว่าน้ำตาลที่เติมลงไปในอาหาร BM ทำให้ผลการเจริญเพิ่มขึ้นทั้งเชื้อ *B. licheniformis* ATCC 21667 และ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับอาหาร NB ที่ระดับน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรแล้วพบว่าทั้ง *B. licheniformis* ATCC 21667 และ *B. subtilis* ATCC 21610 ให้ผลการเจริญในอาหาร NB ที่มีน้ำตาล 5 กรัมต่อลิตรสูงกว่าอาหาร BM ที่มีการเพิ่มน้ำตาลแต่มีระยะการเจริญแบบทวีคูณเท่ากันคือที่ 6 ชั่วโมง (ตารางที่ 3-5, 3-6 และ รูปที่ 3-5, 3-6)

ตารางที่ 3-5 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่น้ำตาลกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร และในอาหาร NB ที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | | |
|---|---|---|---|
| | น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร) | | |
| | NB + กลูโคส 5 g/l | BM + กลูโคส 5 g/l | BM +กลูโคส 10 g/l |
| 0 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| 1 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| 2 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| 3 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| 4 | 0.06 | 0.04 | 0.04 |
| 5 | 0.17 | 0.08 | 0.12 |
| 6 | 0.38 | 0.12 | 0.23 |
| 7 | 0.44 | 0.23 | 0.30 |
| 8 | 0.50 | 0.26 | 0.32 |
| 9 | 0.53 | 0.30 | 0.35 |
| 10 | 0.54 | 0.32 | 0.40 |
| 11 | 0.54 | 0.35 | 0.42 |
| 12 | 0.55 | 0.40 | 0.48 |
| 13 | 0.55 | 0.40 | 0.50 |
| 14 | 0.56 | 0.45 | 0.56 |
| 15 | 0.56 | 0.45 | 0.54 |

**หมายเหตุ** **ตัวเลขที่อยู่ในแถบสีดำ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงระยะการเจริญแบบทวีคูณ**

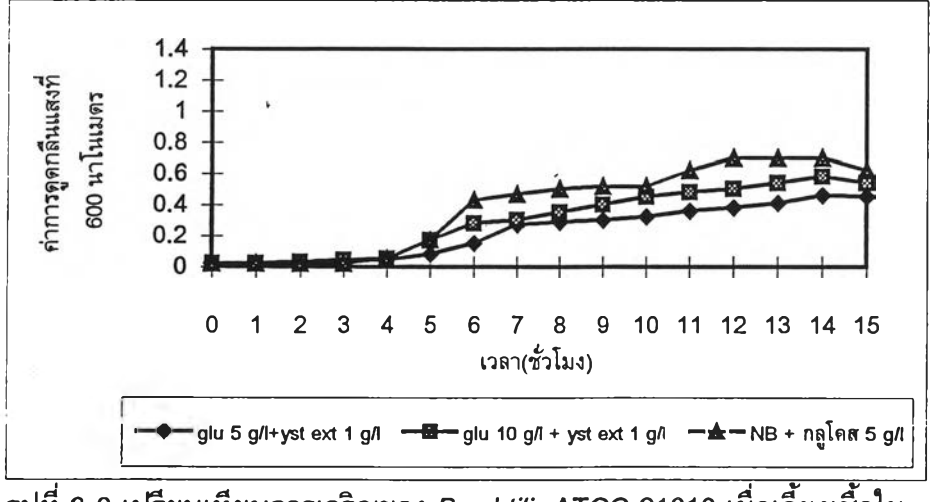



รูปที่ 3-5 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่มีกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร กับอาหาร NB ที่มีกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3-6 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่น้ำตาลกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร และในอาหาร NB ที่มี น้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | | |
|---|---|---|---|
| | น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร) | | |
| | NB + กลูโคส 5 g/l | BM + กลูโคส 5 g/l | BM +กลูโคส 10 g/l |
| 0 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| 1 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| 2 | 0.02 | 0.02 | 0.03 |
| 3 | 0.02 | 0.03 | 0.04 |
| 4 | 0.05 | 0.04 | 0.05 |
| 5 | 0.17 | 0.08 | 0.17 |
| 6 | 0.43 | 0.15 | 0.28 |
| 7 | 0.47 | 0.27 | 0.30 |
| 8 | 0.50 | 0.29 | 0.35 |
| 9 | 0.52 | 0.30 | 0.40 |
| 10 | 0.52 | 0.32 | 0.45 |
| 11 | 0.62 | 0.36 | 0.48 |
| 12 | 0.70 | 0.38 | 0.50 |
| 13 | 0.70 | 0.41 | 0.54 |
| 14 | 0.70 | 0.46 | 0.58 |
| 15 | 0.62 | 0.45 | 0.54 |

หมายเหตุ ตัวเลขที่อยู่ในแถบสีดำ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ



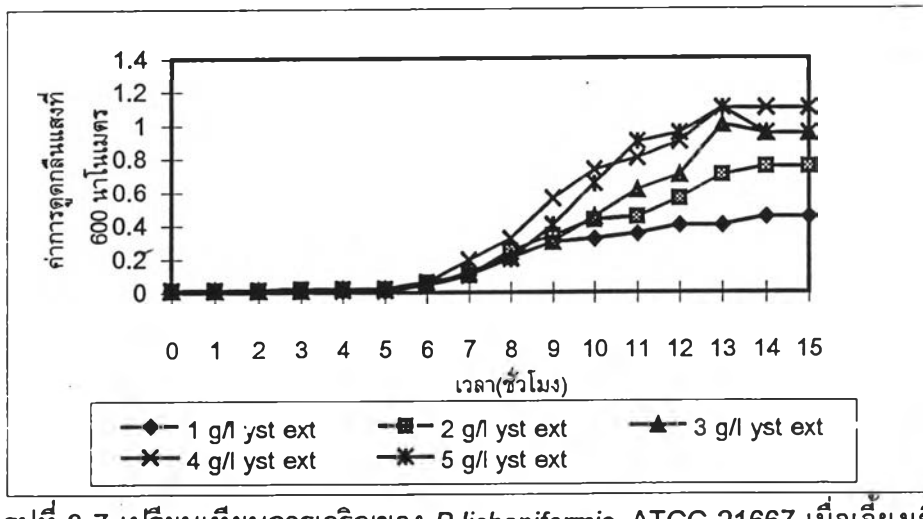

รูปที่ 3-6 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่มีกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร กับอาหาร NB ที่มีกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร

แต่เนื่องจากในอาหาร NB นั้นมีสารสกัดจากเนื้อถึง 3 กรัมต่อลิตร ขณะที่ในอาหาร BM มีสารสกัดจากยีสต์เพียง 1 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงทำการศึกษาการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ATCC 21667 และ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสูตร BM ที่มีน้ำตาล 5 กรัมต่อลิตร (เนื่องจากปริมาณกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้ผลการเจริญไม่แตกต่างกับที่ระดับ 5 กรัมต่อลิตรมากนัก) และสารสกัดจากยีสต์แตกต่างกัน 1, 2, 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังตารางที่ 3-7 รูปที่ 3-7 และตารางที่ 3-8 รูปที่ 3-8 จากผลการทดลองพบว่า *B. licheniformis* ATCC 21667 และ *B. subtilis* ATCC 21610 ให้ผลการเจริญคล้ายคลึงกัน คือ ที่ระดับสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตรให้ผลการเจริญดีที่สุด โดย *B. licheniformis* ATCC 21667และ *B. subtilis* ATCC 21610 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะการเจริญแบบทวีคูณเท่ากับ 0.56 และ 0.65 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร BHI แล้วพบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารสูตร BM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรและสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก 1.7) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เตรียมเป็นหัวเชื้อต่อไป เนื่องจากให้ผลการเจริญใกล้เคียงกับอาหาร BHI แม้ว่าจะใช้เวลาในการเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณนานกว่าเล็กน้อย

ตารางที่ 3-7 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรและสารสกัดจากยีสต์ที่ระดับ 1, 2, 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร) | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 0 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 1 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 2 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 3 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 4 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 |
| 5 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 |
| 6 | 0.06 | 0.06 | 0.04 | 0.06 | 0.04 |
| 7 | 0.10 | 0.10 | 0.12 | 0.19 | 0.10 |
| 8 | 0.20 | 0.25 | 0.21 | 0.32 | 0.020 |
| 9 | 0.30 | 0.34 | 0.30 | 0.56 | 0.40 |
| 10 | 0.32 | 0.43 | 0.45 | 0.73 | 0.65 |
| 11 | 0.35 | 0.45 | 0.61 | 0.80 | 0.90 |
| 12 | 0.40 | 0.56 | 0.70 | 0.90 | 0.95 |
| 13 | 0.40 | 0.70 | 1.00 | 1.10 | 1.10 |
| 14 | 0.45 | 0.75 | 0.95 | 1.10 | 0.95 |
| 15 | 0.45 | 0.75 | 0.95 | 1.10 | 0.95 |

**หมายเหตุ ตัวเลขที่อยู่ในแถบสีดำ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ**

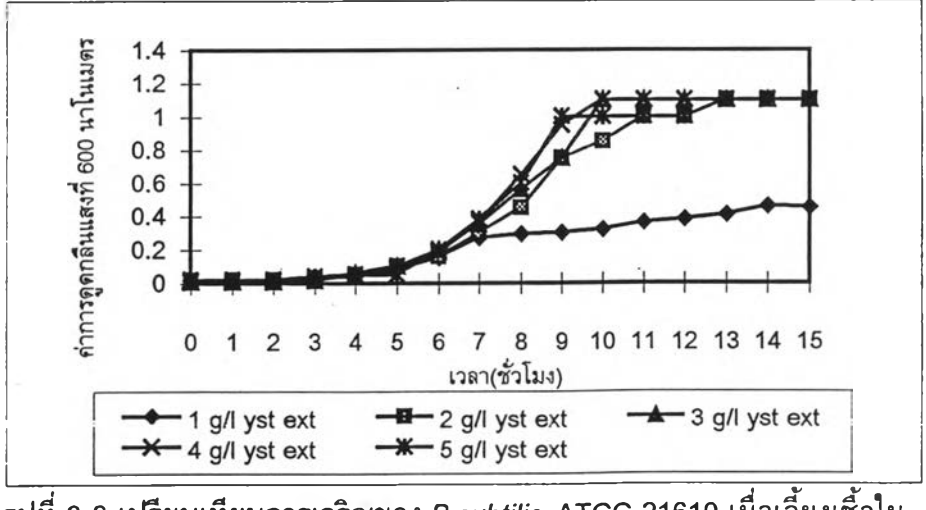



รูปที่ 3-7 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.licheniformis* ATCC 21667 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่มีกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ที่ระดับ 1, 2, 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3-8 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรและสารสกัดจากยีสต์ที่ระดับ 1, 2, 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 0 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 |
| 1 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 |
| 2 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 |
| 3 | 0.04 | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.04 |
| 4 | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.05 | 0.05 |
| 5 | 0.08 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.05 |
| 6 | 0.15 | 0.16 | 0.02 | 0.18 | 0.20 |
| 7 | 0.27 | 0.30 | 0.35 | 0.36 | 0.38 |
| 8 | 0.29 | 0.45 | 0.56 | 0.65 | 0.60 |
| 9 | 0.30 | 0.75 | 0.75 | 0.95 | 1.0 |
| 10 | 0.32 | 0.85 | 1.10 | 1.10 | 1.0 |
| 11 | 0.36 | 1.00 | 1.10 | 1.10 | 1.0 |
| 12 | 0.38 | 1.00 | 1.10 | 1.10 | 1.0 |
| 13 | 0.41 | 1.10 | 1.10 | 1.10 | 1.10 |
| 14 | 0.46 | 1.10 | 1.10 | 1.10 | 1.10 |
| 15 | 0.45 | 1.10 | 1.10 | 1.10 | 1.10 |

หมายเหตุ ตัวเลขที่อยู่ในแถบสีดำ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ




รูปที่ 3-8 เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร BM ที่มีกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ที่ระดับ 1, 2, 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร

I 19246973

3.2 การเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดมะนาวในอาหาร Bacillus Medium (BM) สูตรปรับปรุง

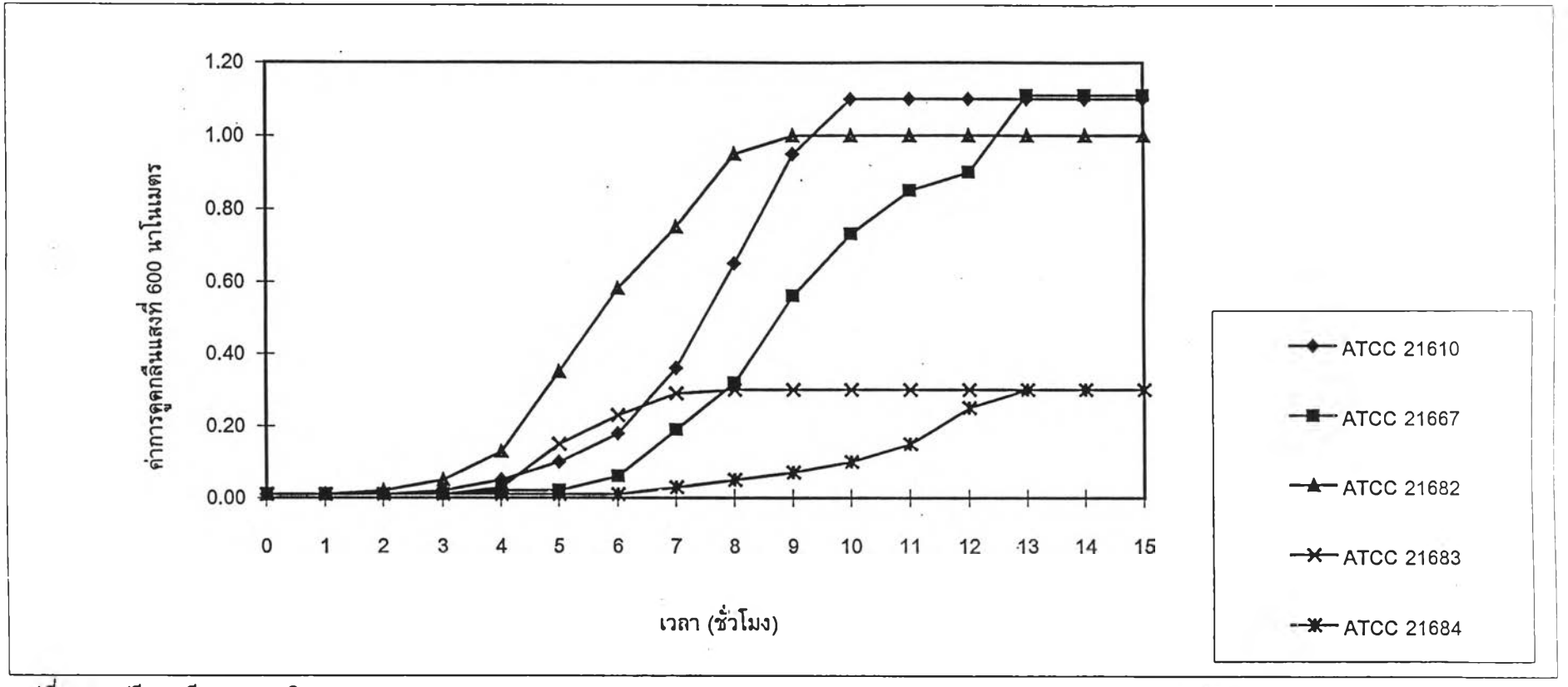
หลังจากได้สูตรอาหารที่ใช้เตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสมแล้ว คือสูตรอาหาร BM ที่มีการเพิ่มน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรและสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก 1.7) นำสูตรอาหารที่ได้มาเลี้ยงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาว 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus licheniformis* ATCC 21667, *Bacillus subtilis* ATCC 21610, *Brevibacterium flavum* ATCC 21682, *Achromobacter nucleoacidoves* ATCC 21683 และ *Corynebacterium fascians* ATCC 21684 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารดังกล่าว โดยเก็บผลทุกชั่วโมงจนถึง 15 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่า *Brevibacterium flavum* ATCC 21682, *Baciiius subtilis* ATCC 21610, *Bacillus licheniformis* ATCC 21667, *Achromobacter nucleacidoves* ATCC 21683 และ *Corynebacterium fascians* ATCC 21684 มีระยะการเจริญกึ่งกลางทวีคูณเป็น 6, 8, 9, 5 และ 11 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.58, 0.65, 0.56, 0.15 และ 0.15

ดังตารางที่ 3-9 และรูปที่ 3-9 จะเห็นว่า *Bacillus subtilis* ATCC 21610 และ *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 มีการเจริญในอาหารที่คัดเลือกได้ดีกว่า *Bacillus licheniformis* ATCC 21667, *Achromobacter nucleoacidcves* ATCC 21683 และ *Corynebacterium fascians* ATCC 21684 จึงเลือก *B.subtilis* ATCC 21610 ที่ระยะการเจริญกึ่งกลางทวีคูณที่ 8 ชั่วโมง และ *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 ที่ระยะการเจริญกึ่งกลางทวีคูณที่ 6 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 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 ที่ปรับปรุงแล้ว ที่ 30 องศาเซลเซียส

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ATCC 21610 | ATCC 21667 | ATCC 21682 | ATCC 21683 | ATCC 21684 |
| 0 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 1 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 2 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 |
| 3 | 0.02 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | 0.01 |
| 4 | 0.05 | 0.02 | 0.13 | 0.03 | 0.01 |
| 5 | 0.10 | 0.02 | 0.35 | 0.15 | 0.01 |
| 6 | 0.18 | 0.06 | 0.58 | 0.23 | 0.01 |
| 7 | 0.36 | 0.19 | 0.75 | 0.29 | 0.03 |
| 8 | 0.65 | 0.32 | 0.95 | 0.30 | 0.05 |
| 9 | 0.95 | 0.56 | 1.00 | 0.30 | 0.07 |
| 10 | 1.10 | 0.73 | 1.00 | 0.30 | 0.10 |
| 11 | 1.10 | 0.85 | 1.00 | 0.30 | 0.15 |
| 12 | 1.10 | 0.90 | 1.00 | 0.30 | 0.25 |
| 13 | 1.10 | 1.11 | 1.00 | 0.30 | 0.30 |
| 14 | 1.10 | 1.11 | 1.00 | 0.30 | 0.30 |
| 15 | 1.10 | 1.11 | 1.00 | 0.30 | 0.30 |




รูปที่ 3-9 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus licheniformis* ATCC 21667 , *Bacillus subtilis* ATCC 21610 ,*Brevibacterium flavum* ATCC 21682, *Achromobacter nucleoacidoves* ATCC 21683 และ *Corynebacterium fascians* ATCC 21684 ในอาหาร BM ที่ดัดแปลง

3.3 เปรียบเทียบสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า

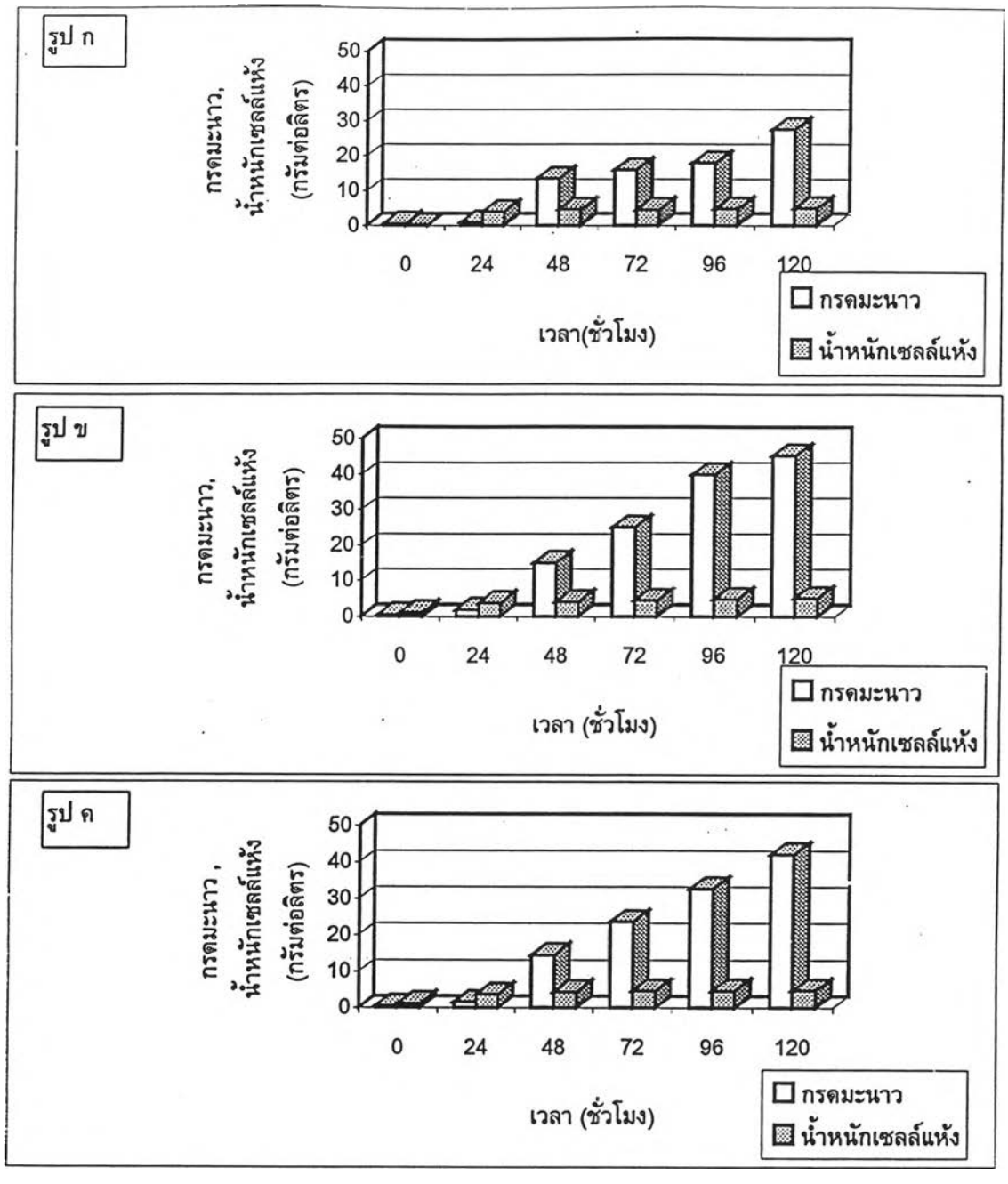
สูตรอาหารสำหรับการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวจากแบคทีเรียที่มีผู้รายงานไว้มีความหลากหลาย(Sardinas and Conn , 1973; Oomori and Suzue, 1973; Suzuki *et al*, 1974; Kimura and Nakanishi, 1975) และองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้สำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีรายงานไว้นั้นมีความคล้ายคลึงกับที่มีอยู่ในสูตรอาหาร BM ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้สูตรอาหาร BM ที่ได้ปรับปรุงแล้วจากข้อ 3.2 แต่ให้มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 100 กรัมต่อลิตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารควบคุมความเป็นกรดเป็นด่าง 50 กรัมต่อลิตร (Suzuki *et al*, 1974) (ภาคผนวก ก 2.1) เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลองเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวได้ดีไปพร้อมกับการหาอายุที่เหมาะสมของหัวเชื้อตั้งต้นด้วย ใช้อายุหัวเชื้อที่ระยะก่อนระยะกึ่งกลางทวีคูณ (early log phase) ระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase) และระยะหลังจากระยะกึ่งกลางทวีคูณ (late log phase) โดยทำการทดลองทั้งสองเชื้อ คือ *B. subtilis* ATCC 21610 และ *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.2 แล้วว่าสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 มีระยะก่อนระยะกึ่งกลางทวีคูณ, ระยะกึ่งกลางทวีคูณ และระยะหลังจากระยะกึ่งกลางทวีคูณ เป็น 6 ชั่วโมง, 8 ชั่วโมง และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วน *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 เป็น 4 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ ผลการทดลองดังตารางที่ 3-10, 3-11 และรูปที่ 3-10, 3-11 จากผลการทดลองพบว่าการผลิตกรดมะนาวที่ใช้หัวเชื้อที่มีอายุอยู่ช่วงระยะกึ่งกลางทวีคูณให้ผลการผลิตกรดมะนาวสูงสุด และการใช้หัวเชื้อที่มีอายุอยู่ในช่วงการเจริญที่ระยะหลังระยะกึ่งกลางทวีคูณให้ผลการผลิตกรดมะนาวรองลงมา และการใช้หัวเชื้อที่มีอายุอยู่ในช่วงการเจริญที่ระยะก่อนระยะกึ่งกลางทวีคูณ ให้ผลการผลิตกรดมะนาวต่ำสุด โดย *B. subtilis* ATCC 21610 ที่อายุหัวเชื้ออยู่ในระยะการเจริญกึ่งกลางทวีคูณ สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 45.17 กรัมต่อลิตร ที่ 120 ชั่วโมง ส่วน *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 ที่อายุหัวเชื้ออยู่ในช่วงระยะการเจริญกึ่งกลางทวีคูณ สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 35.45 กรัมต่อลิตรที่ 120 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงจะใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 21610 เป็นแบคทีเรียเพื่อใช้ในการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรียต่อไป โดยใช้อายุหัวเชื้อที่ระยะการเจริญกึ่งกลางทวีคูณ 8 ชั่วโมง เนื่องจากให้ผลการผลิตกรดมะนาวดีกว่า *Brevibacterium flavum* ATCC 21682

ตารางที่ 3-10 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เพื่อผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้หัวเชื้อที่เวลา 6, 8 และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ

| อายุหัวเชื้อ (ชั่วโมง) | เวลา (ชั่วโมง) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | 0 | 7.90 | 0.09 | 0.48 | 86.96 | - |
| | 24 | 7.16 | 3.84 | 0.94 | 62.65 | 1.89 |
| | 48 | 6.95 | 4.46 | 13.43 | 36.96 | 25.90 |
| | 72 | 7.05 | 4.44 | 15.94 | 30.57 | 27.41 |
| | 96 | 6.95 | 4.74 | 20.96 | 24.65 | 32.86 |
| | 120 | 6.97 | 4.80 | 27.42 | 15.76 | 37.83 |
| 8 | 0 | 7.84 | 1.14 | 0.48 | 86.96 | - |
| | 24 | 6.89 | 3.61 | 1.84 | 57.70 | 4.64 |
| | 48 | 6.84 | 3.95 | 15.00 | 43.12 | 33.12 |
| | 72 | 6.87 | 4.38 | 25.00 | 28.84 | 42.18 |
| | 96 | 6.75 | 4.69 | 39.80 | 20.16 | 58.86 |
| | 120 | 6.75 | 4.70 | 45.17 | 13.96 | 61.21 |
| 9 | 0 | 7.60 | 1.22 | 0.48 | 86.96 | - |
| | 24 | 6.83 | 3.68 | 1.63 | 61.27 | 4.47 |
| | 48 | 6.98 | 4.40 | 14.48 | 30.35 | 36.47 |
| | 72 | 6.82 | 4.63 | 23.61 | 24.25 | 36.88 |
| | 96 | 6.79 | 4.72 | 32.64 | 20.52 | 48.40 |
| | 120 | 6.76 | 4.75 | 42.81 | 12.47 | 56.82 |

หมายเหตุ ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) = [(P1-P0)/(S0-S1)] x 100

คือ $\frac{\text{กรดมะนาวที่ได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)}}$ x 100



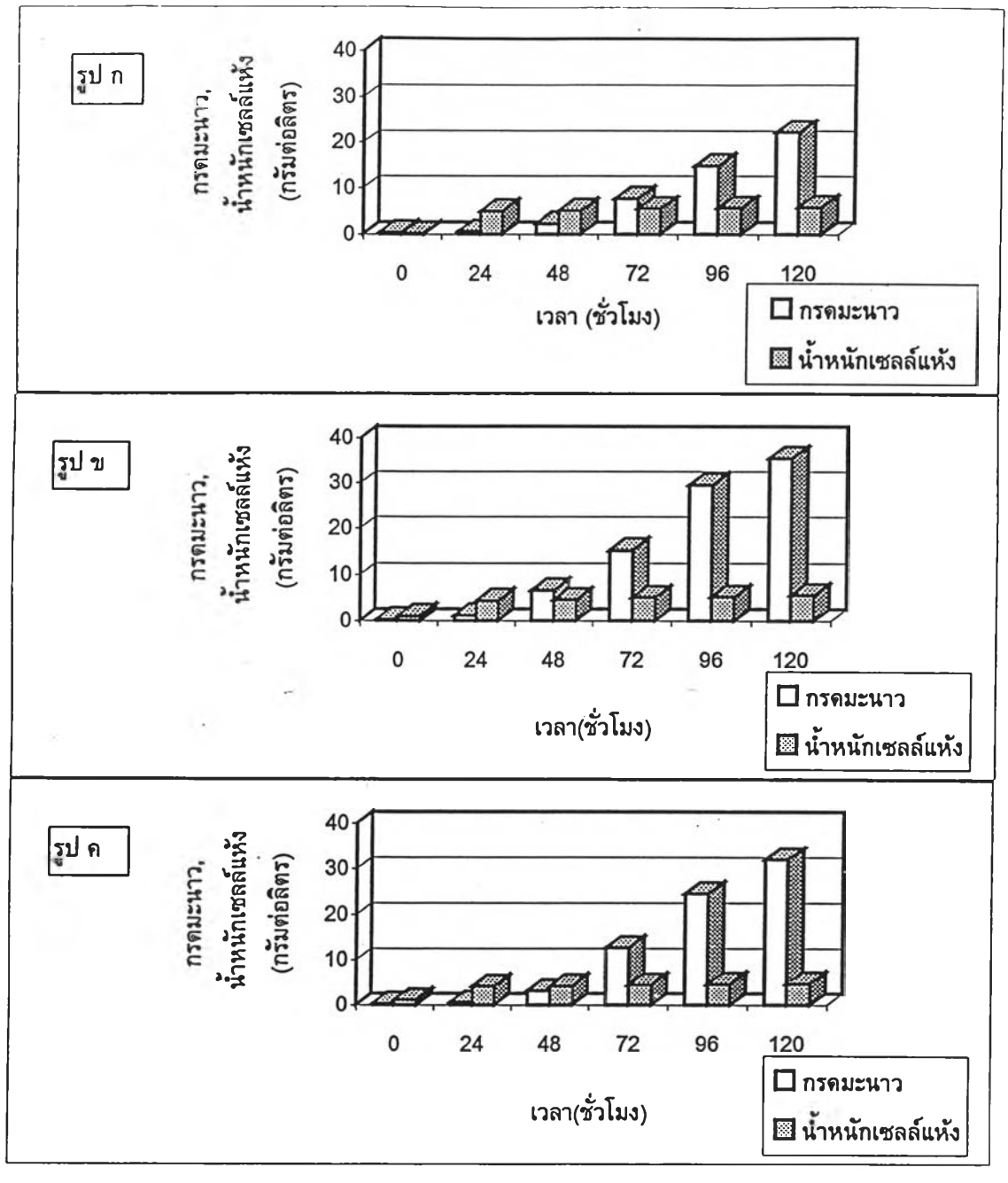

<u>รูปที่ 3-10</u> ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการหมักโดยเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อมีอายุหัวเชื้อเป็น 6(รูปก) 8(รูปข) 9 ชั่วโมง(รูปค)ตามลำดับ

ตารางที่ 3-11 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 เพื่อผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้หัวเชื้อที่เวลา 4, 6 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ

| อายุหัวเชื้อ (ชั่วโมง) | เวลา (ชั่วโมง) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 0 | 7.93 | 0.12 | 0.35 | 86.96 | - |
| | 24 | 7.03 | 4.92 | 0.57 | 69.84 | 0.70 |
| | 48 | 6.89 | 5.04 | 2.27 | 43.76 | 4.44 |
| | 72 | 6.94 | 5.46 | 7.67 | 36.75 | 14.57 |
| | 96 | 6.90 | 5.60 | 14.80 | 32.57 | 26.56 |
| | 120 | 6.90 | 5.80 | 22.14 | 31.60 | 39.28 |
| 6 | 0 | 7.88 | 1.08 | 0.35 | 86.96 | - |
| | 24 | 6.89 | 4.36 | 1.24 | 60.17 | 3.02 |
| | 48 | 6.77 | 4.56 | 6.64 | 41.00 | 13.68 |
| | 72 | 6.80 | 5.09 | 15.28 | 28.06 | 25.34 |
| | 96 | 6.76 | 5.22 | 29.55 | 25.80 | 47.74 |
| | 120 | 6.76 | 5.26 | 35.45 | 20.65 | 58.96 |
| 8 | 0 | 7.80 | 1.18 | 0.35 | 86.96 | - |
| | 24 | 6.90 | 4.22 | 0.66 | 65.76 | 1.46 |
| | 48 | 6.87 | 4.28 | 3.21 | 43.00 | 6.50 |
| | 72 | 6.65 | 4.47 | 12.67 | 29.40 | 21.40 |
| | 96 | 6.67 | 4.64 | 24.56 | 25.65 | 39.48 |
| | 120 | 6.65 | 4.80 | 32.02 | 20.42 | 47.59 |

หมายเหตุ ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) = $[(P1-P0)/(S0-S1)] \times 100$

คือ $\frac{\text{กรดมะนาวที่ได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)}} \times 100$



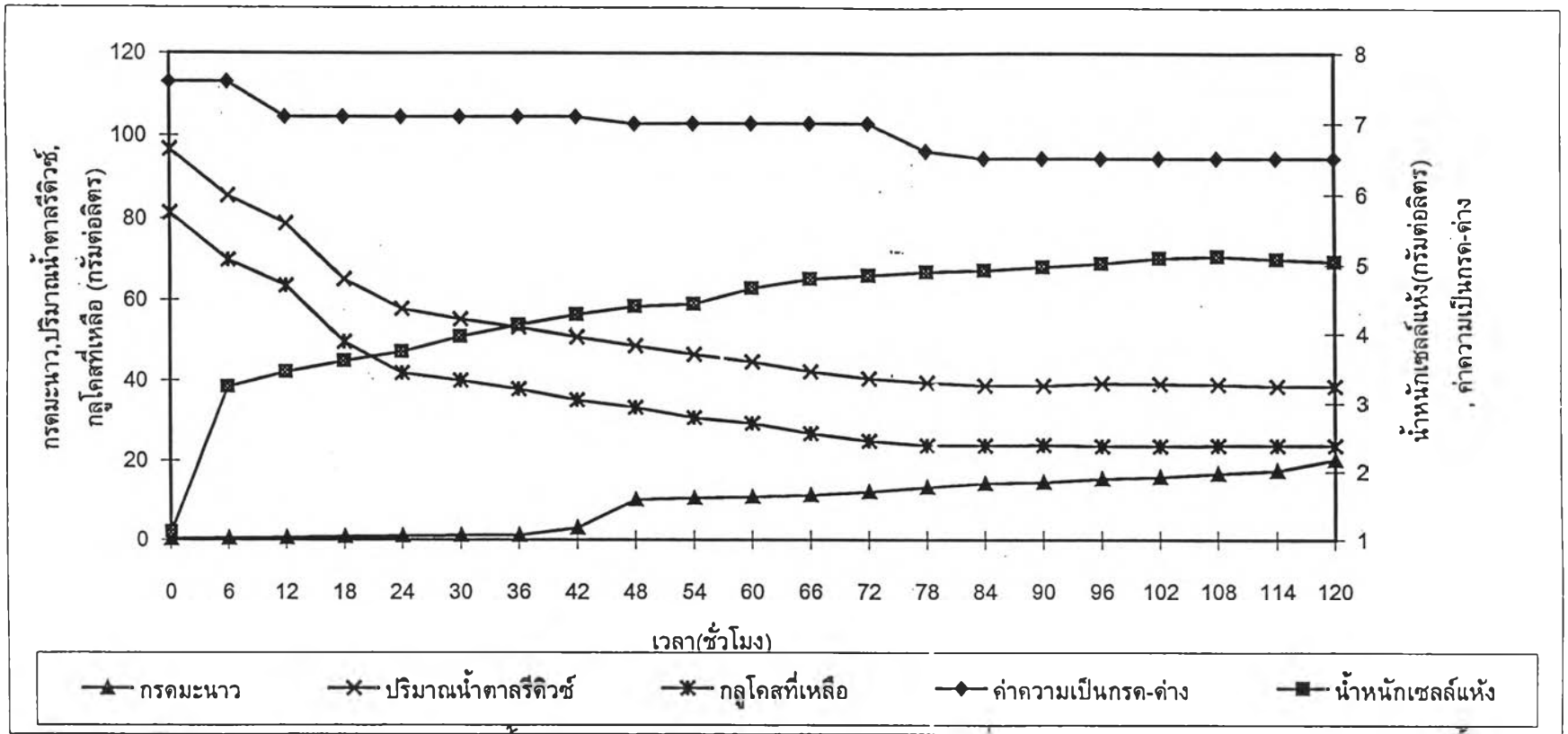

<u>รูปที่ 3-11</u> ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการหมักโดยเชื้อ *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อมีอายุหัวเชื้อเป็น 4(รูปก) 6(รูปข) และ8 ชั่วโมง(รูปค)ตามลำดับ

3.4 การเจริญและการผลิตกรดมะนาวของ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนในระดับขวดเขย่า

จากการทดลองที่ 3.3 พบว่า *B. subtilis* ATCC 21610 สามารถผลิตกรดมะนาวได้มากกว่า *Brevibacterium flavum* ATCC 21682 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะใช้ *B. subtilis* ATCC 21610 ในการศึกษาและหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวต่อไป ในรายงานวิจัยนี้ มุ่งเน้นศึกษาการผลิตกรดมะนาวจากแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์ (hydrolysed starch)ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงทำการเลี้ยง *B. subtilis* ATCC 21610 เพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตกรดมะนาวในอาหารสูตร BM ที่ปรับปรุงแล้วตามการทดลองที่ 3.2 (ภาคผนวก ก 2.1) และเปลี่ยนจากน้ำตาลกลูโคสเป็นแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้ว (ภาคผนวก ก 2.2 ) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่มีระดับน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ใช้หัวเชื้อที่อายุ 8 ชั่วโมงเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 120 ชั่วโมง หาน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน ตามวิธีการข้อ 2.4.3 , 2.4.4, 2.4.5 และ 2.4.6 ตามลำดับ ผลการทดลองดังตารางที่ 3-12 และรูปที่ 3-12 จากผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* ATCC 21610 มีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในระหว่างชั่วโมงที่ 0-60 หลังจากนั้นการเจริญค่อนข้างคงที่ จนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 5.12 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการหมักเชื้อผลิตกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้นหลังจาก 48 ชั่วโมง และปริมาณกรดมะนาวสูงขึ้นเรื่อยๆ จนเป็น 20.24 กรัมต่อลิตรที่ 120 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตกรดมะนาวร้อยละ 34.53 การเพิ่มขึ้นของกรดมะนาวสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และจากผลการวิเคราะห์น้ำตาลที่ได้พบว่าค่าความแตกต่างของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลกลูโคสค่อนข้างคงที่ตลอดการหมัก แสดงว่าเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 จะไม่ใช้สารที่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ชนิดอื่นในขณะที่ยังมีกลูโคสอยู่

ตารางที่ 3-12 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เพื่อผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 7.6 | 1.12 | 0.28 | 96.70 | 81.47 | - |
| 6 | 7.6 | 3.24 | 0.47 | 85.65 | 69.76 | 1.62 |
| 12 | 7.1 | 3.46 | 0.55 | 78.86 | 63.57 | 1.51 |
| 18 | 7.1 | 3.62 | 0.79 | 65.06 | 49.60 | 1.60 |
| 24 | 7.1 | 3.75 | 1.04 | 57.80 | 41.93 | 1.92 |
| 30 | 7.1 | 3.97 | 1.11 | 55.20 | 39.96 | 1.99 |
| 36 | 7.1 | 4.14 | 1.12 | 53.25 | 37.83 | 1.92 |
| 42 | 7.1 | 4.29 | 2.97 | 50.82 | 35.13 | 5.80 |
| 48 | 7.0 | 4.40 | 10.13 | 48.66 | 33.29 | 20.44 |
| 54 | 7.0 | 4.44 | 10.59 | 46.51 | 30.69 | 20.30 |
| 60 | 7.0 | 4.66 | 10.87 | 44.55 | 29.19 | 20.25 |
| 66 | 7.0 | 4.80 | 11.29 | 42.09 | 26.73 | 20.09 |
| 72 | 7.0 | 4.85 | 12.20 | 40.42 | 24.79 | 21.03 |
| 78 | 6.6 | 4.90 | 13.30 | 39.40 | 23.70 | 22.53 |
| 84 | 6.5 | 4.92 | 14.31 | 38.70 | 23.61 | 24.24 |
| 90 | 6.5 | 4.97 | 14.66 | 38.76 | 23.82 | 24.94 |
| 96 | 6.5 | 5.02 | 15.46 | 39.22 | 23.52 | 26.19 |
| 102 | 6.5 | 5.10 | 15.96 | 39.18 | 23.58 | 27.08 |
| 108 | 6.5 | 5.12 | 16.74 | 39.02 | 23.61 | 28.44 |
| 114 | 6.5 | 5.08 | 17.47 | 38.61 | 23.64 | 29.72 |
| 120 | 6.5 | 5.05 | 20.24 | 38.51 | 23.67 | 34.53 |




รูปที่ 3-12 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง,น้ำหนักเซลล์แห้ง,ปริมาณกรดมะนาว,น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เพื่อผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

3.5 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวของ *B. subtilis* ATCC 21610 ในระดับขวดเขย่า ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน

3.5.1 ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตกรดมะนาว

เนื่องจากการสะสมกรดมะนาวจะสะสมหลังจากแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้หมดแล้ว ดังนั้นจะต้องควบคุมสารแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อให้พอเหมาะกับการเจริญเท่านั้น (Mckay *et al*, 1994; Sokolov *et al*, 1996) ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งไนโตรเจน 2 แหล่งคือ อนินทรีย์ไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต และอินทรีย์ไนโตรเจนคือสารสกัดจากยีสต์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ในการผลิตกรดมะนาวโดยเลี้ยง *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก 2.3) แปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ระดับ 1, 2, 3 และ 4 กรัมต่อลิตร เก็บผลทุกวัน เป็นเวลา 3 วัน (เนื่องจากในการทดลองที่ผ่านมาปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมักวันที่ 3 และวันที่ 5 ไม่แตกต่างกันมากนัก) ผลการทดลองดังตารางที่ 3-13 และ รูปที่ 3-13 จากผลการทดลองพบว่า เมื่อปริมาณสารสกัดจากยีสต์เพิ่มขึ้น การผลิตกรดมะนาวลดลงโดยในการทดลองนี้สารสกัดจากยีสต์ 1 กรัมต่อลิตรให้ผลการผลิตกรดมะนาวมากที่สุด ที่ 72 ชั่วโมงเท่ากับ 19.65 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงทำการลดปริมาณสารสกัดจากยีสต์ลงอีกเป็น 0, 0.25, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังตารางที่ 3-14 และรูปที่ 3-14 จากผลการทดลองจะเห็นว่าให้ผลคล้ายกันกับการทดลองที่ผ่านมา เมื่อปริมาณสารสกัดจากยีสต์เพิ่มมากขึ้น จะทำให้การเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้น แต่การผลิตกรดมะนาวจะลดลง แสดงว่าเมื่อมีสารสกัดจากยีสต์มาก เชื้อจะใช้น้ำตาลไปเพื่อการเจริญ มากกว่าที่จะผลิตกรดมะนาว และอาหารที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ ให้ผลการผลิตกรดมะนาวดีที่สุด คือ 25.30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 41.20 ที่ 72 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เพื่อใช้ในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 3-13 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ตั้งแต่ 1-4 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

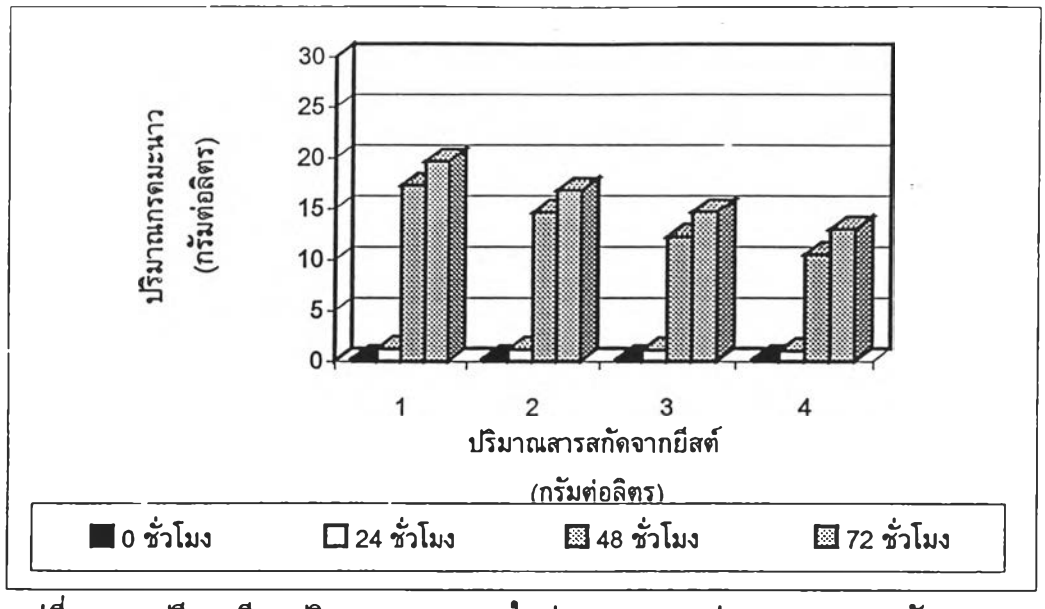
| ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร) | เวลา (ชั่วโมง) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี เพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 7.5 | 1.14 | 0.33 | - | 86.32 | 0 |
| | 24 | 7.3 | 3.04 | 1.23 | - | 63.30 | 2.72 |
| | 48 | 7.3 | 3.16 | 17.27 | - | 46.75 | 31.62 |
| | 72 | 7.2 | 3.32 | 19.65 | 20.45 | 34.50 | 31.25 |
| 2 | 0 | 7.5 | 1.14 | 0.33 | - | 86.32 | 0 |
| | 24 | 7.3 | 3.18 | 1.17 | - | 60.42 | 2.33 |
| | 48 | 7.3 | 3.74 | 14.62 | - | 45.40 | 28.06 |
| | 72 | 7.2 | 3.98 | 16.77 | 17.57 | 34.60 | 26.63 |
| 3 | 0 | 7.5 | 1.14 | 0.33 | - | 86.32 | 0 |
| | 24 | 7.3 | 3.58 | 1.08 | - | 63.32 | 2.27 |
| | 48 | 7.3 | 3.90 | 12.23 | - | 46.50 | 23.88 |
| | 72 | 7.2 | 4.36 | 14.65 | 16.16 | 34.50 | 23.16 |
| 4 | 0 | 7.4 | 1.14 | 0.33 | - | 86.32 | 0 |
| | 24 | 7.3 | 3.71 | 1.05 | - | 65.80 | 2.35 |
| | 48 | 7.3 | 4.48 | 10.53 | - | 46.65 | 19.00 |
| | 72 | 7.2 | 4.84 | 12.97 | 14.08 | 32.55 | 19.82 |

หมายเหตุ "-" หมายถึงไม่มีผล เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC เป็นการตรวจซ้ำ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในทุกช่วงเวลา

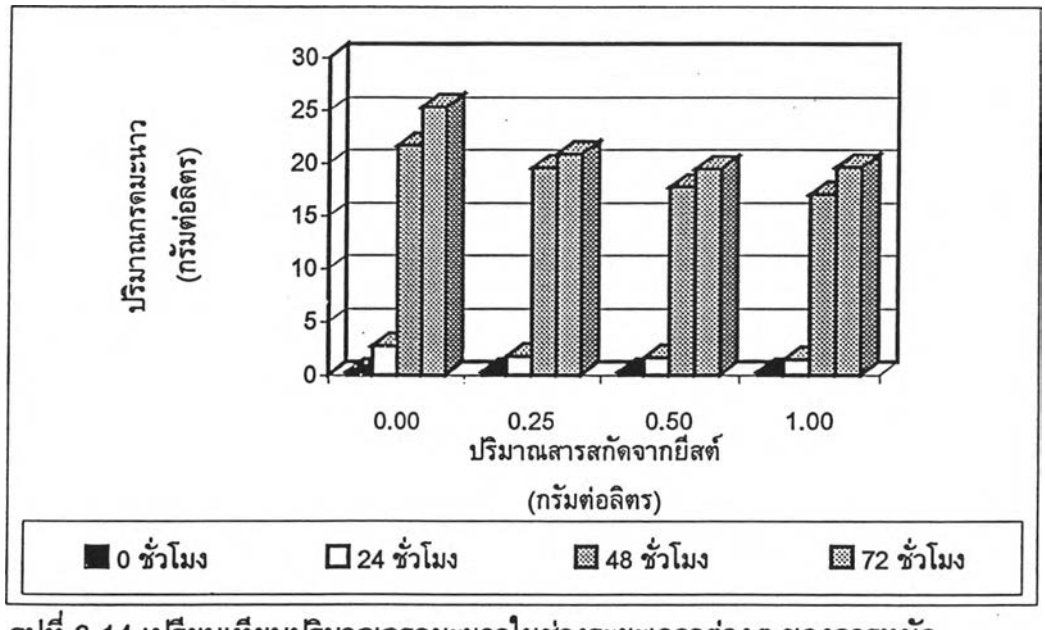
ตารางที่ 3-14 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ตั้งแต่ 0-1 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

| ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร) | เวลา (ชั่วโมง) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 7.4 | 1.14 | 0.74 | - | 85.32 | 0 |
| | 24 | 7.3 | 2.43 | 2.74 | - | 58.62 | 7.57 |
| | 48 | 7.0 | 2.92 | 21.64 | - | 32.00 | 39.19 |
| | 72 | 7.0 | 3.02 | 25.30 | 24.93 | 24.35 | 40.28 |
| 0.25 | 0 | 7.4 | 1.13 | 0.743 | - | 85.32 | 0 |
| | 24 | 7.4 | 2.86 | 1.74 | - | 57.52 | 4.26 |
| | 48 | 7.0 | 3.06 | 19.53 | - | 38.60 | 36.39 |
| | 72 | 7.0 | 3.10 | 20.81 | 21.61 | 35.10 | 33.43 |
| 0.50 | 0 | 7.4 | 1.13 | 0.74 | - | 85.32 | 0 |
| | 24 | 7.4 | 3.02 | 1.61 | - | 58.12 | 3.94 |
| | 48 | 7.3 | 3.08 | 17.69 | - | 38.45 | 32.81 |
| | 72 | 7.2 | 3.20 | 19.44 | 17.80 | 38.45 | 31.37 |
| 1.0 | 0 | 7.4 | 1.14 | 0.74 | - | 87.32 | 0 |
| | 24 | 7.4 | 3.07 | 1.42 | - | 58.27 | 3.36 |
| | 48 | 7.3 | 3.20 | 17.04 | - | 38.60 | 31.67 |
| | 72 | 7.3 | 3.48 | 19.62 | 17.61 | 38.30 | 31.59 |

หมายเหตุ "-" หมายถึงไม่มีผล เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC เป็นการตรวจซ้ำ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในทุกช่วงเวลา




รูปที่ 3-13 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ตั้งแต่ 1-4 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน




รูปที่ 3-14 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ตั้งแต่ 0-1 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

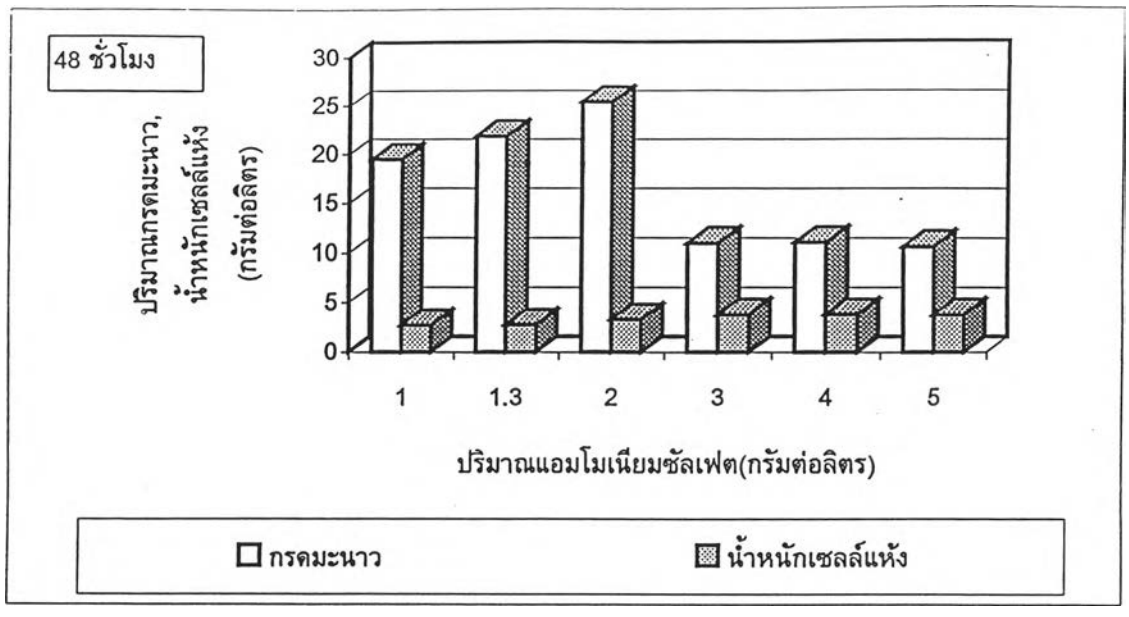
3.5.2 ผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตกรดมะนาว

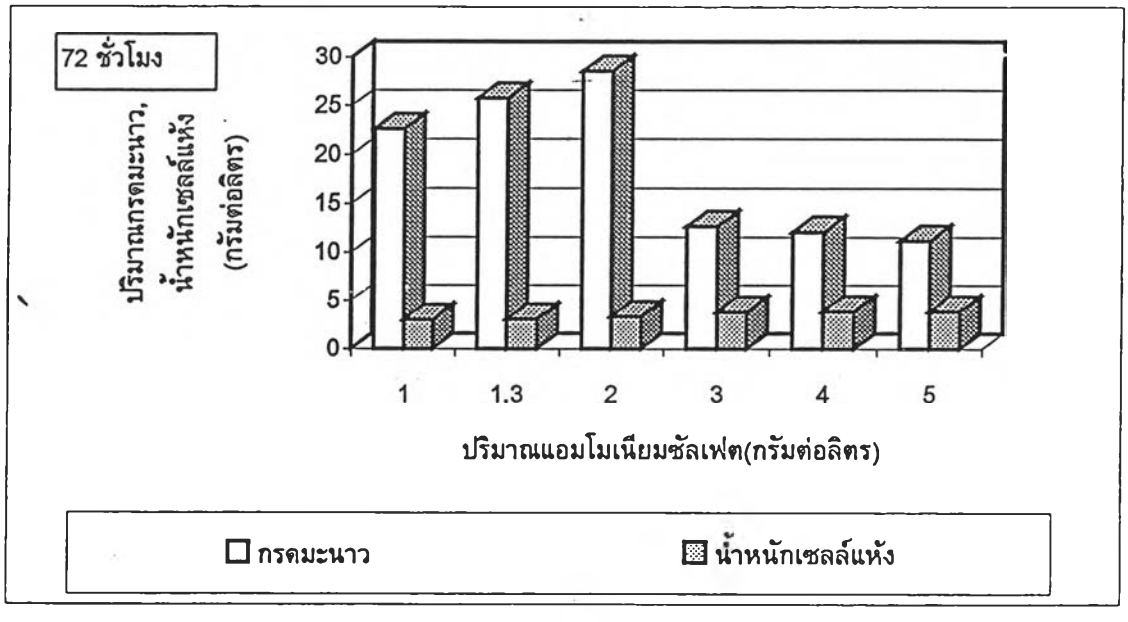
แหล่งไนโตรเจนในอาหาร BM มี 2 แหล่งคือ สารสกัดจากยีสต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) จากการทดลองในข้อ 3.5.1 พบว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรียมาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยง *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.4) โดยใช้ภาวะที่ได้จากข้อ 3.5.1 ทำการแปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ตั้งแต่ 1, 1.3 (ปริมาณที่ใช้อยู่เดิม), 2, 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร เก็บผลที่ระยะเวลาการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมง (เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่เชื้อเริ่มผลิตกรดมะนาวคงที่) ผลการทดลองดังตารางที่ 3-15 และรูปที่ 3-15 พบว่าเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มขึ้นหรือปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น และเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตมากกว่า 2 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดมะนาวลดลง โดยที่แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรหรือที่ปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.424 กรัมต่อลิตร ให้ผลการผลิตดีที่สุดที่ 72 ชั่วโมง เป็น 28.51 กรัมต่อลิตรคิดเป็นร้อยละ 42.52 ดังนั้นในการทดลอง ต่อไปจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ในการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตต่อไป

ตารางที่ 3-15 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต[$(NH_4)_2SO_4$] ตั้งแต่ 1-5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 48 | 1 | 0.212 | 7.0 | 2.69 | 19.46 | - | 32.61 | 34.29 |
| | 1.3 | 0.275 | 7.0 | 2.74 | 21.89 | - | 32.00 | 38.23 |
| | 2 | 0.424 | 7.0 | 3.28 | 25.40 | - | 30.24 | 43.10 |
| | 3 | 0.636 | 7.0 | 3.76 | 11.02 | - | 33.60 | 19.51 |
| | 4 | 0.848 | 7.0 | 3.80 | 11.11 | - | 31.92 | 19.09 |
| | 5 | 1.060 | 7.0 | 3.78 | 10.69 | - | 31.11 | 18.09 |
| 72 | 1 | 0.212 | 7.0 | 3.04 | 22.60 | 21.52 | 24.41 | 34.80 |
| | 1.3 | 0.275 | 7.0 | 3.08 | 25.72 | 24.93 | 24.35 | 36.25 |
| | 2 | 0.424 | 7.0 | 3.34 | 28.51 | 27.56 | 22.13 | 42.52 |
| | 3 | 0.636 | 7.0 | 3.83 | 12.65 | 13.69 | 32.70 | 22.23 |
| | 4 | 0.848 | 7.0 | 3.87 | 12.11 | 12.57 | 31.38 | 20.06 |
| | 5 | 1.060 | 7.0 | 3.88 | 11.20 | 11.00 | 30.95 | 18.93 |

หมายเหตุ "-" หมายถึงไม่มีผล เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC เป็นการตรวจซ้ำ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในทุกช่วงเวลา




<u>รูปที่ 3-15</u> เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งที่หมักโดย *B.subtili* ATCC 21610เมื่อมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตั้งแต่ 1.0-5.0 กรัมต่อลิตร ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

3.5.3 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว

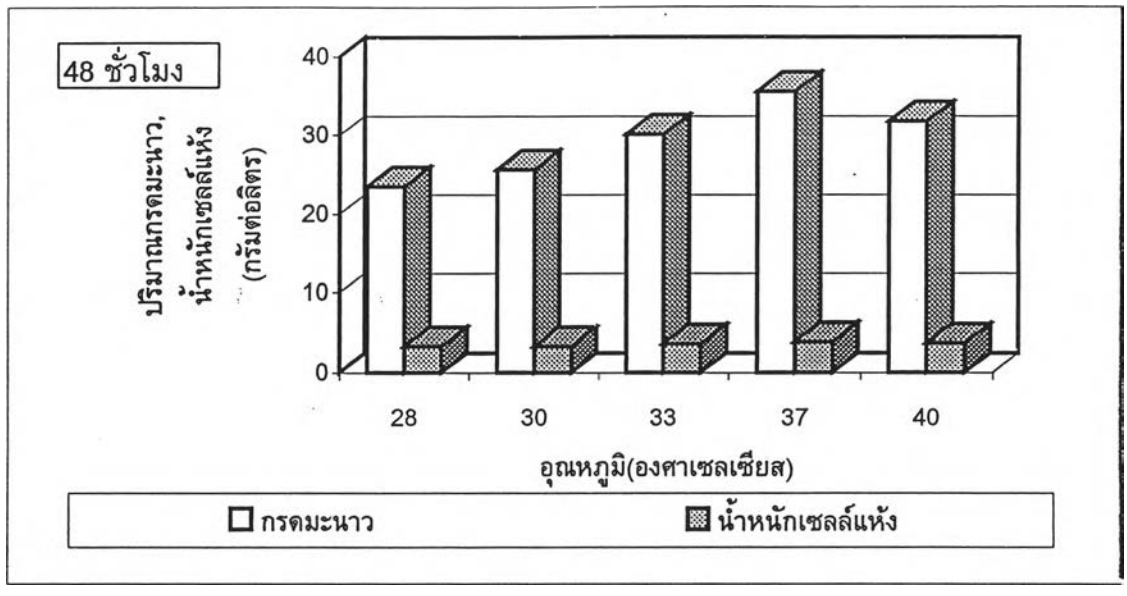
จากการทดลองที่ผ่านมาใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้โดยมากในการผลิตกรดมะนาวจากแบคทีเรีย (Oomori and Suzue, 1973) แต่ยังมีรายงานว่าสามารถผลิตกรดมะนาวด้วยแบคทีเรียได้ที่ 28 และ 37 องศาเซลเซียส (Sardinas and Conn, 1973; Suzuki *et al*, 1974) และจากรายงานการผลิตกรดมะนาวจากยีสต์นั้น อุณหภูมิมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวมาก คือเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตมากขึ้นการผลิตกรดมะนาวจะลดลง (Nakanishi *et al*, 1972; Furukawa *et al*, 1977) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดมะนาวโดย *B. subtilis* ATCC 21610 ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้ภาวะที่ได้จากข้อ 3.5.2 แปรผันอุณหภูมิที่ 28, 30, 33, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เก็บผลที่ระยะเวลาการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองดังตารางที่ 3-16 และรูปที่ 3-16 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *B. subtilis* ATCC 21610 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีที่สุด คือ 38.60 กรัมต่อลิตรที่ 72 ชั่วโมง

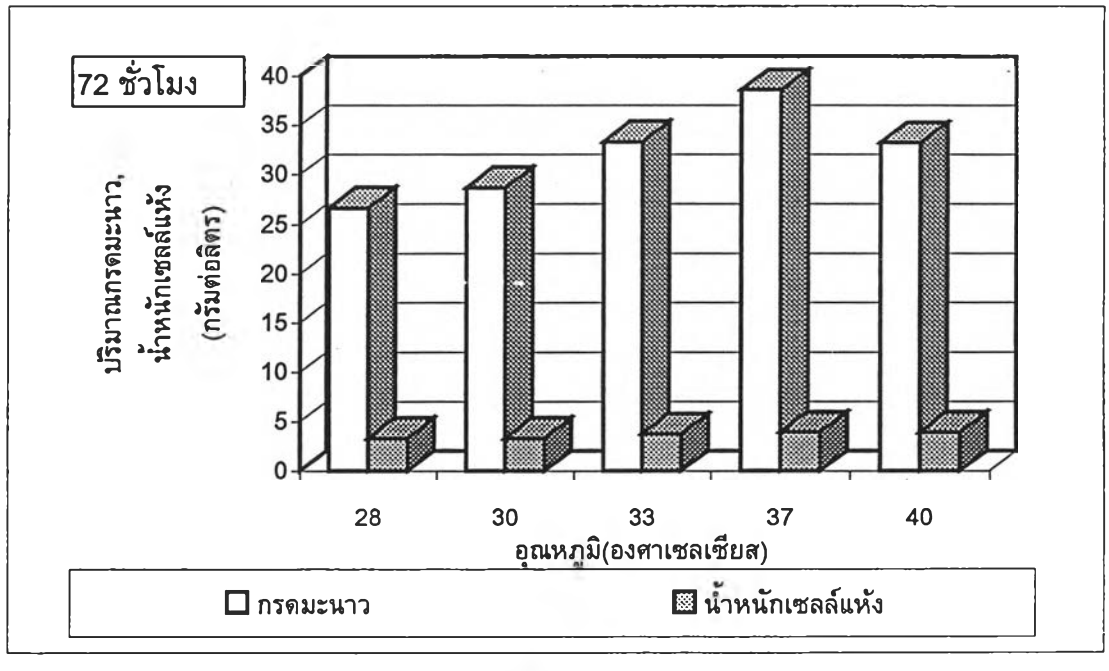
ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 3-16 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 ที่อุณหภูมิการหมักเป็น 28, 30, 33, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 48 | 28 | 7.0 | 3.27 | 23.48 | - | 30.18 | 41.73 |
| | 30 | 7.0 | 3.28 | 25.53 | - | 30.06 | 45.54 |
| | 33 | 7.0 | 3.65 | 30.16 | - | 27.56 | 47.40 |
| | 37 | 7.0 | 3.86 | 35.55 | - | 23.26 | 56.96 |
| | 40 | 7.0 | 3.73 | 31.76 | - | 24.37 | 51.26 |
| 72 | 28 | 7.0 | 3.32 | 26.64 | 27.56 | 22.88 | 41.91 |
| | 30 | 7.0 | 3.34 | 28.97 | 30.25 | 22.73 | 45.01 |
| | 33 | 7.0 | 3.76 | 33.34 | 34.93 | 21.05 | 51.09 |
| | 37 | 7.0 | 3.96 | 38.60 | 40.20 | 19.11 | 57.49 |
| | 40 | 7.0 | 3.92 | 33.23 | 33.68 | 21.72 | 50.90 |

หมายเหตุ "-" หมายถึงไม่มีผล เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC เป็นการตรวจซ้ำ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในทุกช่วงเวลา




รูปที่ 3-16 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว และน้ำหนักเซลล์แห้ง ของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ที่อุณหภูมิการหมักเป็น 28,30,33,37 และ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

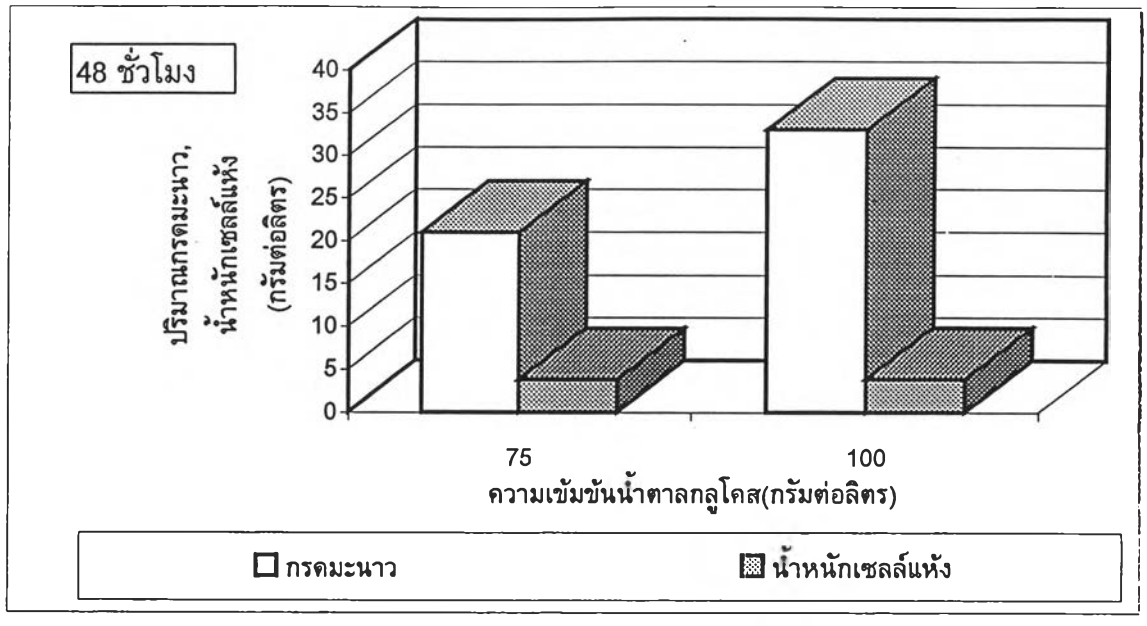
3.5.4 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลต่อการผลิตกรดมะนาว

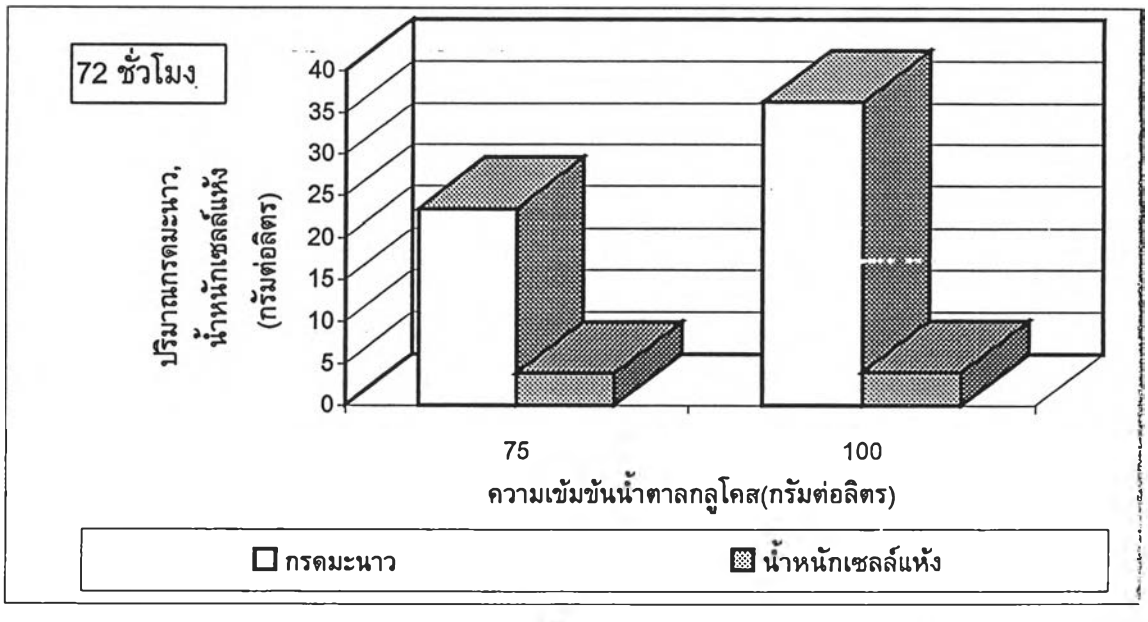
จากผลการทดลองครั้งที่ 3.5.3 อุณหภูมิในการผลิตกรดมะนาวที่ดีที่สุดคือ 37 องศาเซลเซียส ในการทดลองนี้จะศึกษาถึงผลของความเข้มข้นน้ำตาลที่มีต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 จากการทดลองที่ผ่านมา ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร แล้วพบว่ามีน้ำตาลเหลือหลังการหมักอยู่มาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้ว) เป็น 75 และ 100 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก 2.5) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3-17 และรูปที่ 3-17 พบว่าปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น จะทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากขึ้น และปริมาณกรดมะนาวเพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดิมที่ใช้ ให้ผลการผลิตกรดมะนาวดีกว่าที่ระดับ 75 กรัมต่อลิตร โดยผลการผลิตกรดมะนาวเป็น 36.27 กรัมต่อลิตร ที่ 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คิดเป็นร้อยละการผลิตกรดมะนาว 54.88 ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วที่ 100 กรัมต่อลิตร เลี้ยงแบคทีเรียเพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 3-17 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเริ่มต้นในการผลิตเป็น 75 และ 100 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

| เวลา (ชั่วโมง) | ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 48 | 75 | 7.0 | 3.75 | 20.97 | - | 11.46 | 33.85 |
| | 100 | 7.0 | 3.83 | 33.04 | - | 23.67 | 52.46 |
| 72 | 75 | 7.0 | 3.82 | 23.43 | 24.93 | 10.41 | 37.25 |
| | 100 | 7.0 | 3.98 | 36.27 | 35.47 | 20.53 | 54.88 |

หมายเหตุ "-" หมายถึงไม่มีผล เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC เป็นการตรวจซ้ำ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในทุกช่วงเวลา



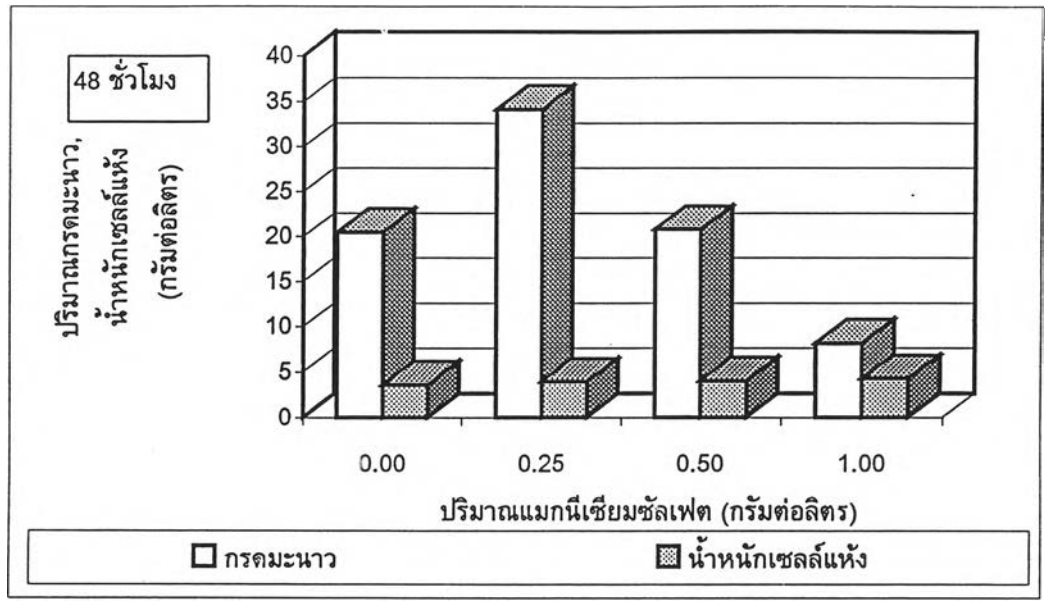

รูปที่ 3-17 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว และน้ำหนักเซลล์แห้งของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเริ่มต้นในการผลิตเป็น 75 และ 100 กรัมต่อลิตรที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

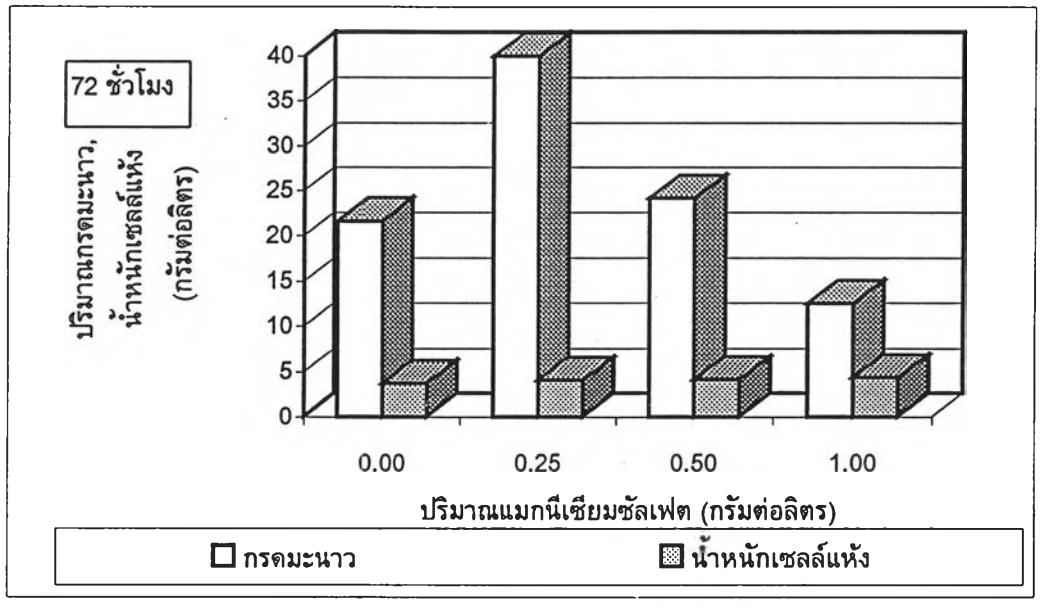
3.5.5 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว

แมกนีเซียมเป็นธาตุที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิดที่สำคัญคือเอนไซม์จำพวก ไคเนส Shimisu และคณะ (1970)ได้รายงานว่าแมกนีเซียมเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการผลิตกรดมะนาว (อ้างถึงใน Abou-Zeid and Ashy, 1984) แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) ที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดมะนาวในการวิจัยนี้ใช้ที่ปริมาณ 0.25 กรัมต่อลิตร แต่เท่าที่มีรายงานการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรียใช้ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่ 0.20-1.00 กรัมต่อลิตร (Sadinas and Conn 1973; Suzuki *et al*, 1974; Oomori and Suzue, 1973; Kimura and Nakanishi, 1975) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาเพื่อหาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเริ่มต้นที่เหมาะสม โดยเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.6) โดยใช้ภาวะที่ได้ในข้อ 3.5.4 แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเริ่มต้นเท่ากับ 0, 0.25, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างที่ 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมัก ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3-18 และรูปที่ 3-18 จากผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* ATCC 21610 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 36.95 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเริ่มต้นเท่ากับ 0.25 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง แต่เนื่องจากปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตที่ 0.25 กรัมต่อลิตรนั้นเป็นปริมาณที่ใช้ต่ำที่สุดที่ให้ผลการผลิตดีที่สุด ดังนั้นจึงทำการทดลองแปรปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตอีกครั้ง โดยแปรที่ 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 และ 0.3 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3-19 และ รูปที่ 3-19 พบว่าปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเพิ่มขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้งและกรดมะนาวเพิ่มขึ้น แต่จะลดลงเมื่อปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตมากกว่า 0.25 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเริ่มต้น 0.25 กรัมต่อลิตรในการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 3-18 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) ในอาหาร 0.00-1.00 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ (กรัมต่อลิตร) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 48 | 0 | 7.0 | 3.59 | 20.46 | 23.86 | 32.08 |
| | 0.25 | 7.0 | 3.90 | 34.13 | 23.70 | 53.75 |
| | 0.50 | 7.0 | 3.99 | 20.79 | 23.81 | 32.58 |
| | 1.00 | 7.0 | 4.26 | 8.18 | 23.65 | 12.46 |
| 72 | 0 | 7.0 | 3.69 | 21.62 | 21.81 | 32.86 |
| | 0.25 | 7.0 | 4.08 | 36.95 | 20.60 | 55.50 |
| | 0.50 | 7.0 | 4.15 | 24.18 | 21.70 | 36.75 |
| | 1.00 | 7.0 | 4.33 | 12.55 | 21.60 | 18.79 |



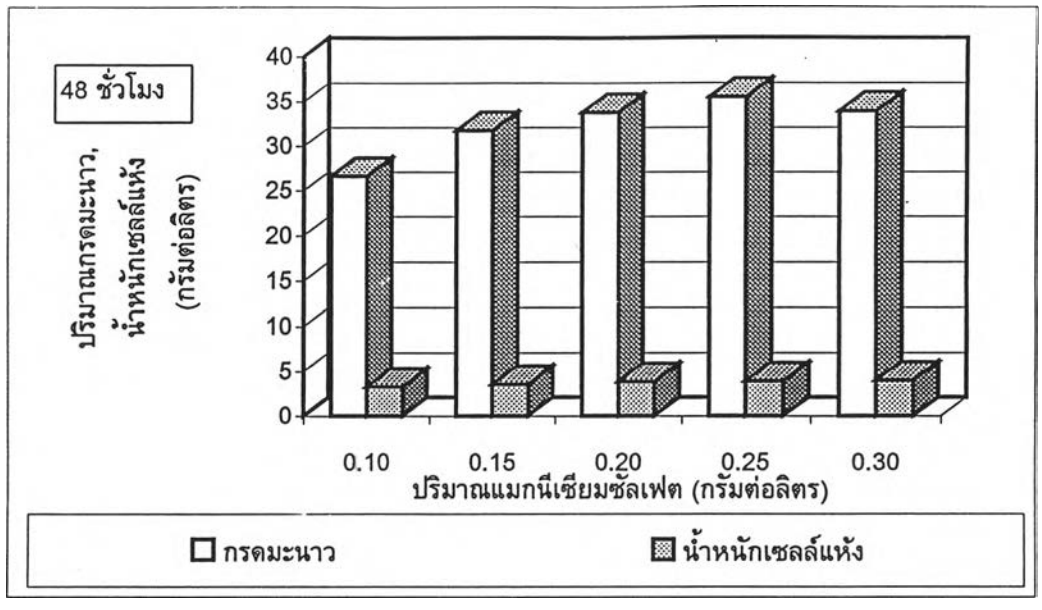



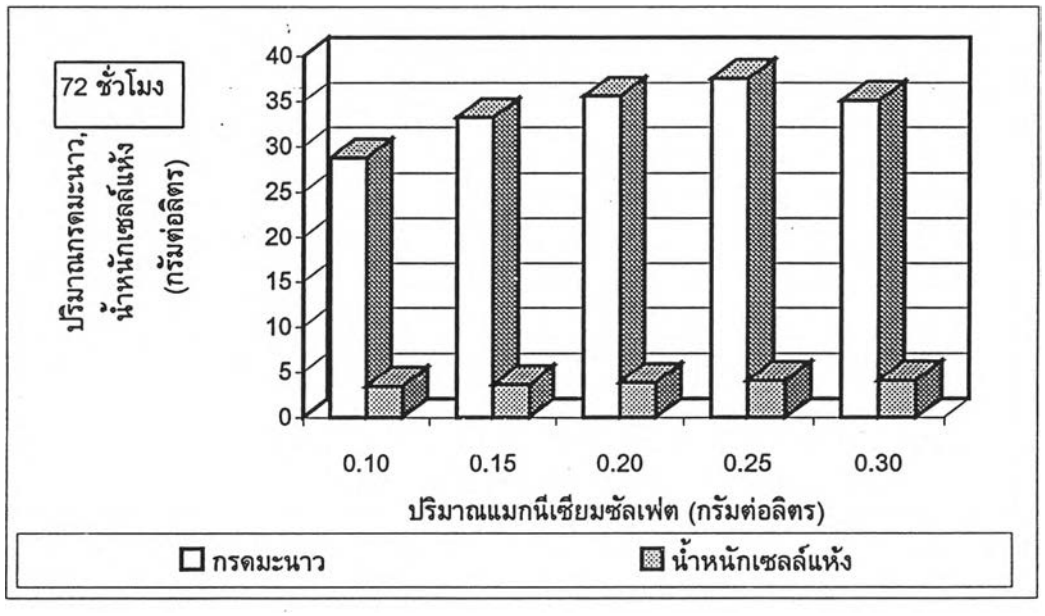

รูปที่ 3-18 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งที่หมักโดย *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหาร 0.00-1.00 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 3-19 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรด ($MgSO_4.7H_2O$) ในอาหาร 0.10-0.30 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ (กรดมะนาว) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 48 | 0.10 | 7.0 | 3.30 | 26.60 | - | 24.31 | 42.59 |
| | 0.15 | 7.0 | 3.58 | 31.72 | - | 23.90 | 50.56 |
| | 0.20 | 7.0 | 3.84 | 33.78 | - | 23.64 | 53.65 |
| | 0.25 | 7.0 | 3.91 | 35.48 | - | 23.95 | 53.44 |
| | 0.30 | 7.0 | 4.01 | 33.95 | - | 22.58 | 53.02 |
| 72 | 0.10 | 7.0 | 3.47 | 28.74 | 27.56 | 22.45 | 44.71 |
| | 0.15 | 7.0 | 3.63 | 33.20 | 33.68 | 21.99 | 55.43 |
| | 0.20 | 7.0 | 3.85 | 35.58 | 36.37 | 22.53 | 55.55 |
| | 0.25 | 7.0 | 4.08 | 37.55 | 36.73 | 20.08 | 56.99 |
| | 0.30 | 7.0 | 4.12 | 35.09 | 36.38 | 20.64 | 53.19 |

หมายเหตุ "-" หมายถึงไม่มีผล เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC เป็นการตรวจซ้ำ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในทุกช่วงเวลา




รูปที่ 3-19 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งที่หมักโดย *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหาร 0.10-0.30 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

3.5.6 ปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสม

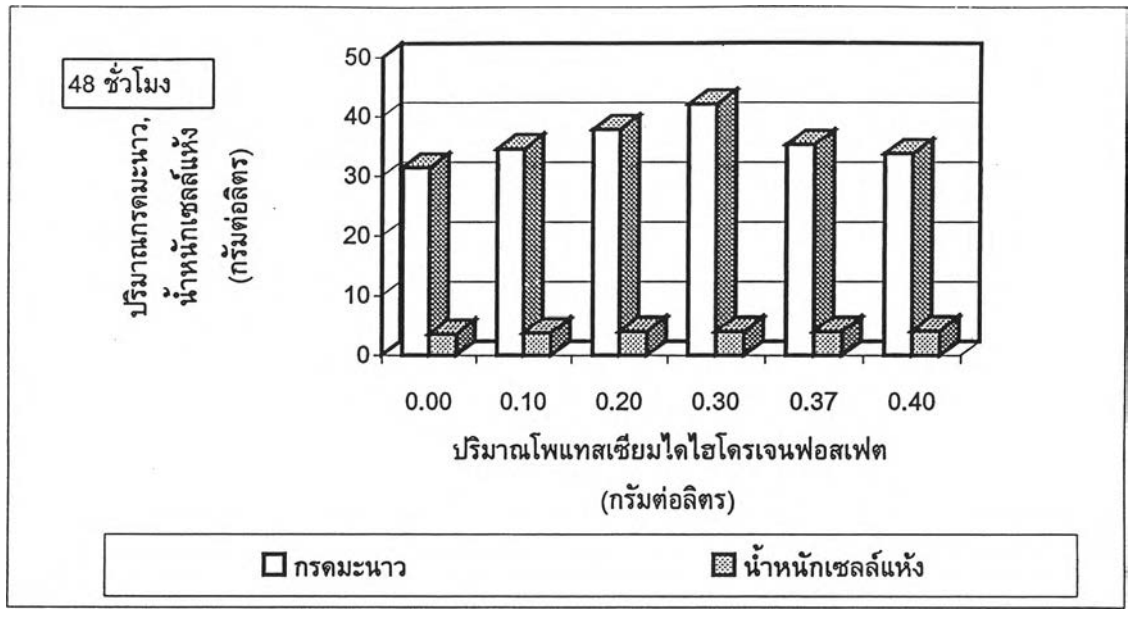
ฟอสฟอรัสเป็นสารที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยแบคทีเรีย เนื่องจาก ฟอสเฟตเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อให้ได้พลังงาน ในการทดลองนี้ได้แปรผันปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) โดยเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.7) โดยใช้ภาวะที่ได้ในข้อ 3.5.5 แปรผันปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเริ่มต้นในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวเป็น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.37 (ปริมาณที่ใช้อยู่เดิม) และ 0.4 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

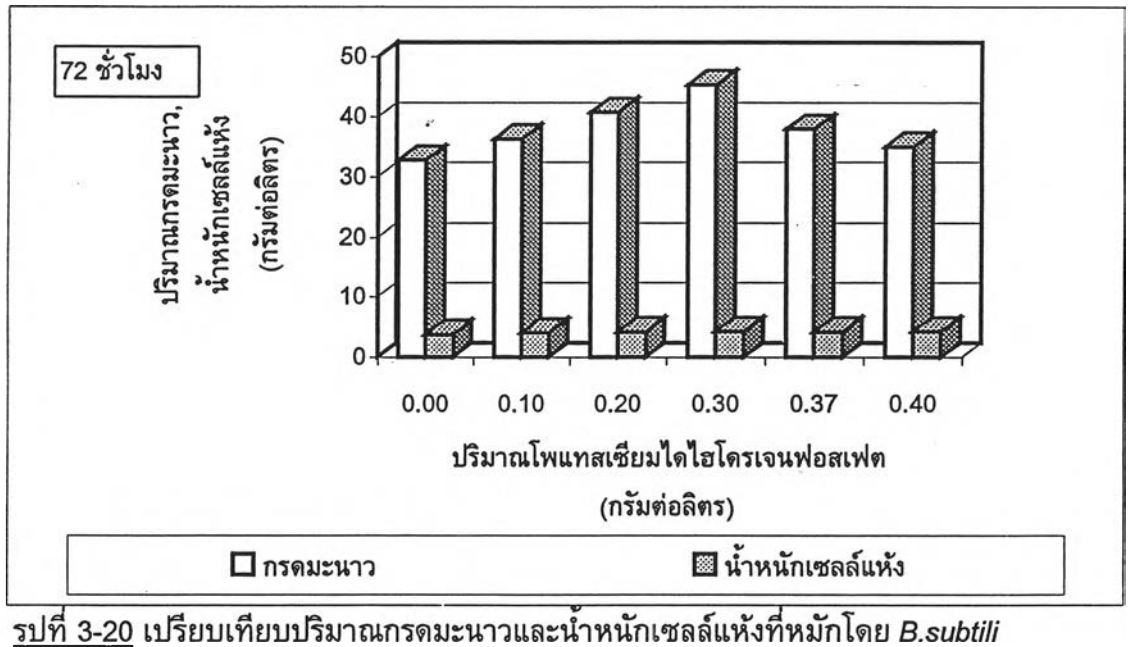
ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3-20 และรูปที่ 3-20 จากผลการทดลองพบว่าปริมาณ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 โดยการผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเพิ่มขึ้น แต่จะลดลงเมื่อปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมากเกิน 0.3 กรัมต่อลิตร ที่ 72 ชั่วโมงเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ในอาหารที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเริ่มต้นที่ 0.3 กรัมต่อลิตร เป็น 45.35 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตกรดมะนาวร้อยละ 62.84 จะเห็นว่าปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดย *B. subtilis* ATCC 21610 มาก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังการหมักลดลงด้วย แสดงว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลเพื่อการผลิตกรดมะนาวได้ดีขึ้น จึงเลือกใช้ปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเริ่มต้นที่ 0.3 กรัมต่อลิตร สำหรับเป็นแหล่งของฟอสเฟตในการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 3-20 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) ในอาหารเริ่มต้น 0.00-0.40 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณ $KH_2PO_4$ (กรัมต่อลิตร) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 48 | 0 | 7.0 | 3.66 | 31.39 | - | 29.00 | 53.75 |
| | 0.1 | 7.0 | 3.88 | 34.65 | - | 25.92 | 56.38 |
| | 0.2 | 7.0 | 4.12 | 37.89 | - | 21.71 | 57.72 |
| | 0.3 | 7.0 | 4.12 | 42.13 | - | 17.56 | 60.38 |
| | 0.37 | 7.0 | 4.07 | 35.34 | - | 23.22 | 55.08 |
| | 0.4 | 7.0 | 4.16 | 33.83 | - | 24.04 | 53.39 |
| 72 | 0 | 7.0 | 3.68 | 32.79 | 33.68 | 27.46 | 54.71 |
| | 0.1 | 7.0 | 3.98 | 36.25 | 38.85 | 23.28 | 56.36 |
| | 0.2 | 7.0 | 4.14 | 40.76 | 41.36 | 19.93 | 60.47 |
| | 0.3 | 7.0 | 4.19 | 45.35 | 46.57 | 15.15 | 62.84 |
| | 0.37 | 7.0 | 4.12 | 37.95 | 35.46 | 20.59 | 56.83 |
| | 0.4 | 7.0 | 4.19 | 34.98 | 34.72 | 21.08 | 52.73 |

หมายเหตุ "-" หมายถึงไม่มีผล เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC เป็นการตรวจซ้ำ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในทุกช่วงเวลา




รูปที่ 3-20 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งที่หมักโดย *B.subtili* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเริ่มต้นในอาหาร ตั้งแต่ 0.0-0.4กรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่48 และ 72 ชั่วโมง

3.5.7 ผลของเฟร์ริกคลอไรด์ที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว

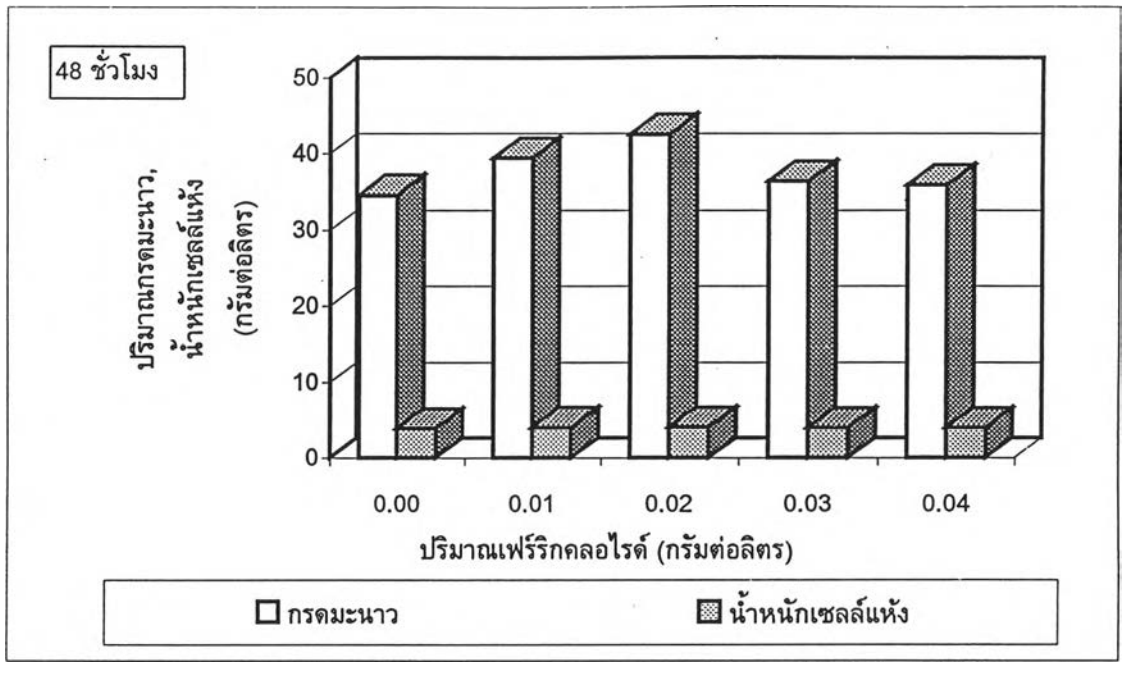
เหล็กเป็นสารจำเป็นสำหรับการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเทส มีรายงานของการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ว่าเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเทส เปลี่ยนกรดมะนาวเป็นกรดไอโซซิทริก ดังนั้นหากมีเหล็กจะทำให้กรดมะนาวลดลง แต่จะมีไอโซซิทริกเพิ่มขึ้น (Kamzolova *et al*, 1996) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีเหล็กเป็นองค์ประกอบอยู่โดยอยู่ในรูปของเฟร์ริกคลอไรด์ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาปริมาณเหล็กที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.8) ใช้ภาวะที่ได้ในข้อ 3.5.6 แปรผันปริมาณเฟร์ริกคลอไรด์เป็น 0, 0.01, 0.02 (ปริมาณที่ใช้อยู่เดิม), 0.03 และ 0.04 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3-21 และรูปที่ 3-21 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ผลิตกรดมะนาวได้เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณเฟร์ริกคลอไรด์เพิ่มขึ้นจนถึง 0.02 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อปริมาณเฟร์ริกคลอไรด์มากกว่า 0.02 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดมะนาวลดลง ส่วนปริมาณกรดไอโซซิทริก จากการตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี พบว่าในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวโดย *B. subtilis* ATCC 21610 ไม่มีการสะสมไอโซซิทริกเกิดขึ้น (ภาคผนวก จ) แสดงว่าปริมาณเฟร์ริกคลอไรด์ ที่มีในอาหารไม่มีผลทำให้มีการสะสมกรดไอโซซิทริกเกิดขึ้น ดังนั้นจึงเลือกปริมาณเฟร์ริกคลอไรด์เริ่มต้นที่ 0.02 กรัมต่อลิตรในการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

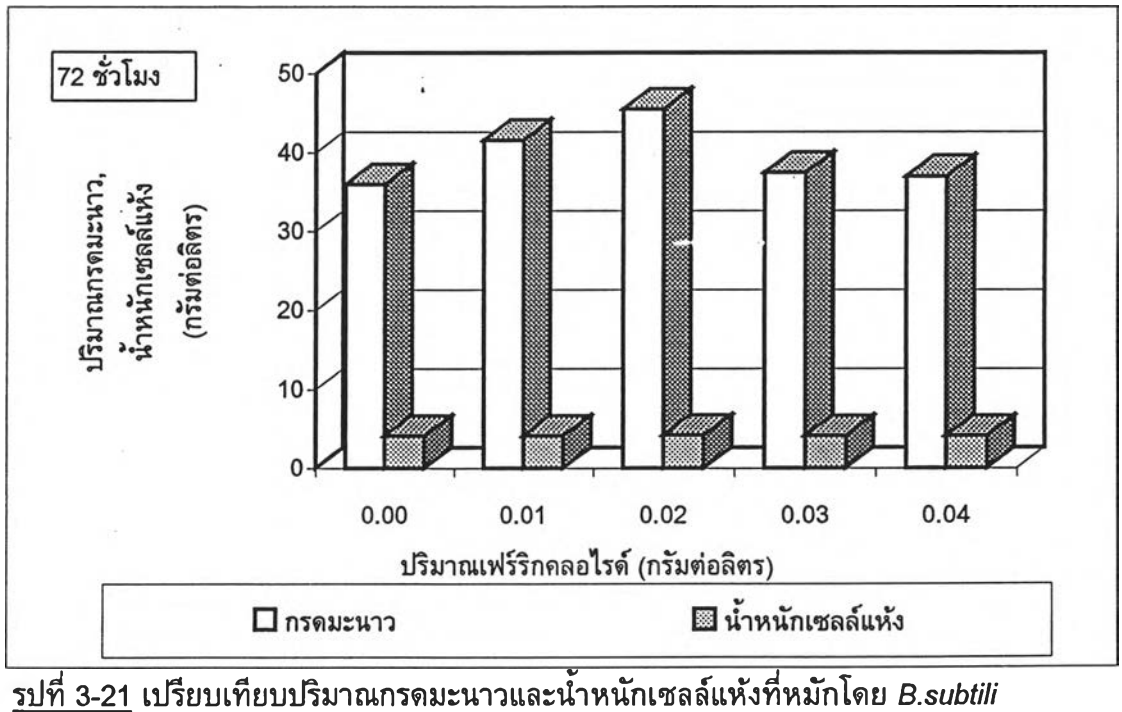
3.5.8 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการผลิตกรดมะนาว

แคลเซียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบอีกตัวหนึ่งที่มีในอาหาร BM ดังนั้นจึงศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรตที่มีต่อการผลิตกรดมะนาวของ *B.subtilis* ATCC 21610 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.9) ใช้ภาวะที่ได้จากข้อ 3.5.7 แปรผันปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรตเป็น 0, 0.03, 0.05, 0.07 (ปริมาณที่ใช้อยู่เดิม), 0.09 และ 0.11 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองดังตารางที่ 3-22 และ รูปที่ 3-22 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 45.28 กรัมต่อลิตรในอาหารที่มีแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 0.07 กรัมต่อลิตร จึงเลือกปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรตเริ่มต้นที่ 0.07 กรัมต่อลิตร ในการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 3-21 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อในอาหารมีเฟร์ริกคลอไรด์($FeCl_3$)ในปริมาณ 0.00-0.04 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณ $FeCl_3$ (กรัมต่อลิตร) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 48 | 0 | 7.0 | 3.95 | 34.55 | 35.47 | 24.28 | 54.80 |
| | 0.01 | 7.0 | 4.07 | 39.39 | 40.41 | 19.71 | 58.28 |
| | 0.02 | 7.0 | 4.14 | 42.51 | 42.13 | 17.05 | 60.54 |
| | 0.03 | 7.0 | 4.02 | 36.41 | 34.94 | 23.22 | 56.81 |
| | 0.04 | 7.0 | 4.03 | 35.90 | 32.75 | 25.26 | 57.87 |
| 72 | 0 | 7.0 | 4.06 | 35.99 | 36.73 | 22.74 | 55.73 |
| | 0.01 | 7.0 | 4.12 | 41.56 | 43.44 | 18.00 | 59.99 |
| | 0.02 | 7.0 | 4.17 | 45.50 | 48.80 | 15.96 | 63.83 |
| | 0.03 | 7.0 | 4.06 | 37.44 | 38.57 | 21.33 | 50.75 |
| | 0.04 | 7.0 | 4.07 | 37.01 | 37.98 | 23.35 | 57.88 |



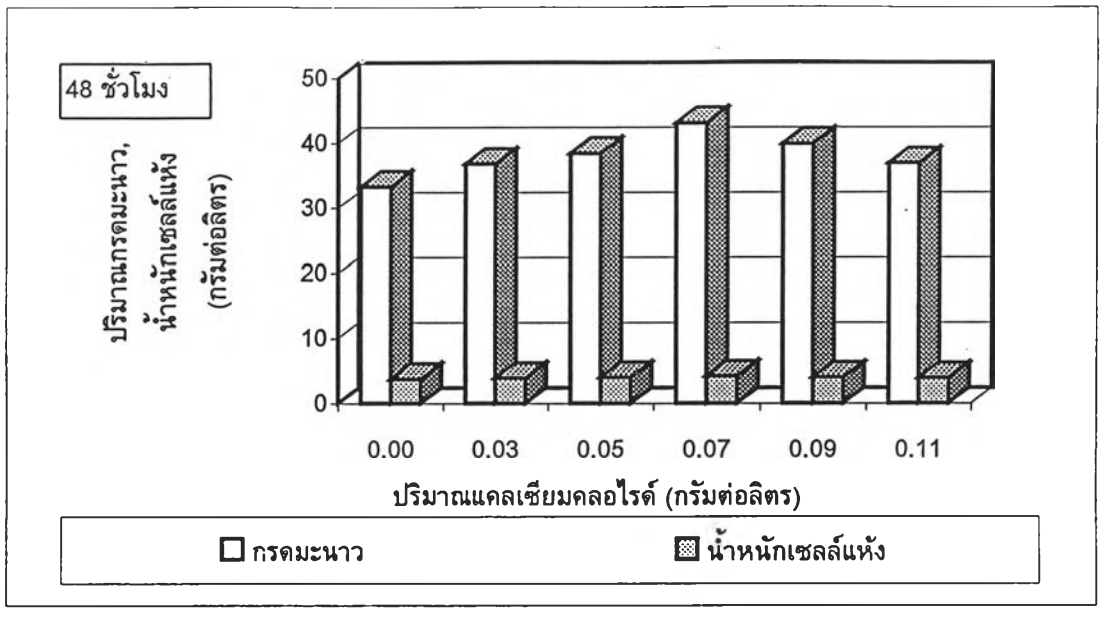



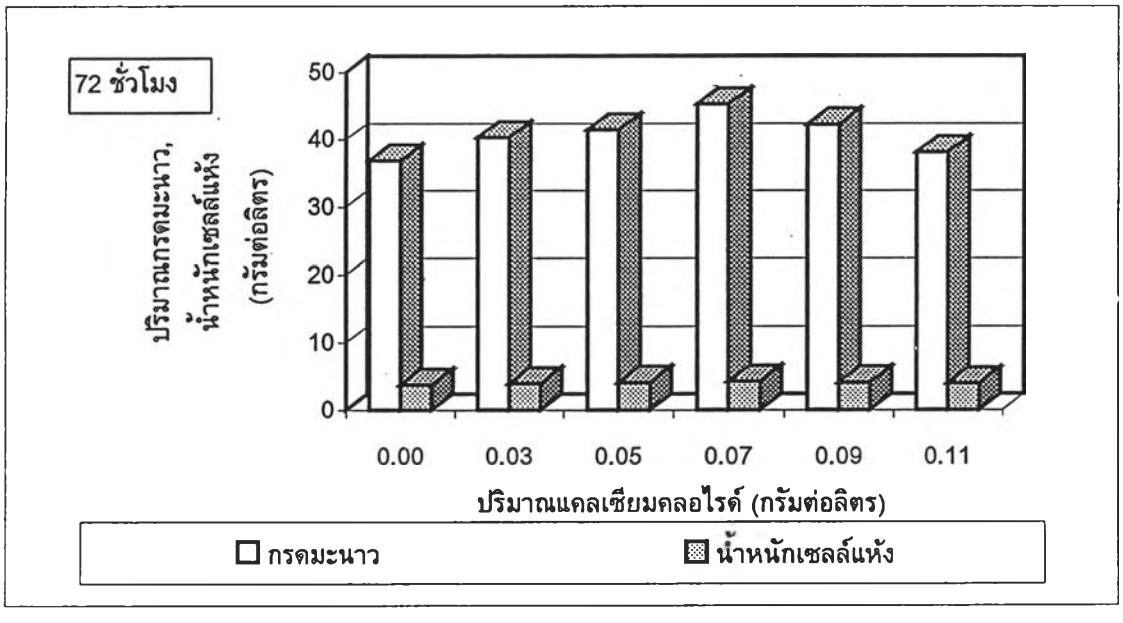

รูปที่ 3-21 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งที่หมักโดย *B.subtili* ATCC 21610 เมื่อมีปริมาณเฟร์ริกคลอไรด์ 0.00-0.04กรัมต่อลิตรที่ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 3-22 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อในอาหารมีแคลเซียมคลอไรด์($CaCl_2.2H_2O$)ในปริมาณ0.00-0.11 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณ $CaCl_2.2H_2O$ (กรัมต่อลิตร) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว(ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 48 | 0 | 7.0 | 3.72 | 33.23 | - | 17.84 | 47.52 |
| | 0.03 | 7.0 | 3.84 | 36.79 | - | 17.34 | 52.27 |
| | 0.05 | 7.0 | 3.96 | 38.41 | - | 17.43 | 54.66 |
| | 0.07 | 7.0 | 4.17 | 43.08 | - | 17.38 | 61.32 |
| | 0.09 | 7.0 | 3.99 | 39.90 | - | 17.23 | 58.64 |
| | 0.11 | 7.0 | 3.88 | 36.84 | - | 17.48 | 52.44 |
| 72 | 0 | 7.0 | 3.77 | 36.88 | 36.75 | 16.54 | 51.08 |
| | 0.03 | 7.0 | 3.90 | 40.32 | 40.41 | 16.28 | 55.68 |
| | 0.05 | 7.0 | 4.08 | 41.46 | 43.44 | 16.33 | 57.31 |
| | 0.07 | 7.0 | 4.25 | 45.28 | 46.38 | 16.50 | 62.78 |
| | 0.09 | 7.0 | 4.07 | 42.28 | 42.13 | 16.12 | 58.28 |
| | 0.11 | 7.0 | 3.96 | 38.07 | 37.01 | 31.23 | 52.51 |

หมายเหตุ "-" หมายถึงไม่มีผล เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC เป็นการตรวจซ้ำ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในทุกช่วงเวลา




รูปที่ 3-22 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้งที่หมักโดย *B.subtili* ATCC 21610เมื่อมีปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ 0.00-0.11 กรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียสในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

3.5.9 ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

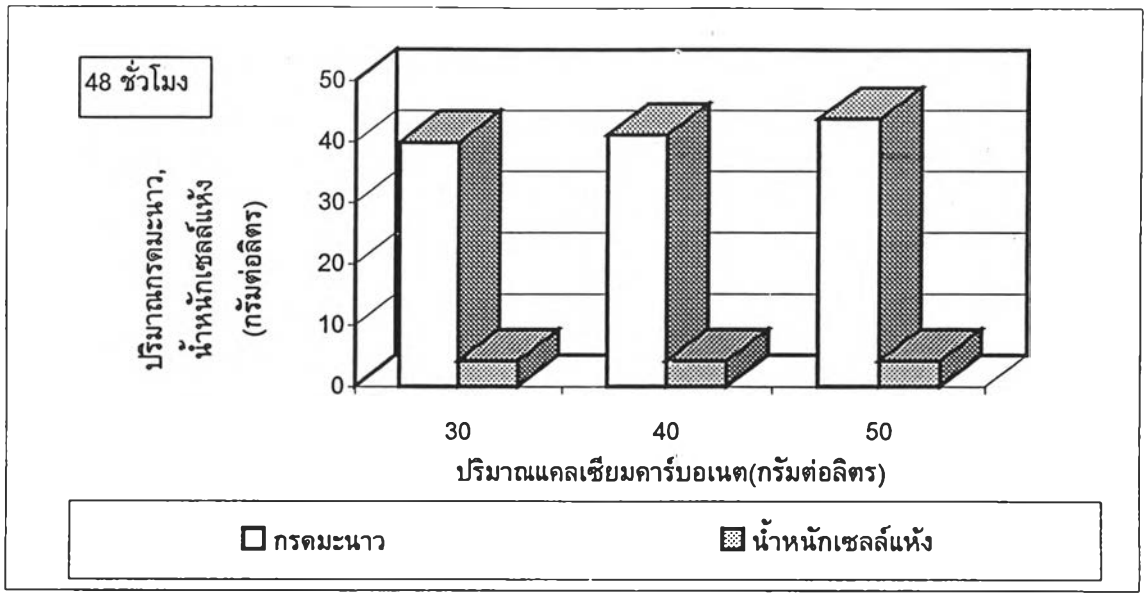
ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว การสะสมกรดทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว เกิดเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงได้มีการเติมสารบางอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ สารที่นิยมใช้ในระดับขวดเขย่าได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต($CaCO_3$) ปริมาณที่ใช้ขึ้นกับปริมาณกรดมะนาวที่เชื้อผลิตขึ้น จากการทดลองที่ 3.5.8 พอจะคำนวณปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใช้ว่าอยู่ที่ประมาณ 30 กรัมต่อลิตร แต่เนื่องจากการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อควบคุมการหมัก มักจะเติมลงไปให้มากเกินพอ ดังนั้นในการทดลองนี้ต้องการศึกษาเพื่อหาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.10) ใช้ภาวะที่ได้จากข้อ 3.5.8 แปรผันปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเป็น 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

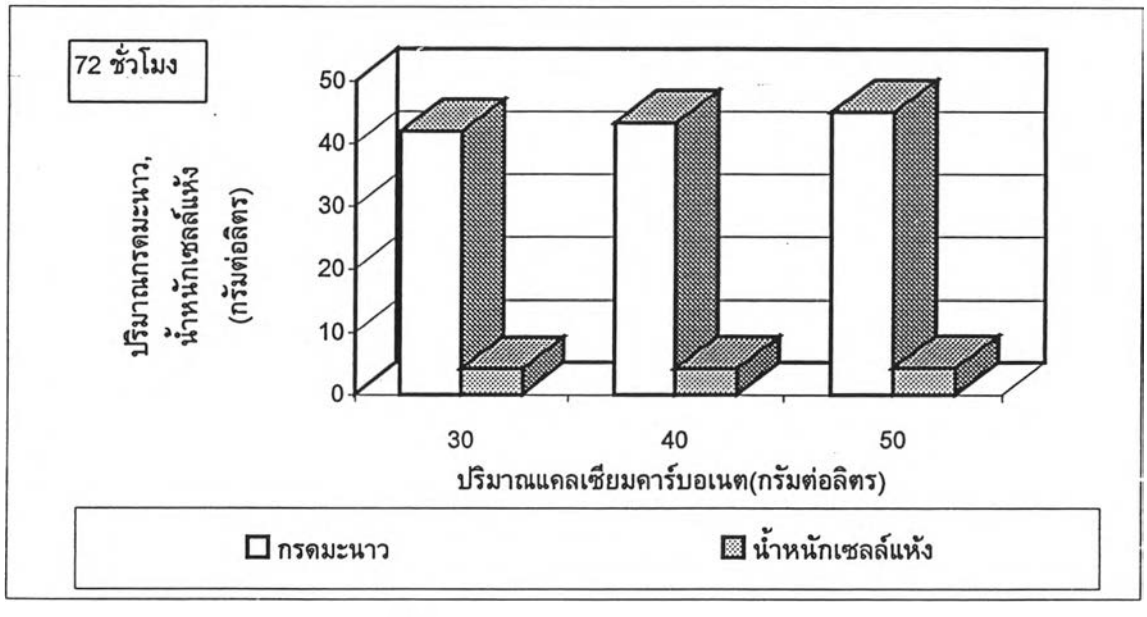
ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3-23 และรูปที่ 3-23 จากการทดลองพบว่าในระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง เชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตที่ 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับที่ใช้อยู่เดิมและสามารถควบคุมระดับค่าความเป็นกรด-ด่างไว้ที่ 7.0 ได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 50 กรัมต่อลิตรในการผลิตกรดมะนาวจาก *B. subtilis* ATCC 21610 ในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 3-23 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610เมื่อมีปริมาณสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (แคลเซียมคาร์บอเนต, $CaCO_3$) 30-50 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณ $CaCO_3$ (กรัมต่อตร) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 48 | 30 | 6.7 | 4.11 | 39.86 | - | 17.30 | 56.51 |
| | 40 | 6.8 | 4.12 | 41.04 | - | 17.25 | 58.15 |
| | 50 | 7.0 | 4.15 | 43.71 | - | 17.30 | 62.01 |
| 72 | 30 | 6.7 | 4.13 | 41.93 | 42.13 | 15.20 | 57.73 |
| | 40 | 6.8 | 4.19 | 43.35 | 44.32 | 15.17 | 59.67 |
| | 50 | 7.0 | 4.27 | 45.04 | 46.38 | 15.35 | 62.18 |

หมายเหตุ "-" หมายถึงไม่มีผล เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC เป็นการตรวจซ้ำ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในทุกช่วงเวลา




รูปที่ 3-23 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *B. Subtilis* ATCC 21610 ในอาหารที่มีปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 30 -50 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

3.5.10 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม และอาหารที่ได้จากการหาภาวะที่เหมาะสม

หลังจากที่ได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวจาก *B.subtilis* ATCC 21610 แล้วนำมาทดลองเปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดิมที่ไม่ได้ปรับปรุง ซึ่งในอาหารประกอบด้วย

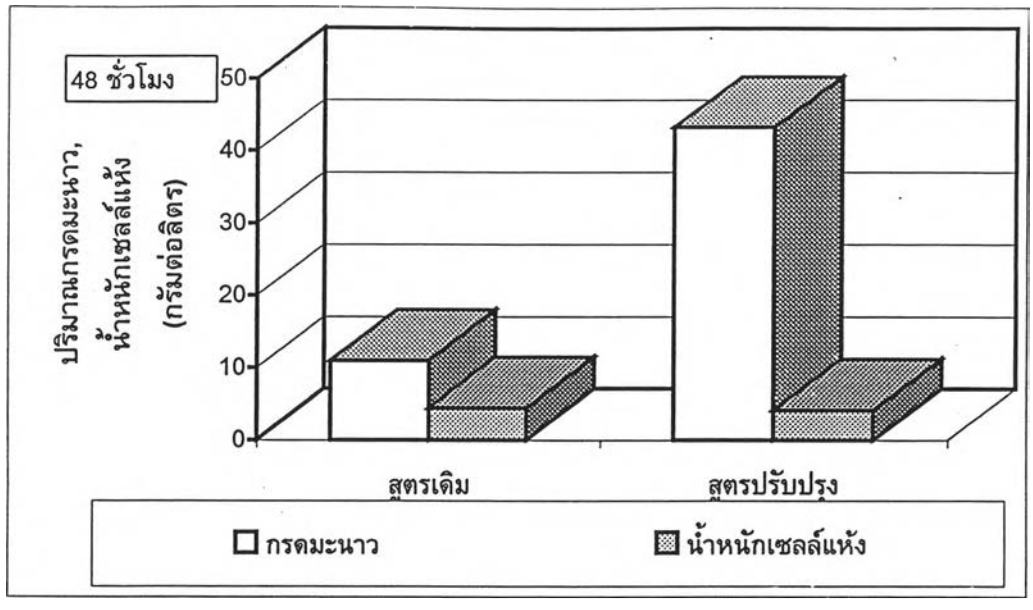
| | อาหารสูตรเดิม (ภาคผนวก ก 2.11) | อาหารสูตรปรับปรุง (ภาคผนวก ก 2.2) | |
|---|---|---|---|
| แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส | 100.00 | 100.00 | กรัมต่อลิตร |
| แอมโมเนียมซัลเฟต | 2.00 | 1.30 | กรัมต่อลิตร |
| แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต | 0.25 | 0.25 | กรัมต่อลิตร |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต | 0.30 | 0.37 | กรัมต่อลิตร |
| เฟร์ริกคลอไรด์ | 0.02 | 0.02 | กรัมต่อลิตร |
| แคลเซียมคลอไรด์ | 0.07 | 0.07 | กรัมต่อลิตร |
| และแคลเซียมคาร์บอเนต | 50.00 | 50.00 | กรัมต่อลิตร |

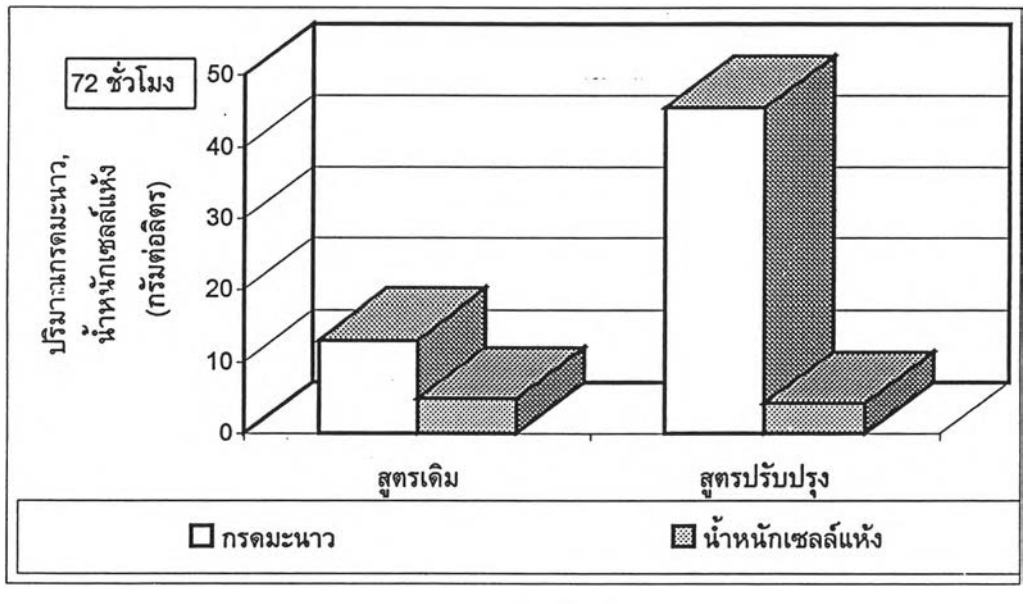
ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3-24 และรูปที่ 3-24 จากผลการทดลองพบว่าอาหารสูตรเดิมให้ผลการผลิตกรดมะนาวน้อยกว่าอาหารสูตรที่ปรับปรุงแล้วมาก โดยในอาหารสูตรเดิมสามารถให้ผลการผลิตกรดมะนาวได้ 13.07 กรัมต่อลิตรที่ 72 ชั่วโมง ส่วนในอาหารสูตรปรับปรุงแล้วสามารถให้ผลการผลิตกรดมะนาวถึง 45.53 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3-24 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ระหว่างอาหารสูตรเดิมและอาหารสูตรที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว(สูตรใหม่)

| สูตรอาหาร | ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว(ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| สูตรเดิม | 48 | 7.0 | 4.45 | 10.97 | - | 34.96 | 20.80 |
| | 72 | 7.0 | 4.90 | 13.03 | 14.08 | 25.07 | 20.80 |
| สูตรใหม่ | 48 | 7.0 | 4.16 | 43.27 | - | 16.65 | 61.79 |
| | 72 | 7.0 | 4.27 | 45.53 | 46.38 | 14.02 | 62.66 |

หมายเหตุ "-" หมายถึงไม่มีผล เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC เป็นการตรวจซ้ำ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในทุกช่วงเวลา




รูปที่3-24 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวและน้ำหนักเซลล์แห้ง ของ*B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมและอาหารที่ได้ปรับปรุงแล้วในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

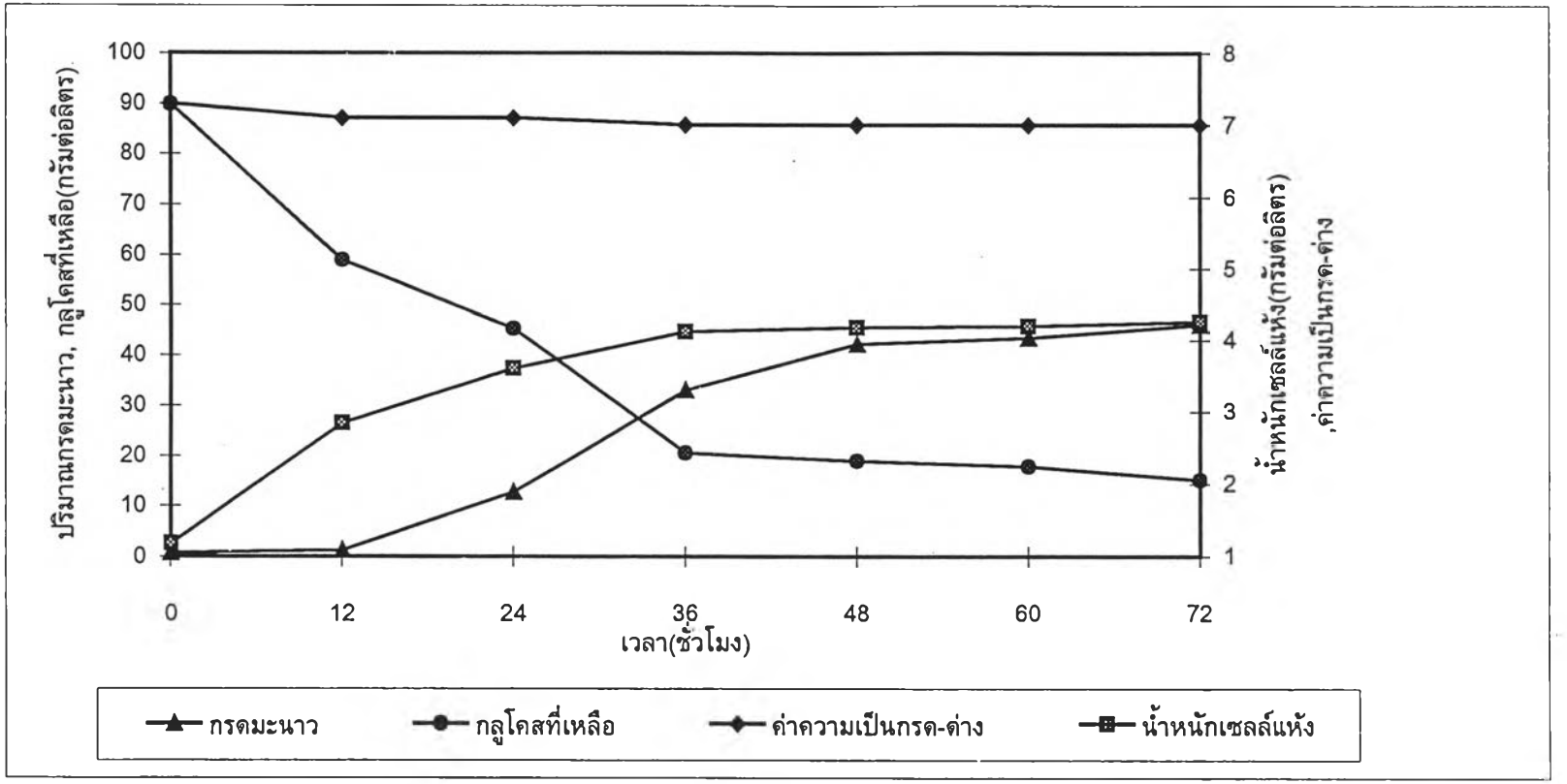
3.5.11 การเจริญและการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที ใช้หัวเชื้อที่อายุ 8 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว คืออาหาร BM ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก 2.11) เลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3-25 และรูปที่ 3-25 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนค่อนข้างคงที่ที่ชั่วโมงที่ 36 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 4.26 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการหมักเชื้อจะผลิตกรดมะนาวสูงขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง และสูงขึ้นเรื่อยๆ จนได้ประมาณ 46 กรัมต่อลิตรที่ 72 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตกรดมะนาวประมาณร้อยละ 60 โดยมีการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตกรดมะนาวดีขึ้นกว่าอาหารสูตรเดิม และสามารถควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างไว้ที่ 7.0 ได้ตลอดการทดลองสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 45.96 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 60.41 เมื่อเทียบกับปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป

ตารางที่ 3-25 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ได้รับการปรับปรุงให้เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนในระดับขวดเขย่า

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 7.3 | 1.18 | 0.73 | - | 89.90 | 0 |
| 12 | 7.1 | 2.85 | 1.30 | 6.38 | 58.84 | 1.83 |
| 24 | 7.1 | 3.61 | 12.60 | 11.00 | 45.21 | 26.56 |
| 36 | 7.0 | 4.12 | 32.93 | 31.28 | 20.44 | 46.35 |
| 48 | 7.0 | 4.18 | 42.18 | 40.20 | 18.83 | 58.32 |
| 60 | 7.0 | 4.20 | 43.39 | 43.44 | 17.67 | 59.06 |
| 72 | 7.0 | 4.26 | 45.96 | 47.67 | 15.03 | 60.41 |

หมายเหตุ "-" หมายถึงไม่มีผล เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC เป็นการตรวจซ้ำ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในทุกช่วงเวลา




รูปที่ 3-25 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว, น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ได้รับการปรับปรุงให้เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่า

3.6 การผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.7) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที ใช้หัวเชื้อที่อายุ 8 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว BM ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก 2.11) เลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3-26 และรูปที่ 3-26 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังชั่วโมงที่ 4 และเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่หลังชั่วโมงที่ 8 หลังจากนั้น น้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.59 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจาก 16 ชั่วโมง และสูงขึ้นเรื่อยๆ จนได้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 48.93 กรัมต่อลิตรที่ 72 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตกรดมะนาวร้อยละ 56 เมื่อเทียบกับปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป การเพิ่มขึ้นของกรดมะนาวสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ พบว่าที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเหลือน้ำตาลกลูโคส 12.65 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.51 และจากรูปที่ 3-28 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 44 ของการหมัก ($Yp/s'$) และเชื้อมีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดที่ 32 ชั่วโมงของการหมัก ($Yp/x'$) สำหรับเวลาที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ได้สูงสุดคือที่ 8 ชั่วโมงของการหมัก ($Yx/s'$)

จากการเปรียบเทียบผลผลิตกรดมะนาว พบว่าแม้จะมีการผลิตกรดมะนาวเร็วขึ้น 8 ชั่วโมง และมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า แต่ผลผลิตกรดมะนาวที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับในระดับขวดเขย่า (72 ชั่วโมง) แสดงว่าภาวะที่ใช้ในการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร อาจยังไม่เหมาะสม ดังนั้นในการขยายขนาดการผลิตเป็นถังหมักขนาด 5 ลิตรจะต้องมีการหาภาวะที่เหมาะสมต่อไป

ตารางที่ 3-26 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือค่า Yp/s, Yx/s, Yp/x, Yp/s', Yx/s' และ Yp/x' ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ได้รับการปรับปรุงให้เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | Yp/s | Yx/s | Yp/x | Yp/s' | Yx/s' | Yp/x' |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 6.90 | 1.16 | 0.69 | - | 97.65 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 6.93 | 1.24 | 1.06 | - | 72.62 | 0.01 | 0 | 0.29 | 0.01 | 0 | 4.62 |
| 8 | 6.90 | 3.54 | 1.16 | - | 64.76 | 0.01 | 0.07 | 0.13 | 0.01 | 0.29 | 0.04 |
| 12 | 6.90 | 4.00 | 2.13 | 8.34 | 58.63 | 0.04 | 0.07 | 0.36 | 0.15 | 0.07 | 2.10 |
| 16 | 6.93 | 4.18 | 8.18 | - | 51.92 | 0.16 | 0.07 | 1.79 | 0.90 | 0.02 | 33.6 |
| 20 | 6.93 | 4.40 | 13.20 | - | 47.87 | 0.25 | 0.07 | 2.84 | 1.23 | 0.05 | 22.8 |
| 24 | 6.90 | 4.68 | 25.30 | 27.56 | 35.33 | 0.39 | 0.06 | 5.25 | 0.96 | 0.02 | 43.2 |
| 28 | 6.85 | 4.78 | 30.95 | - | 30.78 | 0.42 | 0.05 | 6.33 | 1.24 | 0.02 | 56.5 |
| 32 | 6.84 | 4.87 | 37.62 | - | 25.29 | 0.51 | 0.05 | 7.58 | 1.21 | 0.02 | 74.1 |
| 36 | 6.83 | 5.11 | 39.93 | 40.20 | 21.94 | 0.52 | 0.05 | 7.67 | 0.68 | 0.07 | 9.62 |
| 40 | 6.85 | 5.21 | 42.48 | - | 20.34 | 0.54 | 0.05 | 8.02 | 1.59 | 0.06 | 25.5 |
| 44 | 6.85 | 5.30 | 43.60 | - | 19.74 | 0.55 | 0.05 | 8.09 | 1.86 | 0.15 | 12.4 |

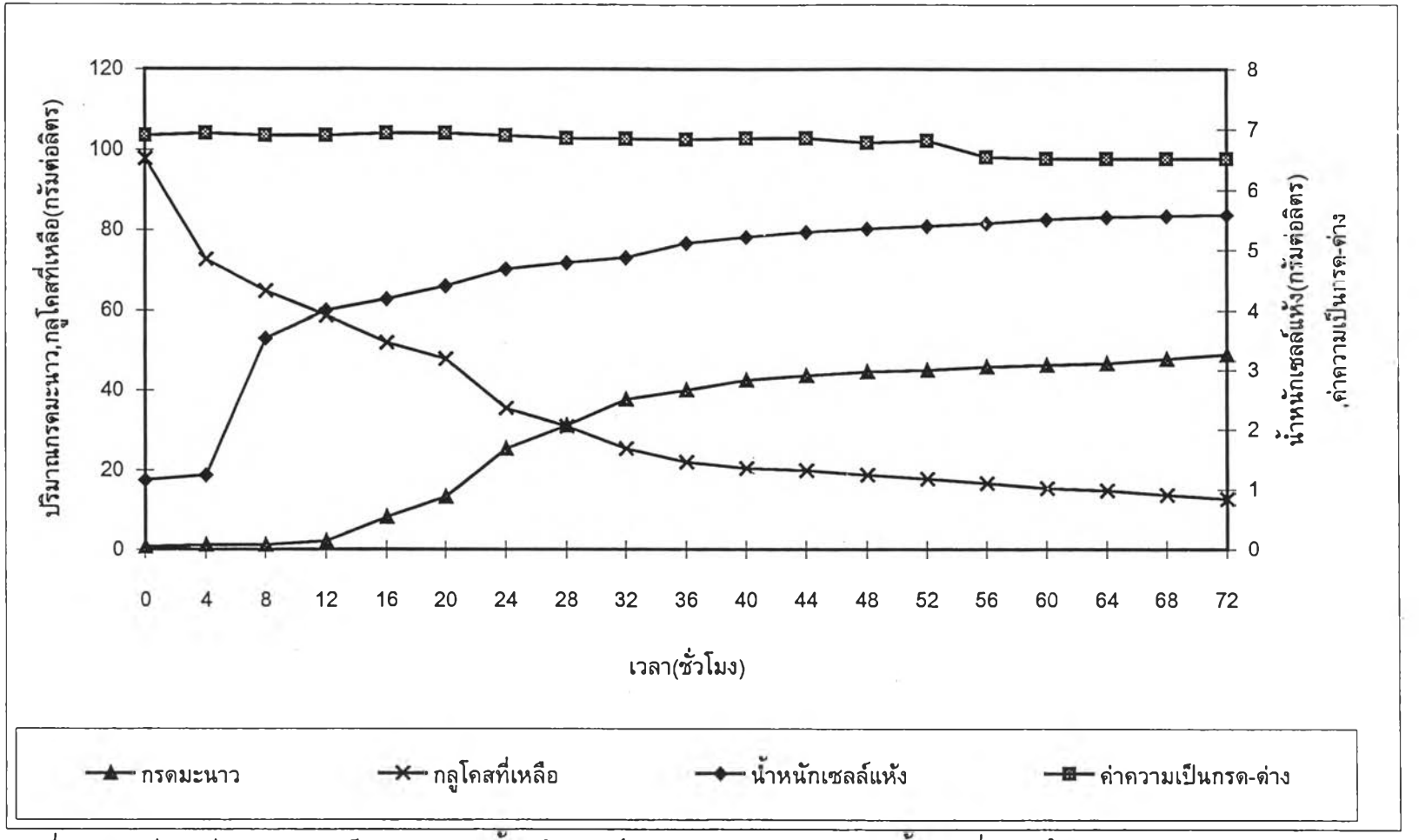
ตารางที่ 3-26(ต่อ) เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว และ น้ำตาลที่เหลือค่า Yp/s, Yx/s, Yp/x, Yp/s', Yx/s' และ Yp/x' ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B.subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ได้รับการปรับปรุงให้เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน (กรัมต่อลิตร) | กรดมะนาวด้วยวิธี HPLC (กรัมต่อลิตร) | กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) | Yp/s | Yx/s | Yp/x | Yp/s' | Yx/s' | Yp/x' |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 48 | 6.77 | 5.35 | 44.67 | 43.44 | 18.65 | 0.56 | 0.05 | 8.22 | 0.98 | 0.04 | 21.4 |
| 52 | 6.81 | 5.40 | 45.08 | - | 17.69 | 0.56 | 0.05 | 8.22 | 0.42 | 0.05 | 8.20 |
| 56 | 6.54 | 5.45 | 45.85 | - | 16.52 | 0.56 | 0.05 | 8.28 | 0.65 | 0.04 | 15.4 |
| 60 | 6.51 | 5.51 | 46.37 | 47.67 | 15.34 | 0.55 | 0.05 | 8.29 | 0.44 | 0.05 | 8.66 |
| 64 | 6.51 | 5.55 | 46.72 | - | 14.74 | 0.55 | 0.05 | 8.29 | 0.58 | 0.06 | 8.75 |
| 68 | 6.51 | 5.57 | 47.84 | - | 13.66 | 0.56 | 0.05 | 8.46 | 1.03 | 0.02 | 56.0 |
| 72 | 6.51 | 5.59 | 48.93 | 49.94 | 12.65 | 0.56 | 0.05 | 8.62 | 1.07 | 0.02 | 54.2 |

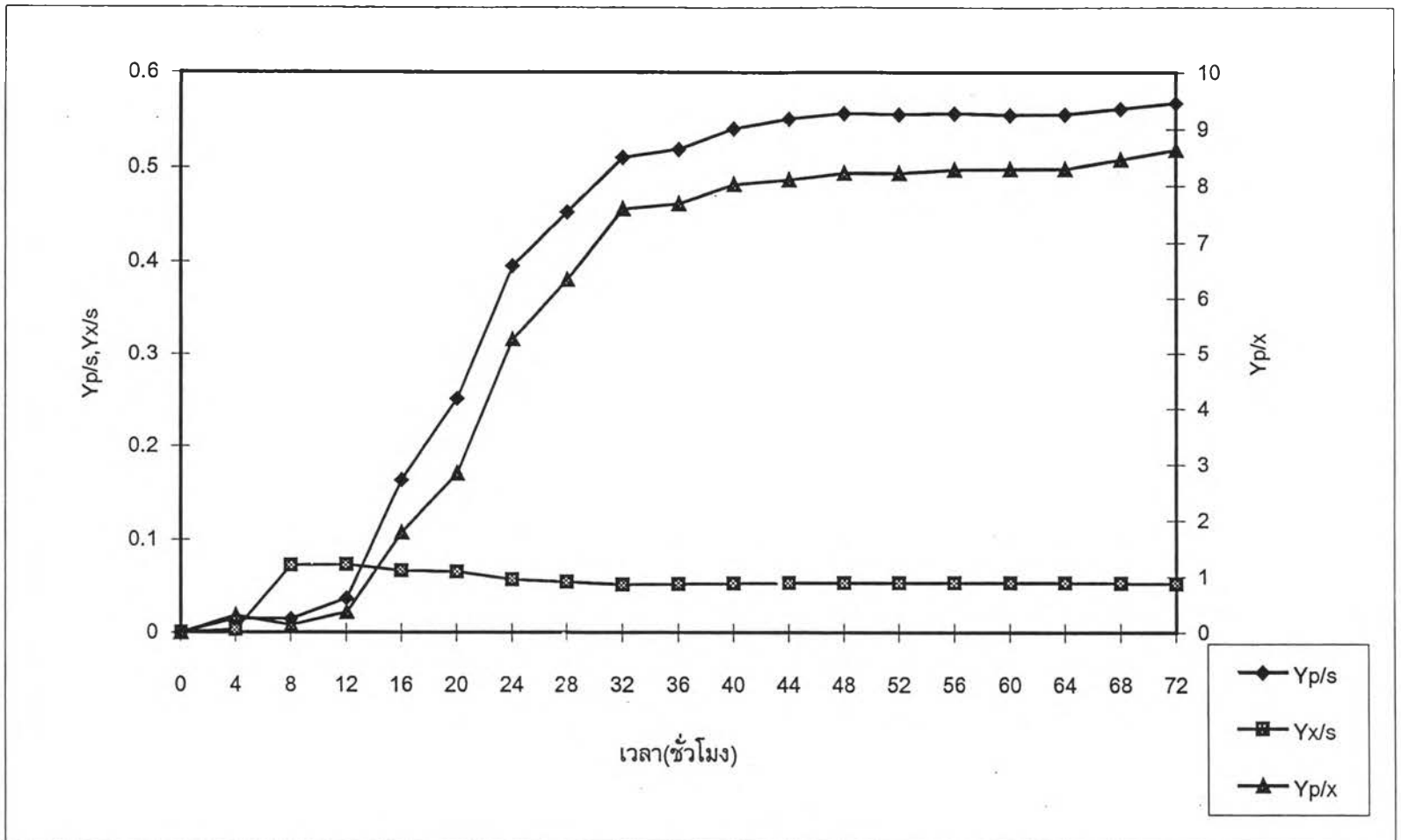
ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 2,810 มิลลิลิตร

คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 137.4 กรัม

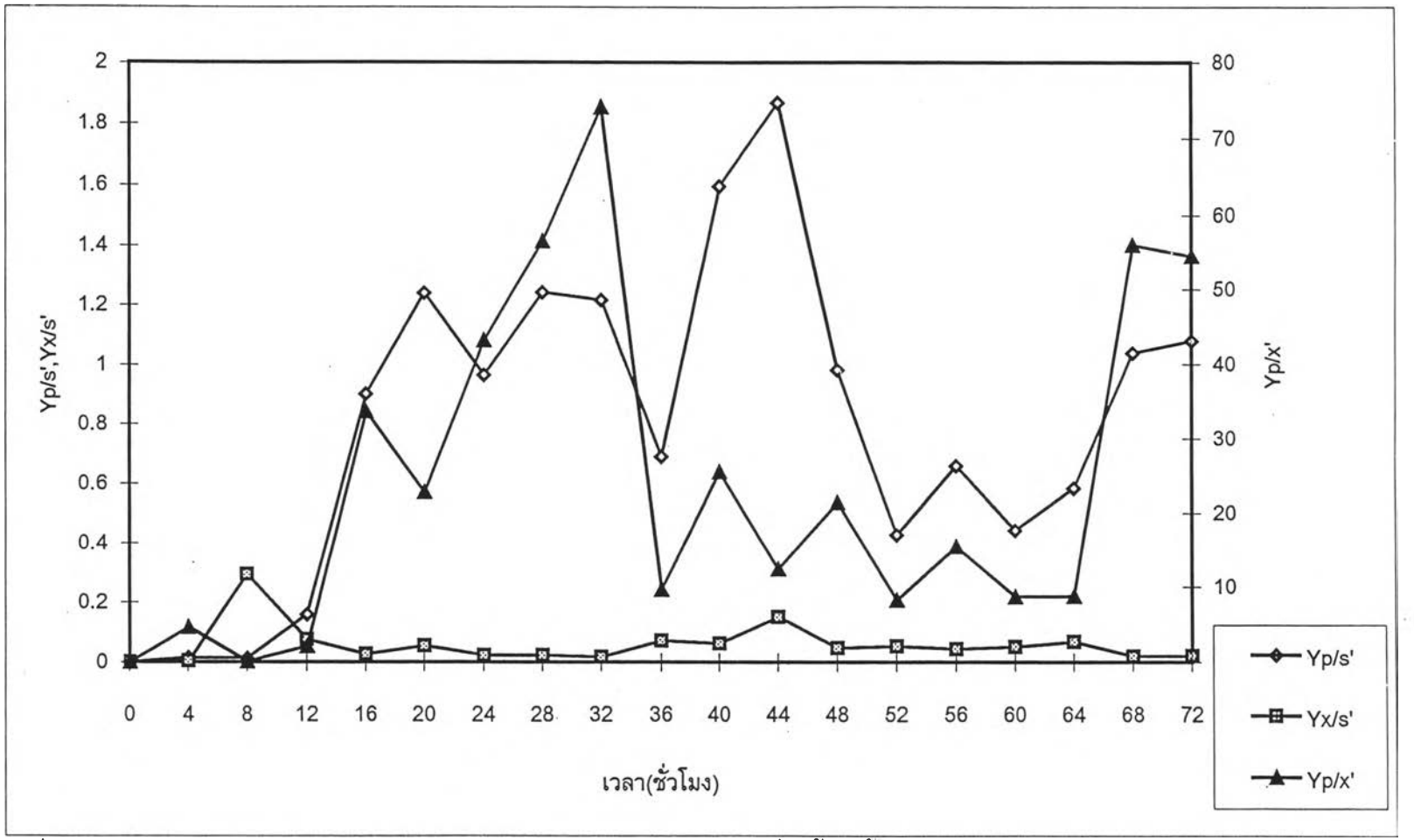
หมายเหตุ "-" หมายถึงไม่มีผล เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธี HPLC เป็นการตรวจซ้ำ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในทุกช่วงเวลา




รูปที่ 3-26 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณกรดมะนาว, น้ำตาลที่เหลือ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร BM ที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร




รูปที่ 3-27 ค่า Yp/s, Yx/s และค่า Yp/x ในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร




รูปที่ 3-28 ค่า Yp/s', Yx/s' และค่า Yp/x' ในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร