บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในระดับขวดเขย่า

3.1.1 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของหัวเชื้อ

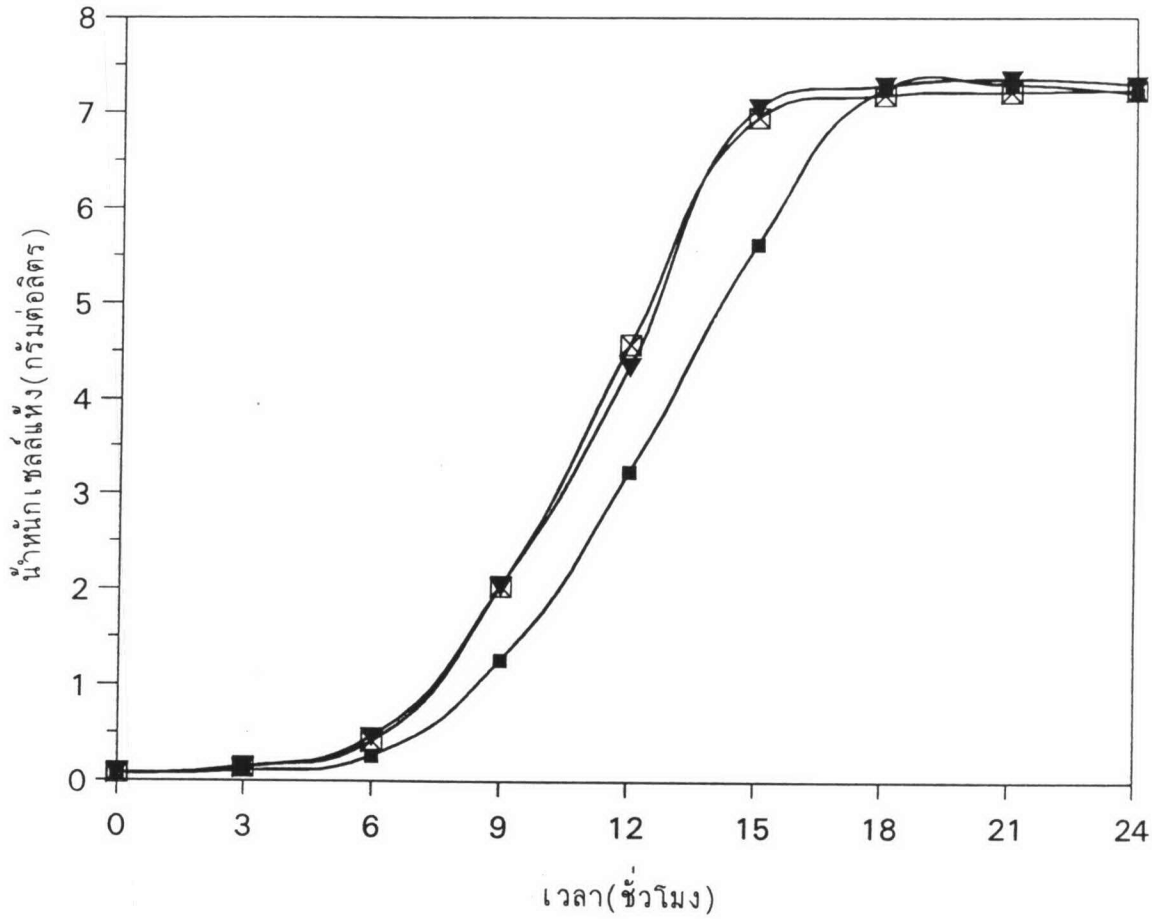
เรวดี เลิศไตรรักษ์(2535) ได้ศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารที่มีนอร์มัล-พาราฟฟินส์ พบว่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของหัวเชื้อ แต่ในการทดลองนี้ได้ใช้อาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อที่ต่างจากของเรวดี ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของหัวเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก1.1) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2.3.2 แปรผันอุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเป็น 25,28 และ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 300 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญของหัวเชื้อทุก 3 ชั่วโมง โดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 3 จากการทดลองพบว่าเชื้อ *C. oleophila* C-73 เจริญที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่ 25 องศาเซลเซียส โดยที่การเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่การเจริญแบบทวีคูณ(log phase) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 และการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่(stationary phase) หลังจากเลี้ยงเชื้อได้ 15 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 7 กรัมต่อลิตร ส่วนการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้ออยู่ในช่วงของการพักตัว(lag phase)นานกว่าและการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่หลังจากการเลี้ยงได้ 18 ชั่วโมง แต่การเจริญของเชื้อทั้ง 3 อุณหภูมิได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเตรียมหัวเชื้อ *C. oleophila* C-73 สำหรับการผลิตกรดมะนาวจะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 300

รอบต่อนาที ก่อนถ่ายเชื้อลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ที่ระยะเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)		
	25 ^{0}ซ	28 ^{0}ซ	30 ^{0}ซ
0	0.08	0.08	0.08
3	0.10	0.13	0.14
6	0.26	0.46	0.41
9	1.25	2.03	2.03
12	3.22	4.34	4.57
15	5.62	7.05	6.94
18	7.25	7.28	7.18
21	7.29	7.35	7.21
24	7.20	7.29	7.23



รูปที่ 3 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25(■), 28(▼)และ 30(⊠) องศาเซลเซียส

3.1.2 อายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว

จากการทดลองในข้อ 3.1.1 และรูปที่ 3 ซึ่งแสดงลักษณะการเจริญของหัวเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะกลางของช่วงทวีคูณที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนที่เวลา 15 ชั่วโมงจะเป็นช่วงท้ายของระยะทวีคูณและเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ ดังนั้นในการทดลองเพื่อหาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมจึงทดลองใช้หัวเชื้ออายุ 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงกลางของการเจริญแบบทวีคูณ หัวเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงท้ายของการเจริญแบบทวีคูณและหัวเชื้ออายุ 18 ชั่วโมงซึ่งเป็นช่วงที่การเจริญคงที่แล้ว

เลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก1.1)ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2.3.2 และสภาวะที่ได้ในข้อ 3.1.1ใช้หัวเชื้ออายุ 12, 15 และ 18 ชั่วโมง นำมาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.1) โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.7 กรัมต่อลิตร และคิดเป็นปริมาณร้อยละ 10(ปริมาตรต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง กรดมะนาว และน้ำตาลที่เหลือตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3ก,3ข,3ค,3ง และรูปที่ 4 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า เมื่อใช้หัวเชื้ออายุต่างกันในปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นเท่ากัน เชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดใกล้เคียงกันประมาณ 132 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง แต่ถ้าใช้หัวเชื้ออายุ 12 ชั่วโมง จะต้องใช้ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 16 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในขณะที่หัวเชื้ออายุ 15 และ 18 ชั่วโมงใช้ปริมาณหัวเชื้อเพียงร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ส่วนการทดลองที่ใช้หัวเชื้ออายุ 12 ชั่วโมง ปริมาณร้อยละ 10(ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้น้ำหนักเซลแห้งเริ่มต้น 0.47 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าหัวเชื้ออายุ 15 และ 18 ชั่วโมง จะเห็นว่าการผลิตกรดมะนาวจะช้ากว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้หัวเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง ใช้ปริมาณหัวเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น 0.7 กรัมต่อลิตร หรือปริมาณร้อยละ 10(ปริมาตรต่อปริมาตร) ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 3ก ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยใช้หัวเชื้ออายุ 12 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์แห้งเริ่มต้น 0.47 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.53	0.47	0.00	201.73	207.91
12	6.52	4.11	0.00	192.11	198.43
24	6.48	7.88	7.99	177.50	183.48
36	6.45	9.06	18.21	154.06	160.88
48	6.42	11.18	29.82	134.61	140.30
60	6.35	12.60	47.15	115.28	122.08
72	6.34	13.10	65.21	97.96	104.49
84	6.25	14.19	78.93	77.59	84.11
96	6.21	15.32	92.65	53.22	59.71
108	5.63	16.96	111.13	32.46	39.00
120	3.88	17.28	127.62	13.71	20.30
132	3.79	17.30	130.34	6.24	13.34
144	3.76	16.81	132.39	4.50	11.20

ตารางที่ 3ข ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยใช้หัวเชื้ออายุ 12 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์แห้งเริ่มต้น 0.7 กรัมต่อลิตร

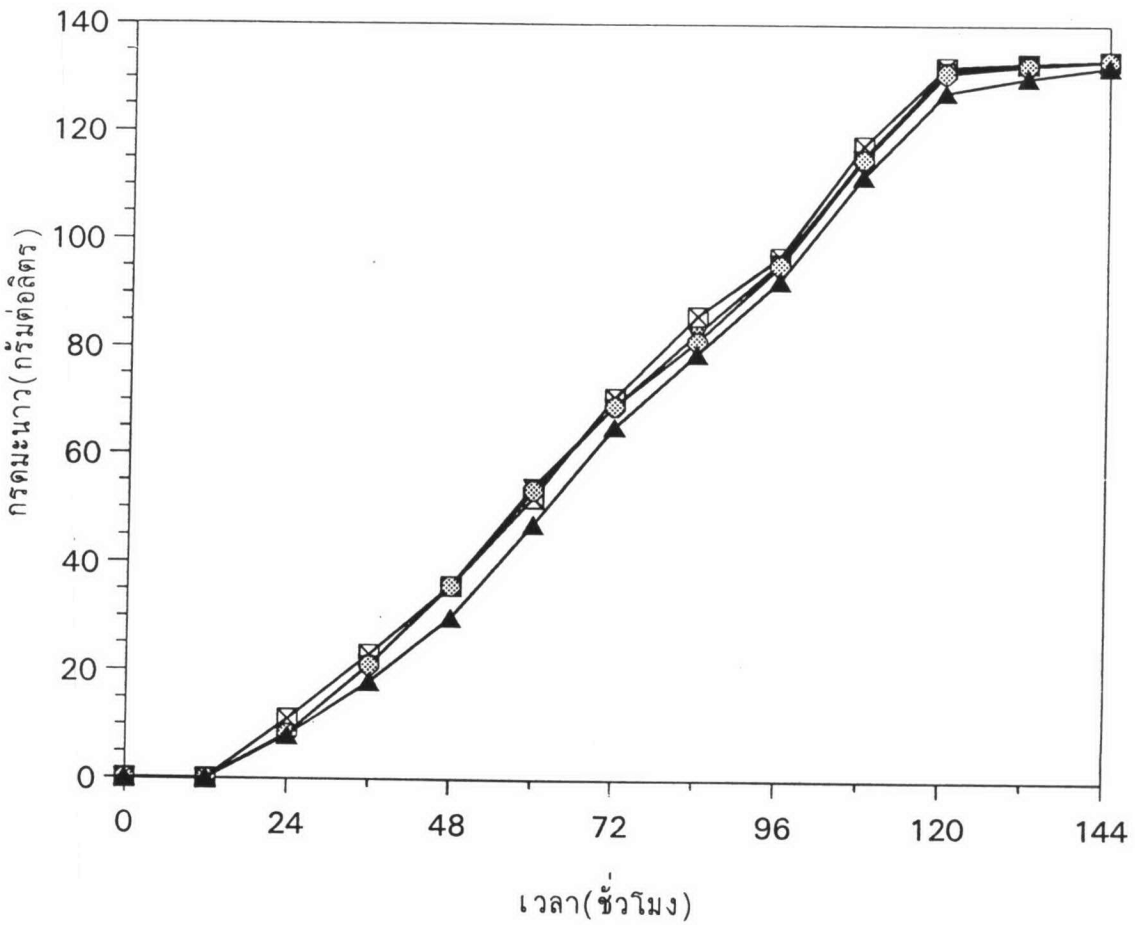
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.52	0.75	0.00	201.73	207.91
12	6.49	4.80	0.00	190.11	196.22
24	6.47	9.62	11.09	174.26	180.42
36	6.43	10.80	23.03	149.10	155.78
48	6.40	12.02	35.78	123.57	130.25
60	6.38	13.63	52.07	105.68	112.33
72	6.33	15.18	70.76	86.79	95.54
84	6.20	15.98	80.88	65.80	72.38
96	6.11	16.86	97.00	42.02	49.17
108	5.44	17.20	117.69	21.85	28.03
120	3.36	17.42	132.39	5.68	11.75
132	3.32	17.25	133.12	4.10	11.11
144	3.30	16.30	133.59	3.40	10.20

ตารางที่ 3ค ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ในระยะเวลาต่างๆของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยใช้หัวเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์แห้งเริ่มต้น 0.7 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.53	0.70	0.00	201.73	207.91
12	6.51	4.30	0.00	191.54	197.88
24	6.48	8.28	8.35	172.07	179.13
36	6.44	10.01	21.06	150.52	157.04
48	6.42	11.84	35.78	124.98	131.42
60	6.36	13.05	53.48	107.02	113.89
72	6.29	14.20	69.18	90.06	96.31
84	6.20	15.06	81.30	71.02	77.45
96	6.11	15.88	95.42	45.98	52.25
108	5.60	16.60	115.12	27.04	33.92
120	3.47	17.10	131.20	9.10	15.52
132	3.42	17.01	132.59	5.67	12.11
144	3.36	16.44	133.59	3.98	10.46

ตารางที่ 3ง ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยใช้หัวเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์แห้งเริ่มต้น 0.7 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.51	0.72	0.00	201.73	207.91
12	6.49	4.45	0.00	190.02	196.85
24	6.48	8.18	8.35	175.69	182.33
36	6.44	10.20	21.18	151.39	158.29
48	6.39	12.28	35.78	123.17	130.03
60	6.37	13.27	54.08	103.04	109.46
72	6.32	14.32	69.18	84.90	90.41
84	6.21	15.17	82.84	68.35	74.49
96	6.04	15.98	96.02	48.79	55.08
108	5.52	16.72	115.41	28.01	34.65
120	3.57	17.24	131.80	10.23	16.72
132	3.50	17.08	133.05	5.11	12.04
144	3.44	16.62	133.59	2.12	8.52



รูปที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันอายุของหัวเชื้อเป็น 12 ชั่วโมง(น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.47 กรัมต่อลิตร)(▲), 12 ชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.7 กรัมต่อลิตร)(⊠), 15 ชั่วโมง(น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.7 กรัมต่อลิตร)(◎)และ 18 ชั่วโมง(น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.7 กรัมต่อลิตร)(▼)

3.1.3 ผลของปริมาณหัวเชื้อที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว

จากการทดลองในข้อ 3.1.2 ได้หัวเชื้อที่เหมาะสมอายุ 15 ชั่วโมง ในการทดลองนี้ได้เลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ(ภาคผนวก ก1.1) ตามสภาวะที่ใช้ในข้อ 3.1.2 จนหัวเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง นำมาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.1)แปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเมื่อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 0.7,1.4 และ 2.1 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4ก,4ข,4ค และรูปที่ 5 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า การเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมัก เชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้เร็วขึ้น เมื่อเปรียบเทียบในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก จะเห็นความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดว่าถ้าใช้หัวเชื้อปริมาณมากขึ้น การผลิตกรดมะนาวเกิดได้มากกว่าคือได้ 95.23,101.38 และ 110.93 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้หัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 0.7, 1.4 และ 2.1 กรัมต่อลิตรตามลำดับ แต่อัตราเร็วในการผลิตกรดมะนาวเท่ากันคือ 1.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยปริมาณกรดมะนาวที่เชื้อผลิตได้สูงสุดใกล้เคียงกันคือประมาณ 131 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 0.7 กรัมต่อลิตร

3.1.4 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว

Nakanishi และคณะ(1972) ได้รายงานผลการแปรผันอุณหภูมิในช่วง 27-33 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส เรวดี เลิศไตรรักษ์ (2535)ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารที่มีนอร์มัล-พาราฟฟินส์ ได้รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการทดลองนี้ ได้หาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.1) ตามสภาวะที่ได้ในข้อ 3.1.3 แปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเป็น 25, 28, 30 และ 33 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง

ผลการทดลองแสดงในตาราง 5ก,5ข,5ค,5ง และรูปที่ 6 ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส เชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถเจริญ

ตารางที่ 4ก ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น 0.7 กรัมต่อลิตร

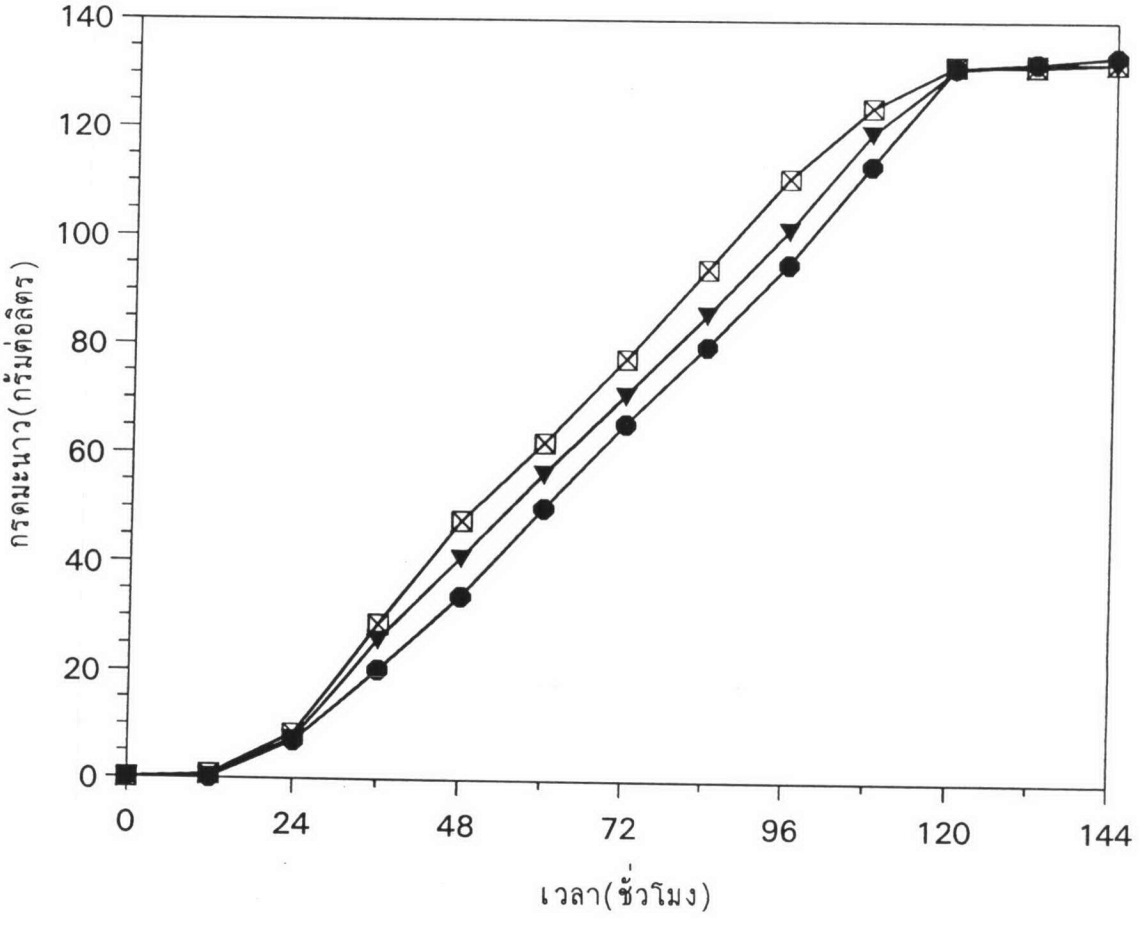
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.50	0.71	0.00	200.10	206.08
12	6.51	4.08	0.04	190.05	195.96
24	6.47	7.88	6.92	174.18	180.99
36	6.44	9.70	20.28	152.22	158.02
48	6.38	11.39	33.80	129.85	135.67
60	6.35	12.60	50.09	109.13	115.01
72	6.29	13.78	65.60	90.40	96.35
84	6.15	14.94	79.91	69.44	75.51
96	5.95	15.62	95.23	51.35	51.28
108	5.50	16.31	113.31	25.40	31.29
120	4.22	16.48	131.49	4.56	10.27
132	3.70	16.52	132.39	1.89	7.11
144	3.54	16.72	133.59	1.89	7.03

ตารางที่ 4ข ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น 1.4 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.50	1.42	0.00	200.10	206.08
12	6.48	4.64	0.27	187.61	193.45
24	6.44	8.58	7.40	170.37	175.88
36	6.40	10.35	25.86	148.08	154.20
48	6.32	11.83	40.94	124.39	130.52
60	6.25	13.20	56.44	103.51	108.60
72	6.20	14.46	70.87	81.30	87.27
84	6.06	15.40	85.88	59.06	65.11
96	5.82	16.29	101.38	38.92	44.85
108	5.34	17.02	119.27	19.16	25.23
120	3.49	17.38	131.20	0.60	6.79
132	3.42	17.25	132.39	0.00	6.10
144	3.40	16.80	132.39	0.00	6.03

ตารางที่ 4ค ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น 2.1 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.51	2.08	0.00	200.10	206.08
12	6.46	5.50	0.67	182.78	188.60
24	6.44	9.14	8.35	161.44	167.52
36	6.35	11.28	28.63	137.41	143.38
48	6.26	13.53	47.71	114.12	120.10
60	6.18	14.67	62.02	92.16	98.22
72	6.10	15.54	77.53	72.83	78.97
84	5.91	16.60	94.23	52.96	58.93
96	5.65	17.38	110.93	33.17	39.09
108	5.03	18.15	124.05	14.81	20.79
120	3.38	18.50	131.80	0.00	6.06
132	3.38	18.32	132.39	0.00	5.90
144	3.36	17.90	131.30	0.00	5.95



รูปที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 0.7 (●), 1.4 (▼)และ 2.1 (⊠) กรัมต่อลิตร

และผลิตกรดมะนาวได้สูงใกล้เคียงกัน โดยได้กรดมะนาวสูงสุด 130.74 และ 130.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อใช้เวลาในการหมัก 120 ชั่วโมง ถ้าเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงให้สูงขึ้นเป็น 30 และ 33 องศาเซลเซียส พบว่าการเจริญของเชื้อลดลงมีผลทำให้การผลิตกรดมะนาวและการใช้น้ำตาลต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิเดียวกันกับที่ใช้เตรียมหัวเชื้อ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 5ก ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

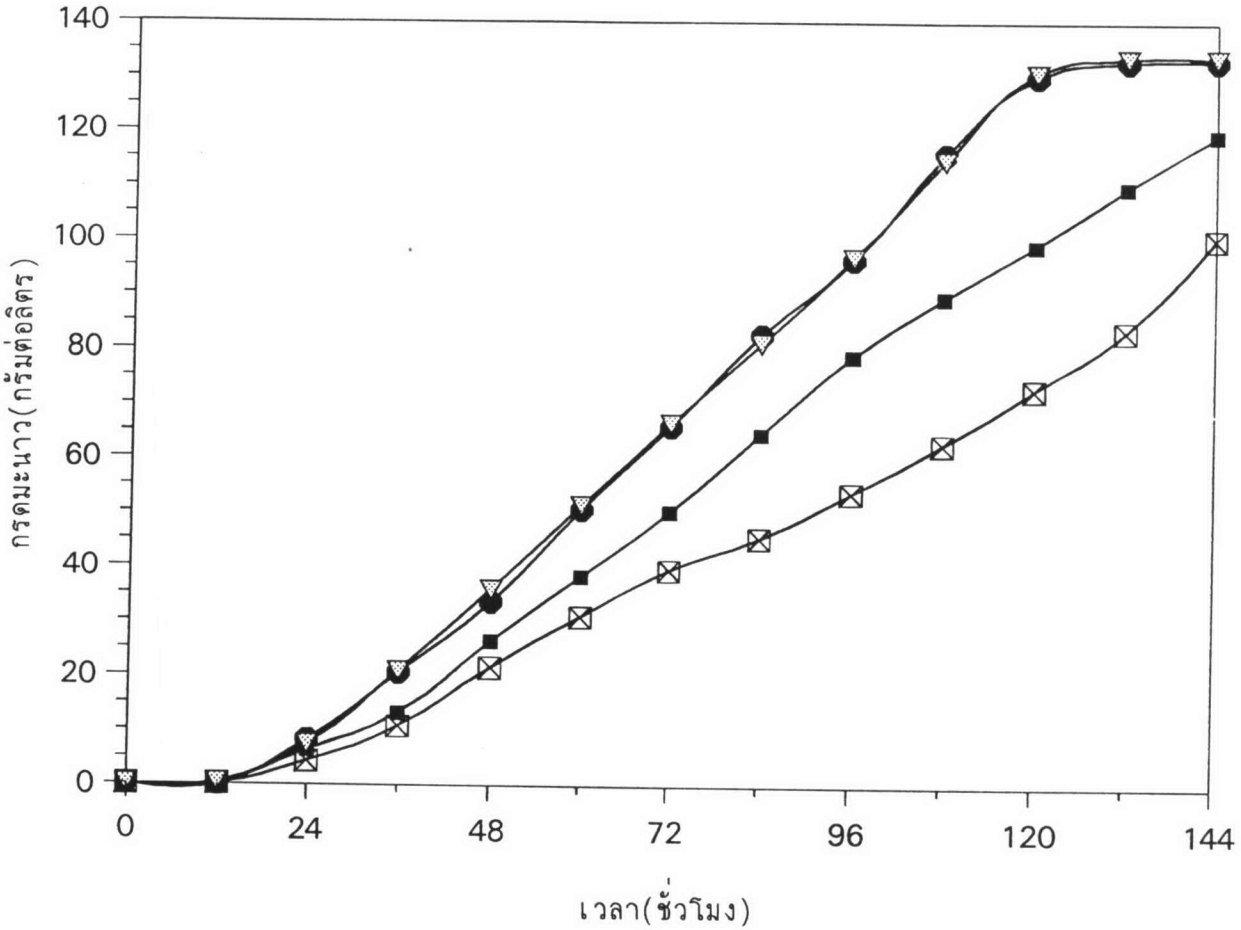
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.40	0.69	0.00	200.44	206.00
12	6.42	4.24	0.04	193.33	199.00
24	6.42	7.86	7.44	173.72	180.21
36	6.40	9.48	20.86	151.11	157.62
48	6.38	10.88	35.78	130.33	136.82
60	6.37	12.22	51.32	108.89	115.01
72	6.34	13.72	66.56	88.89	95.66
84	6.21	14.80	81.11	71.11	77.82
96	6.04	15.42	96.80	50.22	56.72
108	5.51	15.70	114.62	28.44	35.83
120	3.81	16.14	130.74	8.89	15.23
132	3.69	16.60	133.59	1.44	7.04
144	3.50	16.74	133.59	1.44	7.22

ตารางที่ 5ข ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.40	0.69	0.00	200.45	206.00
12	6.41	4.80	0.02	190.22	197.04
24	6.39	8.74	8.23	172.89	179.13
36	6.39	9.96	20.47	149.34	155.25
48	6.38	10.84	33.40	128.00	134.35
60	6.37	11.96	50.48	106.21	113.90
72	6.36	13.22	65.83	86.22	92.95
84	6.23	14.48	82.69	67.78	80.61
96	6.04	15.84	96.36	48.46	54.80
108	5.82	16.02	115.82	29.33	35.83
120	3.90	16.44	130.01	5.87	11.64
132	3.60	16.71	132.88	2.11	8.81
144	3.48	16.86	133.12	1.77	7.70

ตารางที่ 5ง ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.42	0.69	0.00	200.30	206.06
12	6.40	4.66	0.14	188.13	193.81
24	6.40	6.86	4.29	171.39	176.13
36	6.39	8.12	10.73	148.42	154.11
48	6.38	9.38	21.47	128.01	133.94
60	6.38	9.76	32.78	116.88	122.62
72	6.35	10.34	39.36	105.75	111.46
84	6.28	12.76	45.32	96.10	101.48
96	6.23	13.28	53.67	80.89	86.59
108	6.12	13.52	62.64	64.94	70.62
120	6.07	13.78	72.76	46.70	52.35
132	5.84	13.66	83.49	29.43	35.30
144	5.51	13.56	107.35	15.47	19.87



รูปที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 25(▽), 28(●), 30(■) และ 33 (⊠)องศาเซลเซียส

ตารางที่ 5ค ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.42	0.69	0.00	200.30	206.06
12	6.43	4.44	0.30	187.38	193.09
24	6.44	7.32	6.32	171.43	177.22
36	6.43	10.04	13.12	154.57	160.17
48	6.40	11.30	26.24	137.66	143.25
60	6.40	12.62	38.17	118.19	123.80
72	6.34	12.94	50.10	100.18	106.01
84	6.30	13.74	64.41	83.86	89.60
96	6.20	14.32	78.72	64.19	70.29
108	6.12	14.86	89.46	46.66	52.33
120	6.05	15.24	99.00	28.94	34.51
132	5.68	15.66	109.73	13.14	18.76
144	4.16	15.94	119.28	2.49	8.81

I19841697

3.1.5 <u>ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสม</u>

Shah และคณะ(1993)ได้รายงานการแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในช่วง 100-300 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรดมะนาวจากเชื้อ *Y. lypolytica*(DS-1) พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 200 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทดลองเพื่อหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสม โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.2) ตามสภาวะที่ได้ในข้อ 3.1.4 แปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 180,200,220 และ 250 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6ก,6ข,6ค,6ง และรูปที่ 7 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 นั้น ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 200 กรัมต่อลิตร ได้กรดมะนาว 130.82 กรัมต่อลิตรในการหมัก 120 ชั่วโมง เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 180 กรัมต่อลิตร เชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถ ผลิตกรดมะนาวได้ 118.20 กรัมต่อลิตรซึ่งต่ำกว่าเพราะว่าน้ำตาลกลูโคสไม่เพียงพอ แต่ถ้าเพิ่มน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 220 และ 250 กรัมต่อลิตร พบว่าการผลิตกรดมะนาวจะช้ากว่าและมีน้ำตาลกลูโคสเหลือในน้ำหมัก ดังนั้นในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป จึงเลือกใช้ปริมาณเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว 200 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 6ก ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่ใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.47	0.71	0.00	180.64	187.04
12	6.48	4.31	0.03	169.72	176.55
24	6.45	9.70	8.22	143.88	150.17
36	6.40	10.85	21.10	119.43	125.34
48	6.37	11.92	35.78	95.22	101.51
60	6.32	13.16	49.10	76.78	82.02
72	6.21	14.12	62.25	55.84	61.74
84	6.14	14.50	77.50	35.11	41.98
96	6.09	14.78	96.03	16.84	22.41
108	5.32	15.28	115.69	2.41	8.67
120	6.15	15.74	118.20	0.00	6.40
132	6.41	15.80	118.20	0.00	6.52
144	6.72	15.56	118.50	0.00	6.30

ตารางที่ 6ข ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่ใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร

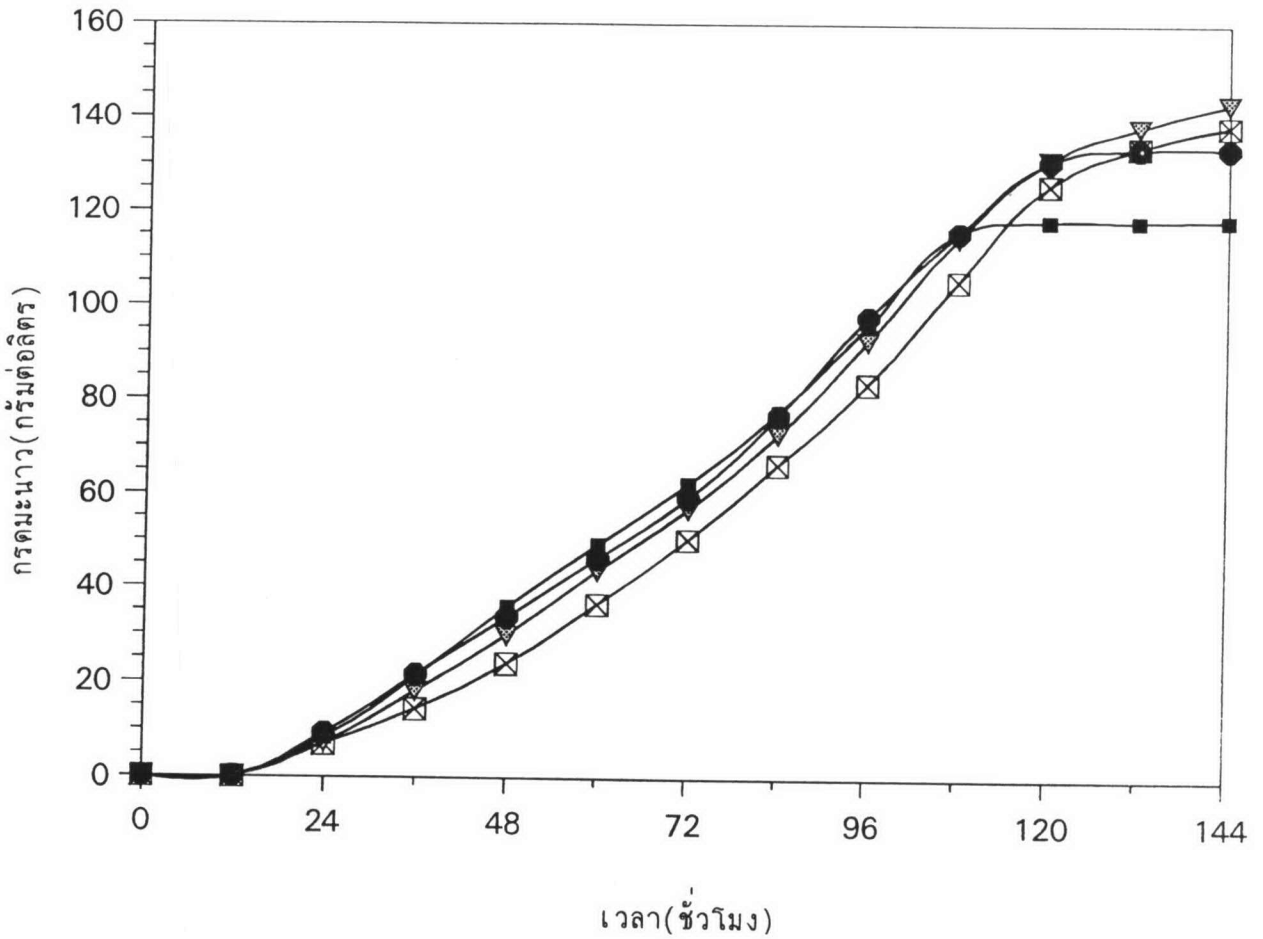
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.44	0.71	0.00	201.14	207.86
12	6.44	4.20	0.03	190.59	196.32
24	6.43	9.50	9.18	171.85	177.57
36	6.41	10.49	21.48	149.47	155.85
48	6.37	11.62	33.59	126.29	132.78
60	6.33	12.75	46.12	104.66	110.85
72	6.23	13.82	59.25	82.43	88.52
84	6.18	14.95	76.87	63.76	70.30
96	6.13	15.98	97.81	41.48	48.19
108	5.34	16.84	115.70	21.05	26.27
120	3.53	16.96	130.82	2.19	9.85
132	3.50	16.92	133.59	0.00	6.43
144	3.42	16.84	133.59	0.00	6.31

ตารางที่ 6ค ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่ใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.41	0.71	0.00	219.75	225.86
12	6.44	3.98	0.00	210.56	216.32
24	6.44	8.82	7.15	194.84	200.99
36	6.43	10.32	18.08	177.51	184.46
48	6.39	11.70	29.82	158.42	165.14
60	6.34	12.81	43.50	136.10	142.86
72	6.25	14.02	56.79	116.21	122.59
84	6.18	14.87	72.82	99.02	105.40
96	6.13	15.92	92.65	79.60	85.61
108	5.66	16.82	114.61	56.10	62.27
120	4.04	16.86	131.20	35.21	41.33
132	3.60	16.90	138.16	27.50	34.02
144	3.48	16.92	143.13	21.89	27.87

ตารางที่ 6ง ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่ใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	6.38	0.71	0.00	249.09	255.64
12	6.39	3.83	0.00	239.79	246.08
24	6.39	8.72	6.80	224.37	230.80
36	6.38	10.02	14.32	206.52	213.40
48	6.37	11.52	23.85	187.89	194.00
60	6.36	12.74	36.68	169.91	175.45
72	6.36	13.76	50.52	149.68	156.51
84	6.32	14.59	66.34	129.61	136.29
96	6.28	15.02	83.49	108.97	115.48
108	6.00	15.84	105.42	90.95	97.52
120	5.36	16.44	125.82	72.68	79.52
132	3.98	16.95	133.89	61.28	67.86
144	3.33	17.26	138.36	53.89	60.70



รูปที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่มีการแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 180(■), 200(●), 220(▼) และ 250(⊠) กรัมต่อลิตร

3.1.6 <u>ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม</u>

Abou-Zeid และคณะ(1984) ได้สรุปชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ ได้แก่ พวกอนินทรีย์ไนโตรเจนเช่น แอมโมเนียมไนเตรต(NH_4NO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$) และยูเรีย(Urea)เป็นต้น เรวดี เลิศไตรรักษ์ (2535) ได้รายงานผลการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 จากนอร์มัล-พาราฟฟินส์พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ แอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 2.0 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงได้ศึกษาแหล่งของอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.3) ใช้สภาวะที่ได้ในข้อ 3.1.5 แปรผันปริมาณของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนแต่ละชนิดเป็น 0.0,1.0,2.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างเมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 8 จากการทดลองพบว่า ชนิดและปริมาณของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว เมื่อใช้เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง เชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงในอาหารที่มีแหล่งของอนินทรีย์ไนโตรเจนปริมาณ 2.0 กรัมต่อลิตร แต่ในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ ได้กรดมะนาวสูงกว่าอาหารที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรตเล็กน้อยและสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ ที่เวลา 120 ชั่วโมงของการหมัก เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์หรือแอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 2.0 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดมะนาวได้ใกล้เคียงกันคือ 130.77 และ 131.20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดอื่นๆ ดังนั้นแหล่งของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 คือแอมโมเนียมคลอไรด์หรือแอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 2.0 กรัมต่อลิตร แต่เนื่องจากแอมโมเนียมไนเตรตมีราคาแพง หาซื้อได้ยาก และเป็นสารที่ห้ามมีไว้ในความครอบครอง จึงไม่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ จึงเลือกใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ปริมาณ 2.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งของอนินทรีย์ไนโตรเจนในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

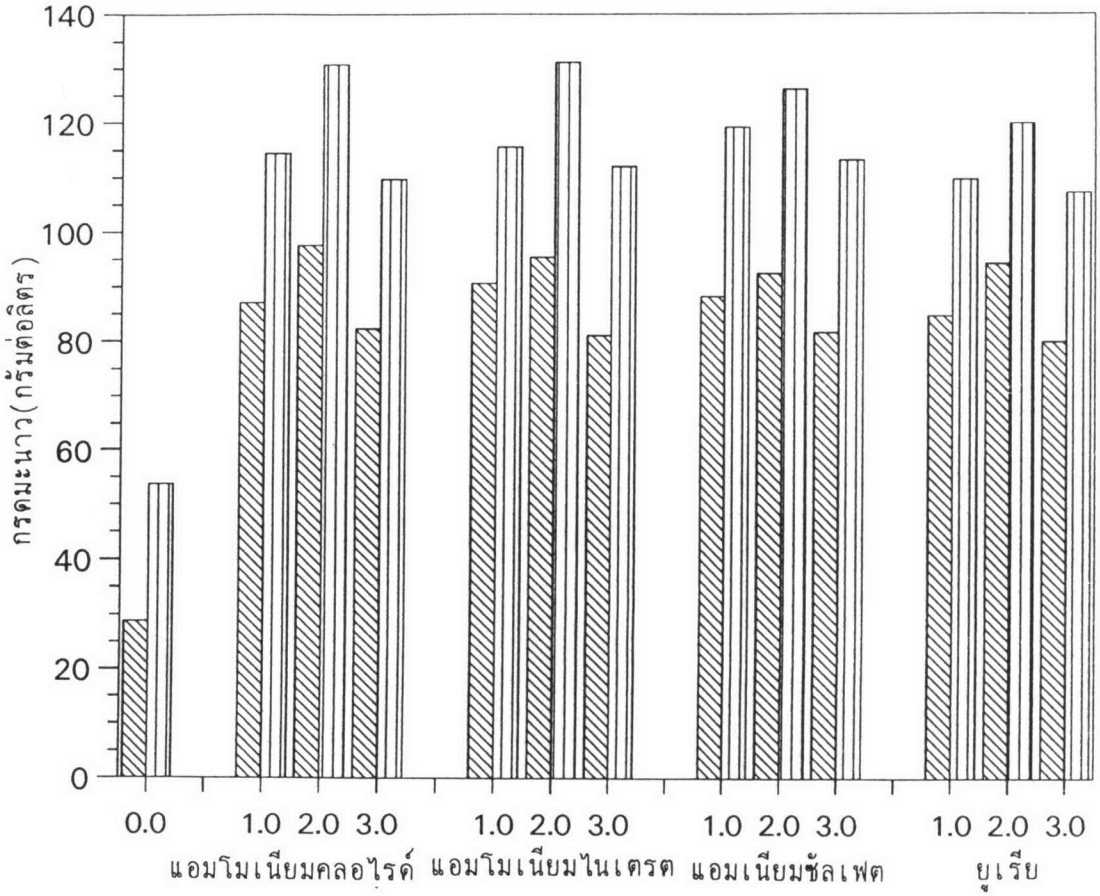
ตารางที่ 7 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

เวลา (ชั่วโมง)	แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
96	ชุดควบคุม	0.0	6.65	4.92	28.82	155.46
	NH_4Cl	1.0	6.19	12.80	87.07	65.30
		2.0	6.05	17.96	97.61	45.78
		3.0	6.02	19.36	82.30	26.62
	NH_4NO_3	1.0	6.33	12.24	90.65	70.34
		2.0	6.30	15.10	95.42	53.02
		3.0	6.24	19.08	81.11	39.94
	$(NH_4)_2SO_4$	1.0	6.53	11.61	88.26	76.98
		2.0	6.38	16.94	92.44	57.21
		3.0	6.32	21.94	81.70	25.75
	ยูเรีย	1.0	6.88	14.70	84.68	82.88
		2.0	6.51	18.42	94.23	46.65
		3.0	6.46	19.64	79.91	38.10

ตารางที่ 7(ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
120	ชุดควบคุม	0.0	6.64	5.42	53.67	130.22
	NH_4Cl	1.0	4.11	13.52	114.50	24.83
		2.0	4.02	19.10	130.77	1.51
		3.0	5.71	22.08	109.73	0.00
	NH_4NO_3	1.0	6.31	13.30	115.69	50.01
		2.0	4.32	16.80	131.20	4.34
		3.0	4.35	19.36	112.12	0.00
	$(NH_4)_2SO_4$	1.0	6.10	12.70	119.28	53.88
		2.0	4.50	19.32	126.20	5.64
		3.0	5.76	22.00	113.31	0.00
	ยูเรีย	1.0	6.61	15.10	109.73	47.03
		2.0	4.17	19.96	120.01	8.92
		3.0	6.16	20.82	107.35	0.00

ชุดควบคุม หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน



<u>รูปที่ 8</u> เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่มีการแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่ระยะเวลาการหมัก 96 (▨)และ 120 (▥)ชั่วโมง

3.1.7 <u>ปริมาณโปแตสเซียมไดไฮเจนฟอสเฟตที่เหมาะสม</u>

ฟอสฟอรัสเป็นสารที่จำเป็นสำหรับเชื้อยีสต์ ในการเจริญและการหมัก Ajinomoto Co.,Inc.(1969) และ Shimizuและคณะ(1970) (อ้างถึงใน Abou-Zeid และคณะ 1984) ได้รายงานว่าโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4) เป็นแหล่งของฟอสฟอรัสที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Candida* เรวดี เลิศไตรรักษ์(2535) ได้รายงานว่าโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารที่มีนอร์มัล-พาราฟฟินส์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้แปรผันปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก2.4) โดยใช้สภาวะที่ได้ในข้อ 3.1.6 แปรผันปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเริ่มต้นในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวเป็น 0.0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างเมื่อใช้เวลาในการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง

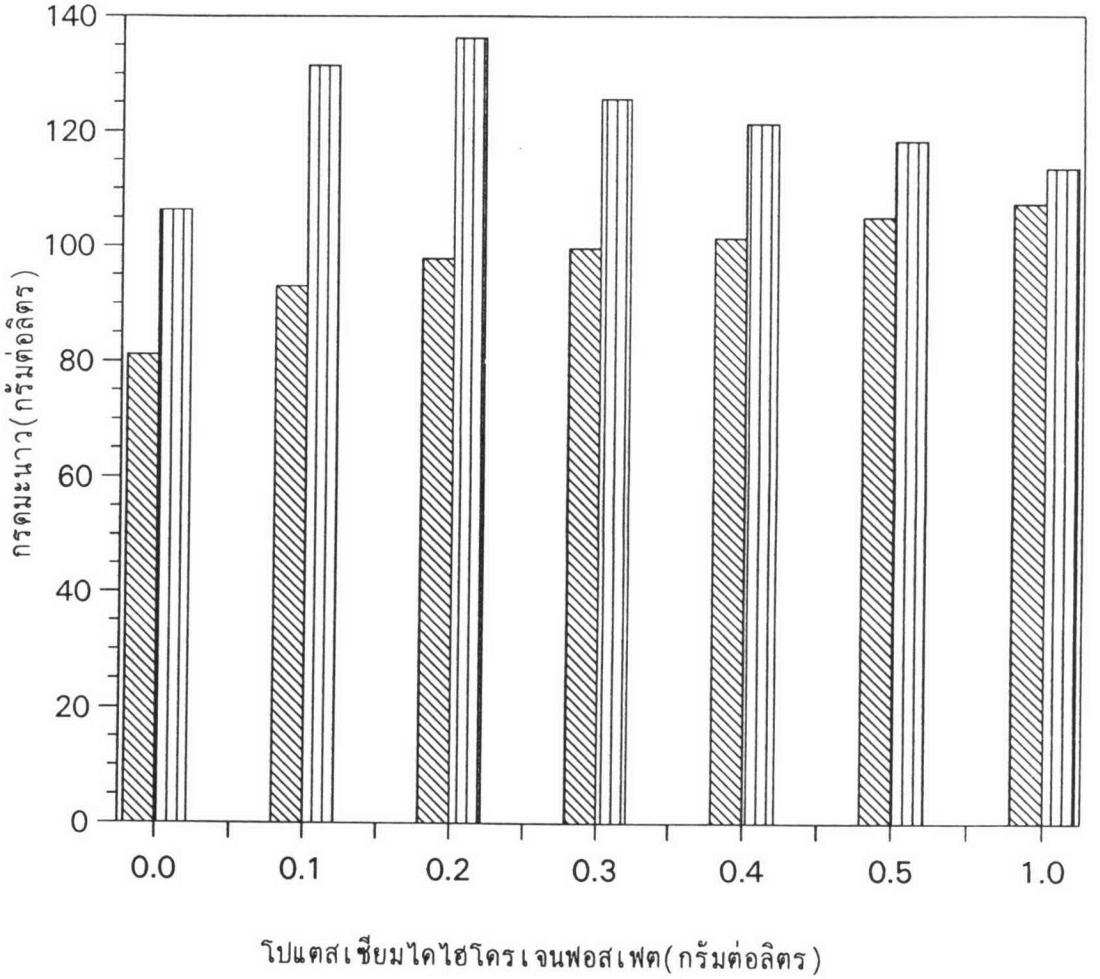
ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 9 จากการทดลองพบว่าปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่เวลา 96 ชั่วโมงของการหมัก ปริมาณกรดมะนาวจะสูงขึ้นตามปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เพิ่มขึ้น แต่ที่เวลา 120 ชั่วโมงของการหมัก เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 136.20 กรัมต่อลิตรในอาหารที่มีโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมากกว่า 0.2 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดมะนาวกลับลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร สำหรับเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

3.1.8 <u>ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตที่เหมาะสม</u>

แมกนีเซียมเป็นธาตุที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิด Shimizu และคณะ(1970) ได้รายงานว่าแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการผลิตกรดมะนาว (อ้างถึงใน Abou-Zeid และคณะ 1984) เรวดี เลิศไตรรักษ์(2535)ได้รายงานว่าปริมาณ

ตารางที่ 8 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

เวลา (ชั่วโมง)	โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
96	0.0	6.41	14.18	81.11	68.44
	0.1	6.20	16.70	93.03	48.89
	0.2	5.98	17.22	97.81	45.33
	0.3	5.90	17.40	99.59	44.45
	0.4	5.85	17.56	101.38	43.12
	0.5	5.75	17.68	104.96	42.67
	1.0	5.66	18.72	107.35	40.01
120	0.0	6.14	18.64	106.27	18.87
	0.1	4.21	19.44	131.42	4.63
	0.2	4.01	19.62	136.20	0.01
	0.3	4.51	19.76	125.58	0.00
	0.4	4.72	19.82	121.19	0.00
	0.5	5.04	19.90	118.21	0.00
	1.0	5.15	21.22	113.50	0.00



รูปที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่มีการแปรผันปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 (▨) และ 120 (▥)ชั่วโมง

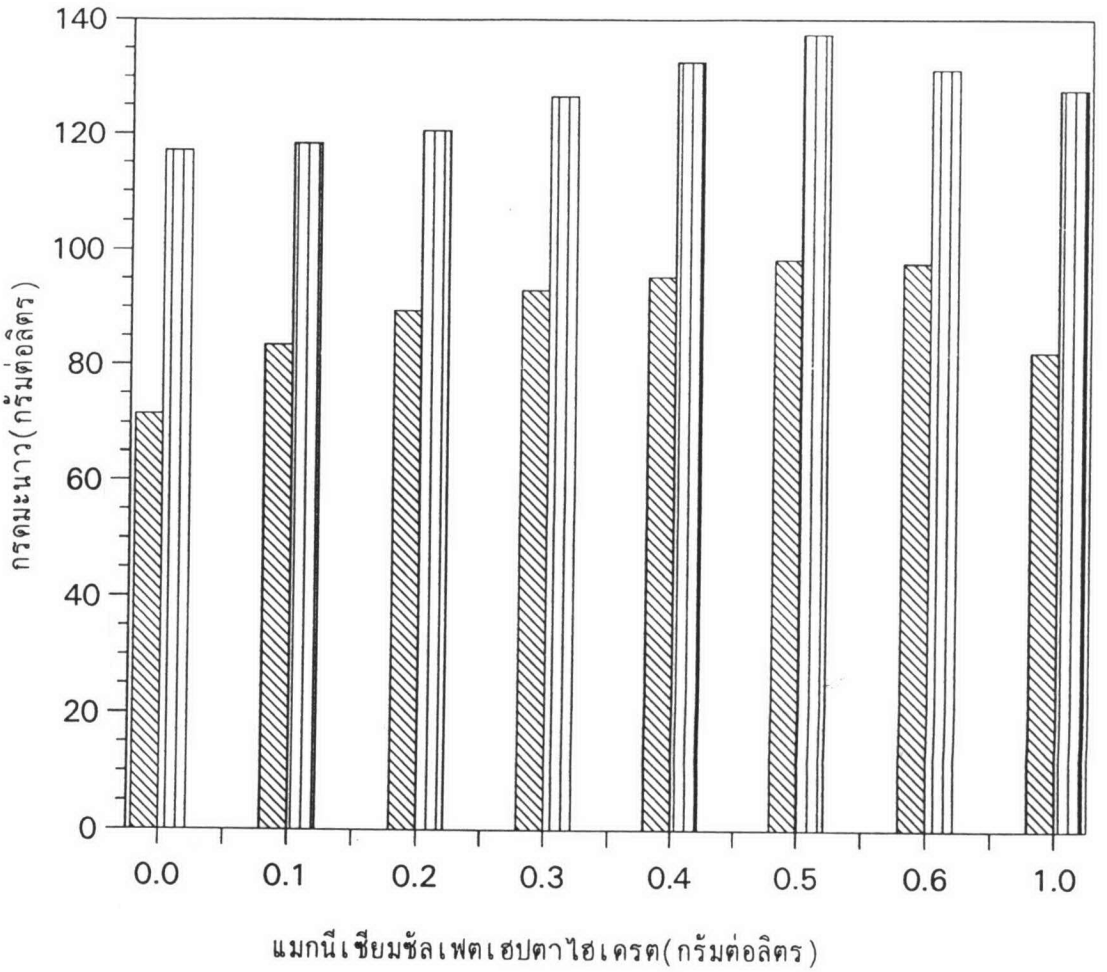
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต($MgSO_4.7H_2O$) ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล-พาราฟฟินส์เท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาเพื่อหาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเริ่มต้นที่เหมาะสม โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.5) โดยใช้สภาวะที่ได้ในข้อ 3.1.7 แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเริ่มต้นเท่ากับ 0.0, 0.1, 0.2, 0.3,0.4, 0.5, 0.6 และ 1.0 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 96 และ 120 ของการหมัก ผลการทดลองแสดงในตาราง 9 และรูปที่ 10 จากการทดลองพบว่า เชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตมะนาวได้สูงสุด 137.40 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเริ่มต้น 0.5 กรัมต่อลิตรในระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต จะทำให้การเจริญของเชื้อเพิ่มสูงขึ้นแต่ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเริ่มต้น 0.5 กรัมต่อลิตร ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

3.1.9 <u>ปริมาณแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตที่เหมาะสม</u>

เรวดี เลิศไตรรักษ์(2535) ได้ศึกษาผลของปริมาณไอออนโลหะหนักที่มีต่อการผลิตกรดมมะนาวจากนอร์มัล-พาราฟฟินส์ พบว่าการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต($MnSO_4.H_2O$)เพียงชนิดเดียวให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้แปรผันปริมาณแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.6) ใช้สภาวะที่ได้ในข้อ 3.1.8 แปรผันปริมาณแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตเริ่มต้นเป็น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4,0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 96 และ 120 ของการหมัก ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 11 จากการทดลองพบว่าการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารที่เติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 136.71 กรัมต่อลิตร ในเวลา 120 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มปริมาณแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตสูงขึ้น การเจริญและการผลิตกรดมะนาวจะลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 9 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่มีการแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต

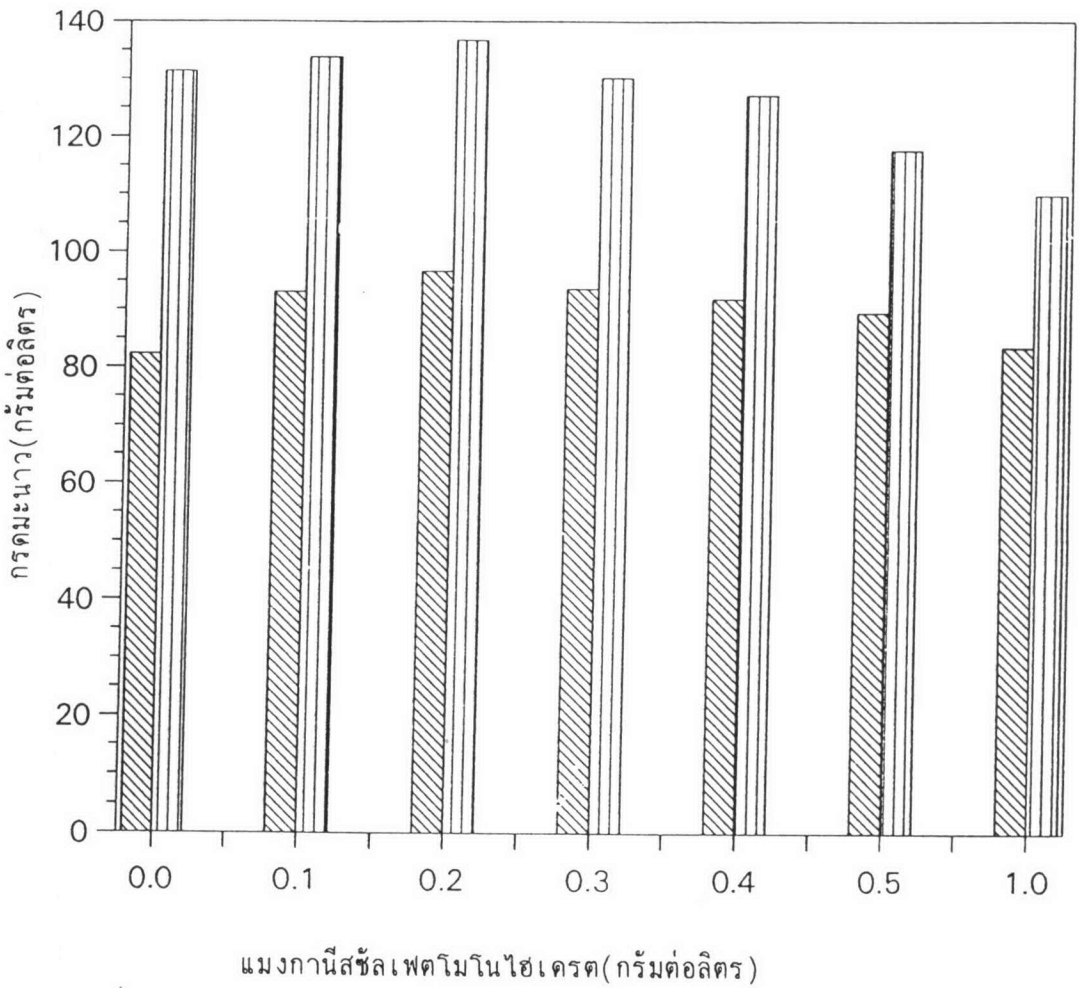
เวลา (ชั่วโมง)	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
96	0.0	6.16	13.58	71.56	68.89
	0.1	6.15	15.26	83.49	57.78
	0.2	6.09	16.42	89.46	54.67
	0.3	6.13	16.96	93.03	51.11
	0.4	6.12	17.06	95.42	48.89
	0.5	6.08	17.22	98.40	46.67
	0.6	6.10	17.54	97.86	44.44
	1.0	6.08	17.80	82.30	42.67
120	0.0	4.07	16.26	117.08	5.22
	0.1	3.86	17.88	118.28	4.72
	0.2	3.88	18.76	120.59	4.66
	0.3	3.90	18.98	126.56	3.92
	0.4	3.81	19.30	132.62	0.00
	0.5	3.95	19.46	137.40	0.00
	0.6	3.97	19.60	131.34	0.00
	1.0	4.01	19.78	127.76	0.00



รูปที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ที่ระยะเวลาการหมัก 96 (▨)และ 120 (▥)ชั่วโมง

ตารางที่ 10 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต

เวลา (ชั่วโมง)	แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
96	0.0	6.29	17.06	82.30	48.17
	0.1	6.13	17.28	93.03	48.25
	0.2	6.11	17.38	96.61	45.83
	0.3	6.07	17.44	93.63	46.67
	0.4	6.11	17.46	91.84	41.42
	0.5	6.09	17.32	89.46	41.83
	1.0	6.10	17.14	83.49	46.67
120	0.0	3.97	19.86	131.34	0.00
	0.1	3.86	19.80	133.73	0.10
	0.2	3.84	19.48	136.71	0.00
	0.3	3.89	19.08	130.15	0.30
	0.4	3.92	18.78	127.16	2.15
	0.5	3.93	18.82	117.61	4.50
	1.0	4.20	18.50	109.85	10.02



รูปที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่มีการแปรผันปริมาณแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ที่ระยะเวลาการหมัก 96 (▨) และ 120 (▥)ชั่วโมง

3.1.10 ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสม

สารสกัดจากยีสต์ใช้เป็นแหล่งของอินทรีย์ไนโตรเจนและเป็นสารที่ช่วยในการเจริญของเชื้อยีสต์เนื่องจากประกอบด้วยวิตามินหลายชนิด จากการศึกษาของ เรวดี เลิศไตรรักษ์(2535) พบว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมคือ 1.0 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงได้ศึกษาปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 โดยใช้สารสกัดจากยีสต์ 2 ชนิดได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO และสารสกัดจากยีสต์ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย(IBGE)

3.1.10.1 สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO

เลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.7) ใช้สภาวะที่ได้ในข้อ 3.1.9 แปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นเป็น 0.0, 0.5,1.0,1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างเมื่อใช้เวลาในการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 12 จากการทดลองพบว่า เชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 137.12 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง ส่วนการเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดจากยีสต์

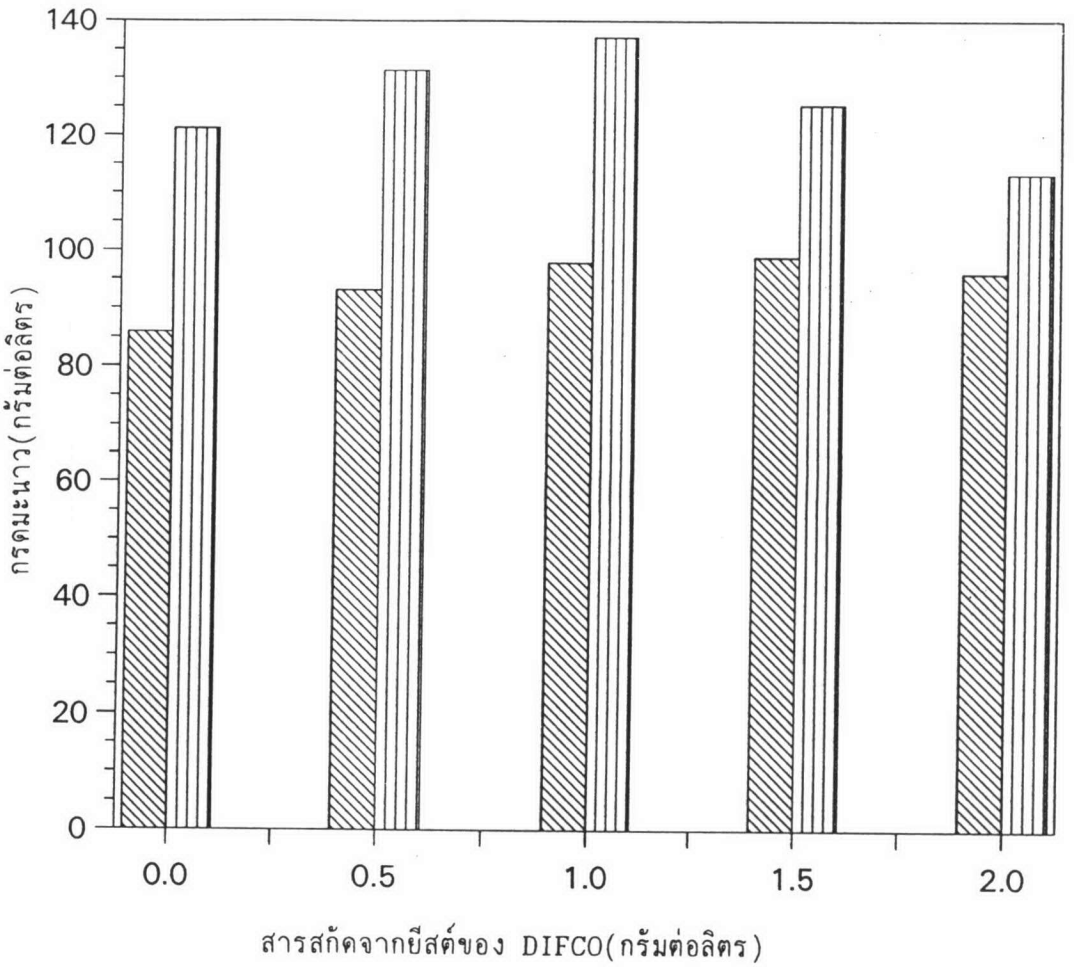
3.1.10.2 สารสกัดจากยีสต์ของ IBGE

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ผลิตขึ้นโดยสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73ในสภาวะเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1.10.1 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 13 จากการทดลองพบว่า เชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 131.20 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีสารสารสกัดจากยีสต์ของ IBGE 1.0 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการหมัก 120 ชั่วโมง แต่การผลิตกรดมะนาวจะช้าและต่ำกว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO(ชุดควบคุม)ไม่มากนัก

ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO ปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตร ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 11 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO

เวลา (ชั่วโมง)	สารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
96	0.0	6.20	16.18	85.88	57.20
	0.5	6.18	17.32	93.13	45.71
	1.0	6.12	17.84	97.91	46.64
	1.5	6.00	18.80	98.92	48.93
	2.0	5.94	20.14	96.12	45.80
120	0.0	4.16	16.82	121.19	7.31
	0.5	4.12	18.16	131.34	0.20
	1.0	4.04	19.34	137.12	0.01
	1.5	4.17	20.36	125.37	0.01
	2.0	4.22	21.44	113.43	0.00

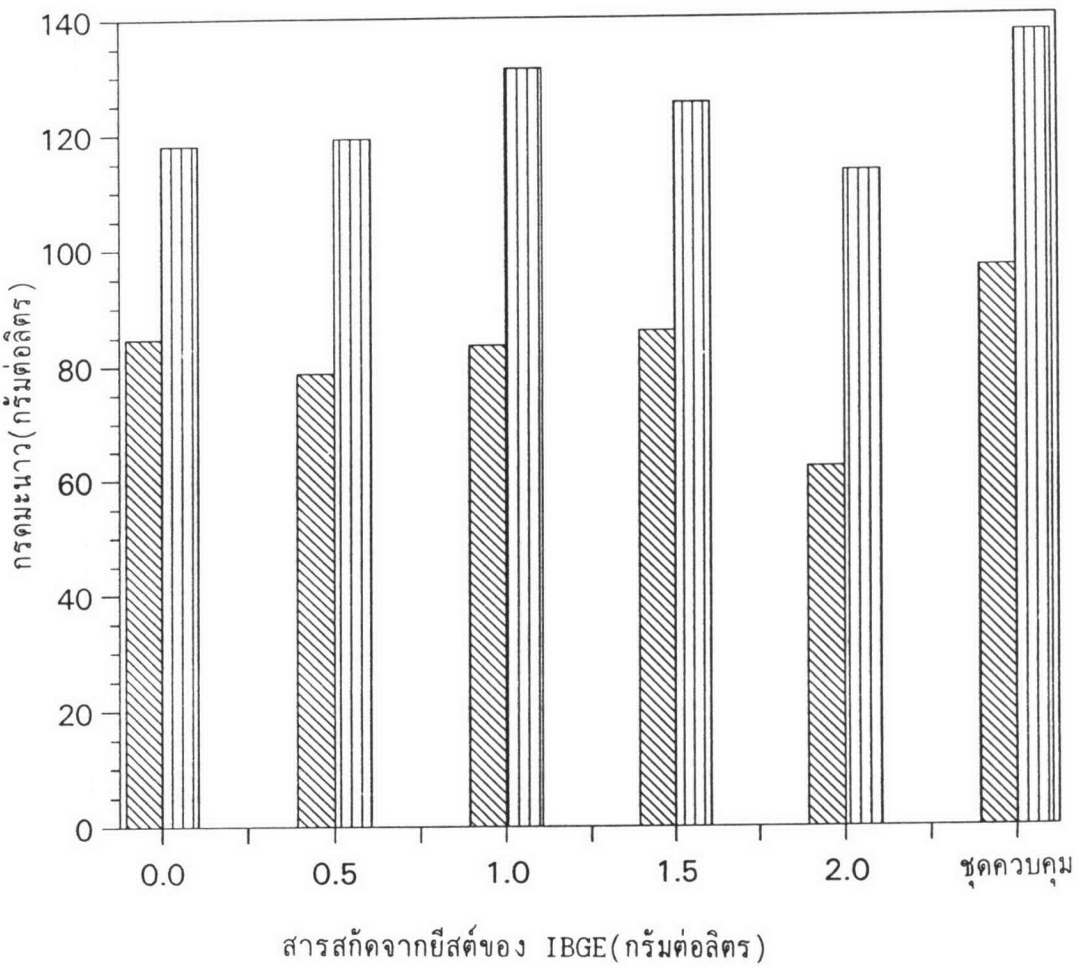


รูปที่ 12 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่มีการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO ที่ระยะเวลาการหมัก 96 (▨)และ 120 (▥)ชั่วโมง

ตารางที่ 12 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่มีการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ของ IBGE

เวลา (ชั่วโมง)	สารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
96	0.0	6.18	15.58	84.68	61.33
	0.5	6.07	17.10	78.72	58.22
	1.0	6.01	18.06	83.49	57.78
	1.5	5.89	18.82	85.88	58.67
	2.0	5.90	19.74	62.02	59.56
	ชุดควบคุม	6.13	17.9	96.61	48.44
120	0.0	4.28	16.38	118.08	4.76
	0.5	4.58	19.16	119.28	1.64
	1.0	4.76	20.18	131.20	2.93
	1.5	4.24	21.60	125.24	0.36
	2.0	4.57	22.74	113.31	0.04
	ชุดควบคุม	4.03	19.42	137.17	0.00

ชุดควบคุม ใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO 1.0 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 13 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่มีการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ของ IBGE ที่ระยะเวลาการหมัก 96 (▨)และ 120 (▥)ชั่วโมง

3.1.11 ผลของเหล็กซัลเฟต

เหล็กไอออนเป็นสารที่จำเป็น สำหรับการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเตส Furukawa และคณะ(1977) ได้รายงานว่าการเพิ่มปริมาณเหล็กซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เชื้อยีสต์ผลิตกรดไอโซซิตริกสูงขึ้นและผลิตกรดมะนาวลดลง ดังนั้นในการทดลองนี้ต้องการศึกษาปริมาณเหล็กซัลเฟตที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.8) ใช้สภาวะที่ได้ในข้อ 3.1.10 แปรผันปริมาณเหล็กซัลเฟตเป็น 0.000, 0.001, 0.005, 0.010 และ 0.100 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างในระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 14 จากการทดลองพบว่าเชื้อ *C. oleophila* C-73 ผลิตกรดมะนาวได้ลดลงเมื่อเติมเหล็กซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการเติมเหล็กซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว

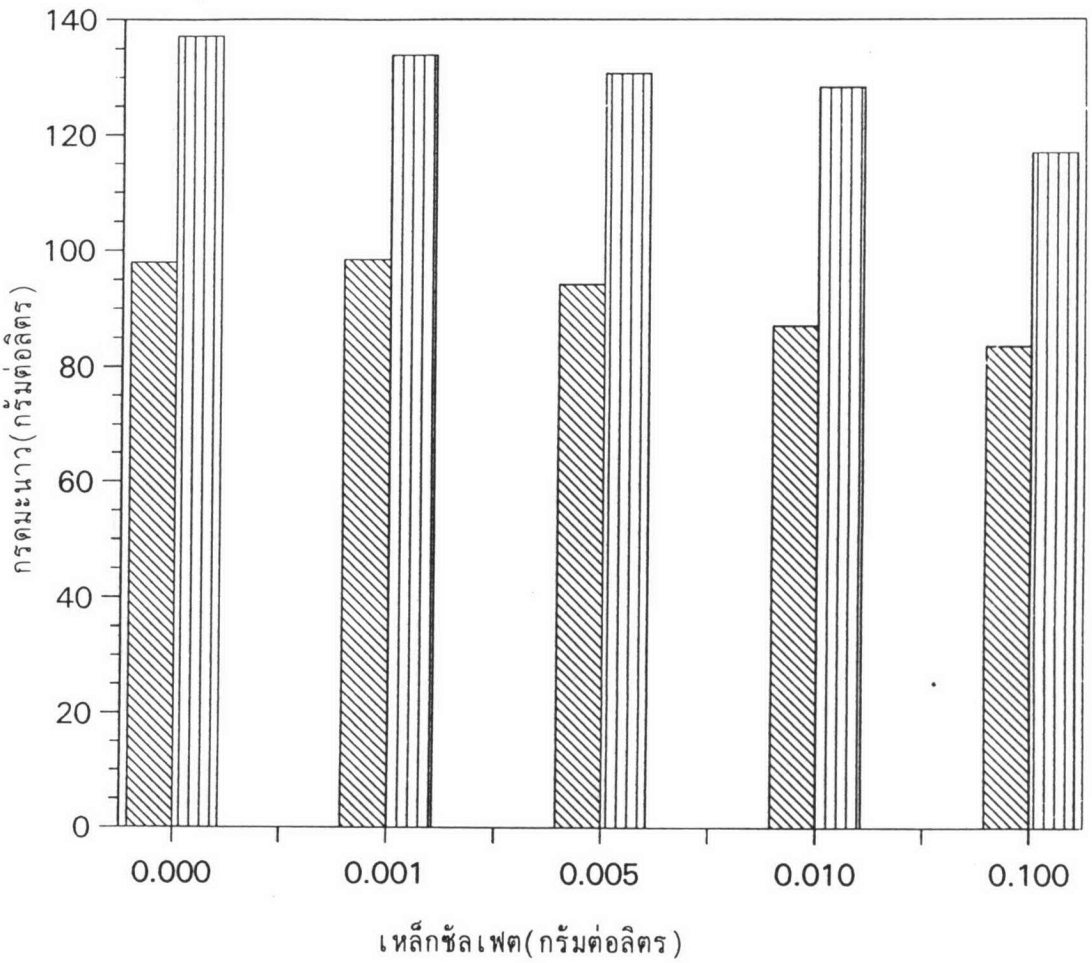
3.1.12 ผลของปริมาณไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์

Kubicek และRohr(1986) ได้รายงานว่า เชื้อยีสต์ต้องการไธอะมีนสำหรับการสะสมกรดมะนาว ในการทดลองที่ผ่านมาได้เลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งในสารสกัดจากยีสต์นั้นมีสารอื่นหลายชนิดรวมทั้งไธอะมีนด้วย ในการทดลองนี้ ต้องการศึกษาผลของปริมาณไธอะมีนเพียงอย่างเดียว โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.9) ใช้สภาวะที่ได้ในข้อ 3.1.10 โดยไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ แปรผันปริมาณไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์เป็น 0.000, 0.001, 0.005, 0.010, 0.050, 0.100 กรัมต่อลิตร และชุดควบคุมเติมสารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างในระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 14 และรูปที่ 15 จากการทดลองพบว่าเชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 134.78 กรัมต่อลิตรในอาหารที่มีไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ 0.001 และ 0.005 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง แต่ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดที่ได้จะต่ำกว่าชุดควบคุมซึ่งเติมสารสกัดจากยีสต์ ในด้านการเจริญของเชื้อพบว่าต่ำกว่าชุดควบคุมเช่นกัน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์เหมือนเดิม

ตารางที่ 13 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเหล็กซัลเฟต

เวลา (ชั่วโมง)	เหล็กซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
96	0.000	5.93	17.08	97.99	45.62
	0.001	5.84	17.46	98.40	44.08
	0.005	5.89	17.38	94.23	44.83
	0.010	5.97	17.40	87.07	42.40
	0.100	5.95	17.06	83.49	43.26
120	0.000	3.76	19.14	137.17	0.02
	0.001	4.03	19.66	133.94	0.40
	0.005	4.12	19.92	130.74	0.12
	0.010	4.36	19.76	128.36	0.08
	0.100	4.08	18.86	116.89	0.12

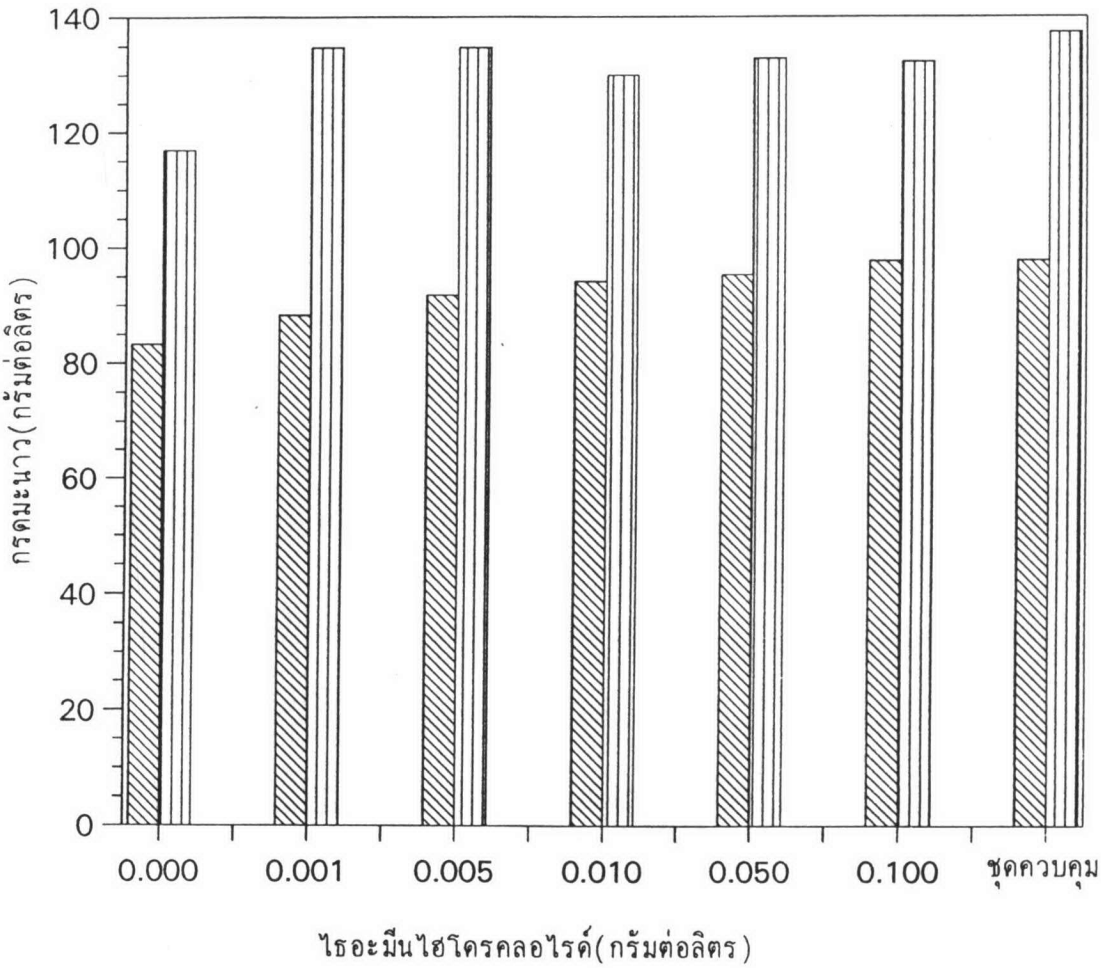


รูปที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเหล็กซัลเฟต ที่ระยะเวลาการหมัก 96 (▨)และ 120 (▥)ชั่วโมง

ตารางที่ 14 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์

เวลา (ชั่วโมง)	ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
96	0.000	6.21	15.69	83.26	58.99
	0.001	6.18	15.84	88.26	51.44
	0.005	6.22	16.01	91.23	52.09
	0.010	6.20	15.96	94.23	46.42
	0.050	6.15	16.00	95.42	41.31
	0.100	6.20	15.82	97.81	37.55
	ชุดควบคุม	5.98	17.92	97.61	43.42
120	0.000	4.89	16.40	116.89	6.78
	0.001	4.25	16.64	134.78	5.45
	0.005	3.99	16.90	134.78	0.00
	0.010	3.82	17.46	130.01	0.00
	0.050	3.84	17.66	132.85	0.00
	0.100	3.81	17.76	132.39	0.00
	ชุดควบคุม	3.98	19.88	137.36	0.00

ชุดควบคุม เติมสารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ระยะเวลาการหมัก 96 (▨)และ 120 (▥)ชั่วโมง

3.1.13 ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อผลิตกรดมะนาว การสะสมกรดทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว เกิดเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงได้มีการเติมสารบางชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ สารที่นิยมใช้ในระดับขวดเขย่าได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณที่ใช้ขึ้นกับปริมาณกรดมะนาวที่เชื้อผลิตขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้ต้องการศึกษาเพื่อหาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.10) ใช้สภาวะที่ได้ในข้อ 3.1.10 แปรผันปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเป็น 80,90,100,110 และ 120 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างในระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 16 จากการทดลองพบว่าในระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง เชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงใกล้เคียงกันเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต 100-120 กรัมต่อลิตร แสดงว่าการใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตรเพียงพอสำหรับการผลิตกรดมะนาวดังนั้นจึงเลือกใช้แคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร เป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในการผลิตกรดมะนาวต่อไป

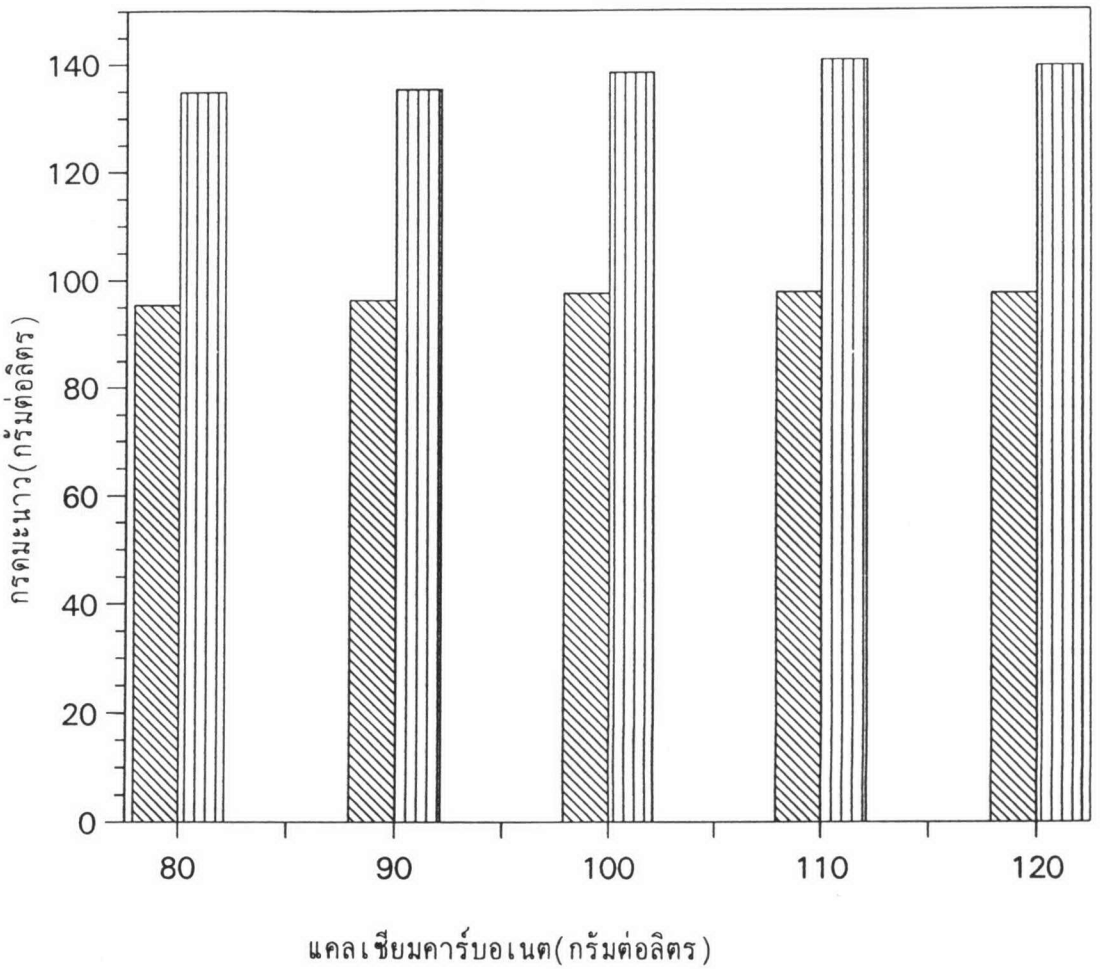
3.1.14 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ(ภาคผนวก ก1.1)ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที ใช้หัวเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์แห้งเริ่มต้น 0.7 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวซึ่งในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 200.0 กรัม แอมโมเนียมคลอไรด์ 2.0 กรัม โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.5 กรัม แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.2 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัม และแคลเซียมคาร์บอเนต 100.0 กรัม (ภาคผนวก ก2.11)เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที

เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 17 จากการทดลองพบว่าเชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 138.36 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เวลาในการหมัก 120 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 68.92 เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป

ตารางที่ 15 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต

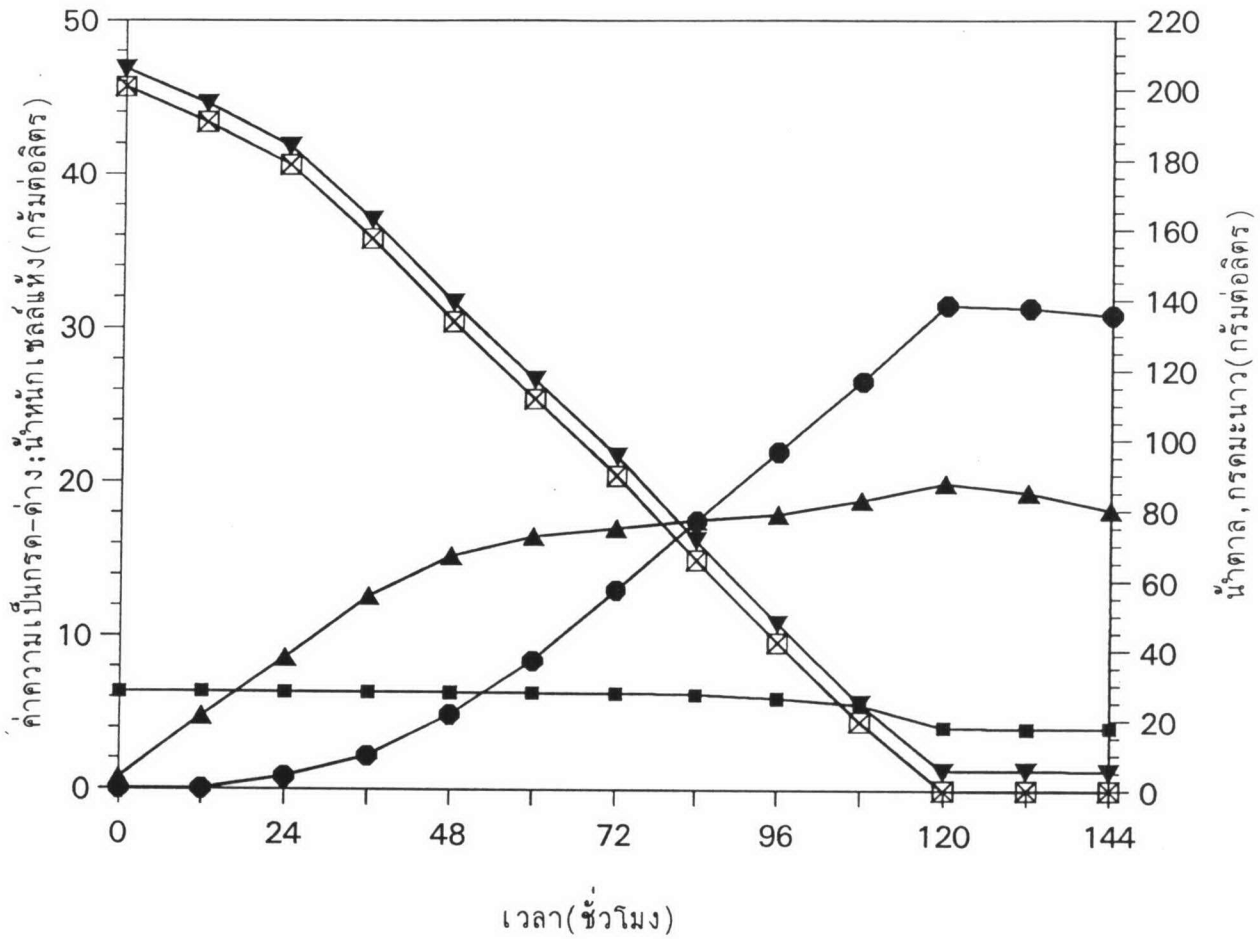
เวลา (ชั่วโมง)	แคลเซียมคาร์บอเนต (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
96	80	5.03	19.00	95.42	40.25
	90	5.57	18.84	96.35	42.82
	100	6.02	18.36	96.61	44.52
	110	6.17	18.14	97.81	42.34
	120	6.28	17.80	97.60	42.72
120	80	3.11	19.78	134.78	5.75
	90	3.32	20.04	135.24	0.43
	100	3.98	19.84	138.36	0.00
	110	6.23	19.20	140.74	0.00
	120	6.43	18.70	139.55	0.00



รูปที่ 16 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มี การแปรผันปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ที่ระยะเวลาการหมัก 96 (▨)และ 120 (▥)ชั่วโมง

ตารางที่ 16 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและผลผลิต ในช่วงระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว ในระดับขวดเขย่า

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (ร้อยละ)
0	6.37	0.70	0.00	200.77	205.98	0.00
12	6.39	4.76	0.04	190.72	196.02	0.36
24	6.37	8.58	3.58	178.69	183.98	16.21
36	6.36	12.60	9.54	157.36	162.81	21.98
48	6.33	15.22	21.47	133.78	139.16	32.05
60	6.30	16.46	36.98	111.81	117.35	41.57
72	6.28	17.02	57.25	89.78	95.32	51.58
84	6.20	17.54	76.95	65.91	71.50	57.06
96	5.96	17.92	96.61	42.22	47.78	60.93
108	5.54	18.81	116.89	19.56	24.84	64.51
120	4.07	19.92	138.36	0.01	5.45	68.92
132	3.98	19.34	137.62	0.00	5.63	68.85
144	4.03	19.18	135.59	0.00	5.31	67.53



รูปที่ 17 แสดงปริมาณกรดมะนาว(●), น้ำหนักเซลล์แห้ง(▲), ค่าความเป็นกรด-ด่าง (■),น้ำตาลกลูโคส(⊠)และน้ำตาลรีดิวส์(▼) ในช่วงระยะเวลาต่างๆของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว ในระดับขวดเขย่า

3.2 <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร</u>

จากการทดลองในข้อ 3.1 ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในระดับขวดเขย่า จึงได้นำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว ได้แก่ การเพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ด่างแก่ อัตราการกวน และปริมาณเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสในแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว

3.2.1 <u>การเจริญและการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร</u>

เลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ(ภาคผนวก ก1.1)ตามวิธีในข้อ 2.2.3.3 นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อ(ภาคผนวก ก2.12) ตามวิธีการในข้อ 2.2.3.4 เลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ควบคุมอัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 18 จากการทดลองพบว่าเชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง 136.28 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมงคิดเป็นผลผลิตร้อยละ 68.37 เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปและปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดในน้ำหมักที่เหลือเท่ากับ 354.33 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้ในระดับขวดเขย่า(ข้อ 3.1.14) จะเห็นว่าการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก เชื้อสามารถเจริญและผลิตกรดมะนาวได้เร็วกว่าในระดับขวดเขย่า คือลดระยะเวลาการหมักจาก 120 ชั่วโมง เป็น 96 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณกรดมะนาวใกล้เคียงกัน

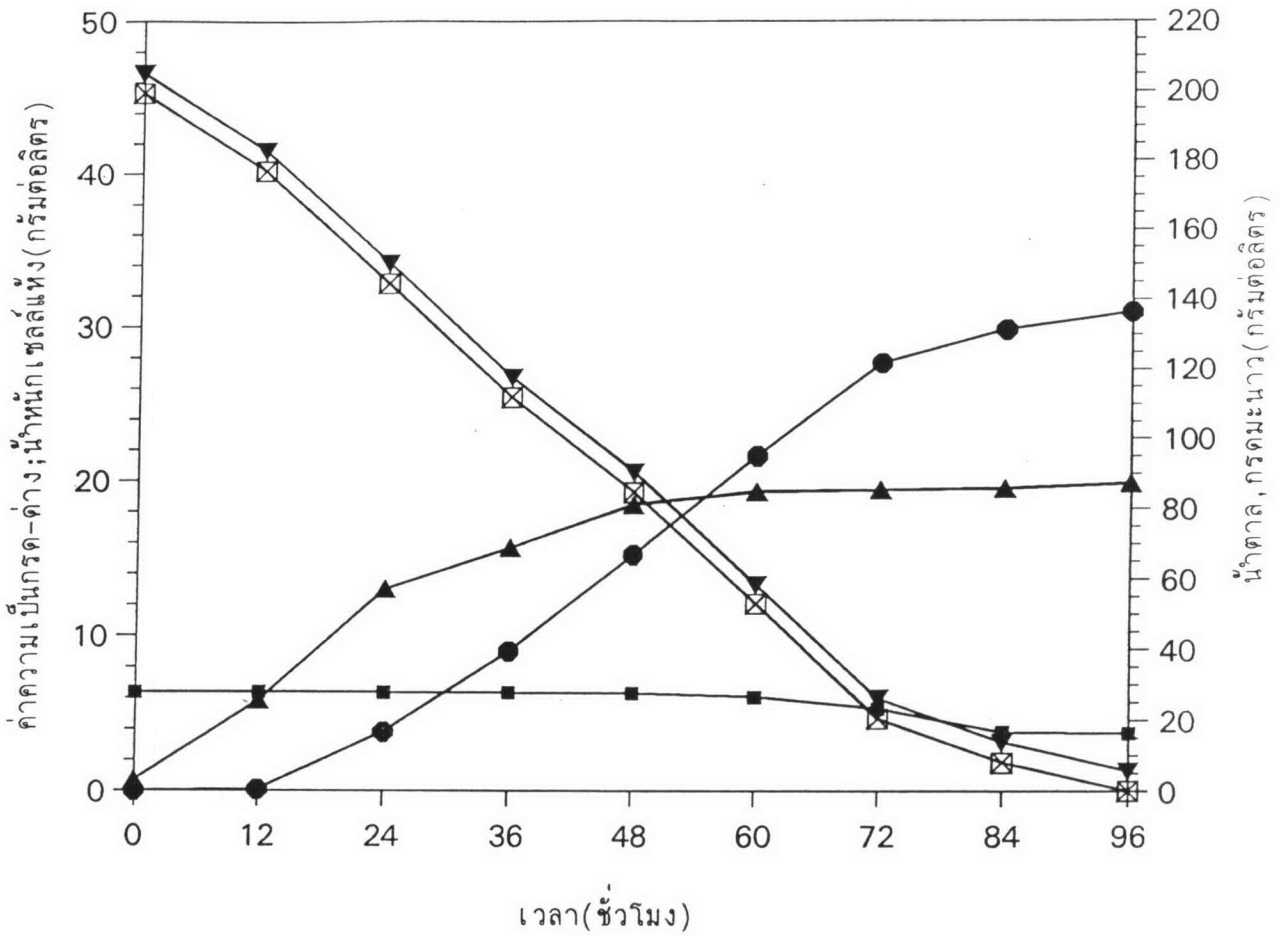
ตารางที่ 17 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและผลผลิต ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (ร้อยละ)
0	6.37	0.68	0.00	199.33	205.04	-
12	6.36	5.82	0.30	176.69	182.65	1.32
24	6.33	12.99	16.70	144.24	150.19	30.31
36	6.30	15.62	39.36	111.78	117.49	44.96
48	6.26	18.42	66.79	84.54	90.38	58.18
60	6.03	19.26	94.96	52.89	58.39	64.84
72	5.28	19.36	121.66	20.42	26.11	68.00
84	3.78	19.47	131.20	8.01	13.73	68.58
96	3.70	19.81	136.28	0.00	5.68	68.37

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือประมาณ 2,600 มิลลิลิตร

ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมด = 136.28 x 2.6

= 354.33 กรัม



รูปที่ 18 แสดงปริมาณกรดมะนาว(●), น้ำหนักเซลล์แห้ง(▲), ค่าความเป็นกรด-ด่าง (■), น้ำตาลกลูโคส(⊠)และน้ำตาลรีดิวส์(▼) ในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

3.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต

จากการทดลองในข้อ 3.2.1 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำหมักลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง โดยเฉพาะหลังจากชั่วโมงที่ 72 ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงต่ำมากคือประมาณ 3.7 ซึ่งแสดงว่าปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตรไม่เพียงพอ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้นเป็น 120 กรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก2.13) ใช้สภาวะในการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับในข้อ 3.2.1

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 18 และรูปที่ 19 จากการทดลองพบว่าการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารที่เพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเป็น 120 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างจะไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองในข้อ 3.2.1 จะเห็นว่าการใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 120 กรัมต่อลิตร เชื้อ *C. oleophila* C-73 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีกว่าโดยเฉพาะที่ 72 และ 84 ชั่วโมง มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด และสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 138.74 กรัมต่อลิตรในระยะเวลาการหมัก 84 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 68.96 เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงได้เพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเป็น 120 กรัมต่อลิตร

3.2.3 ผลการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ด่างแก่

จากการทดลองในข้อ 3.2.2 ซึ่งใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ การใช้สารดังกล่าวจะทำให้น้ำหมักมีสีขาวขุ่นทำให้ยากต่อการให้อากาศ การกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ และการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก (Cartledge,1987) การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ในระดับถังหมัก นอกจากใช้แคลเซียมคาร์บอเนตแล้ว ยังมีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ด่างแก่เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นต้น ดังนั้นในการทดลองนี้ต้องการศึกษา ผลการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.4 ซึ่งเท่ากับค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงเริ่มต้น ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนต

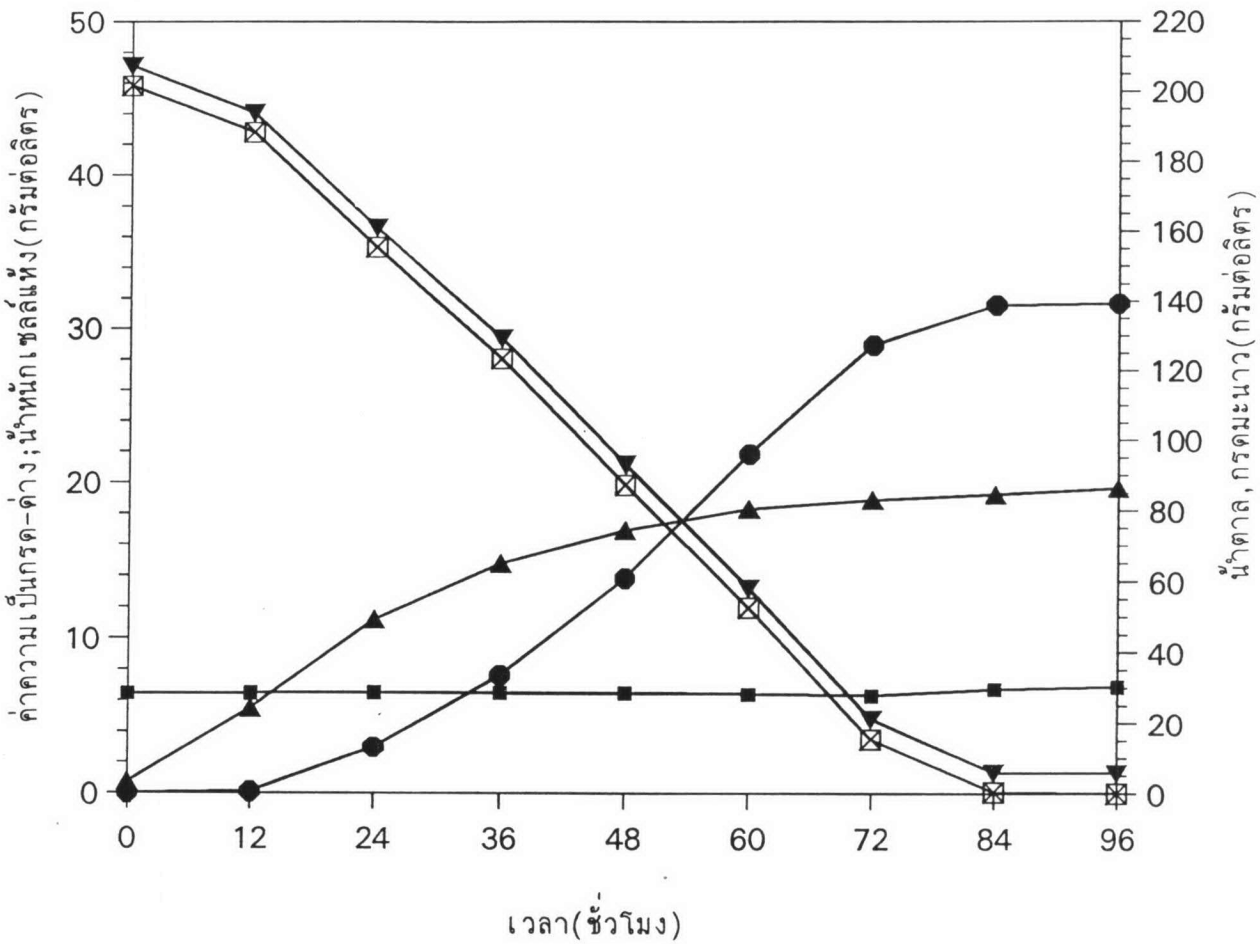
ตารางที่ 18 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและผลผลิต ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต 120 กรัมต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (ร้อยละ)
0	6.45	0.69	0.00	201.01	206.74	-
12	6.46	5.51	0.42	188.22	193.74	3.15
24	6.50	11.18	13.12	155.35	160.97	28.39
36	6.48	14.75	33.40	123.33	129.25	42.69
48	6.48	16.89	60.83	87.22	93.07	53.20
60	6.41	18.28	95.99	52.56	58.02	64.42
72	6.32	18.86	127.20	15.42	21.18	68.34
84	6.72	19.22	138.74	0.38	5.84	68.96
96	6.88	19.63	139.17	0.00	5.61	69.05

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือประมาณ 2,600 มิลลิลิตร

ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมด = 139.17 x 2.6

= 361.84 กรัม



รูปที่ 19 แสดงปริมาณกรดมะนาว(●), น้ำหนักเซลล์แห้ง(▲), ค่าความเป็นกรด-ด่าง (■), น้ำตาลกลูโคส(⊠)และน้ำตาลรีดิวส์(▼) ในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต 120 กรัมต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

3.2.3.1 <u>การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์</u>

Nakanishi และคณะ(1972)ได้ศึกษาการผลิตกรดมะนาวในถังหมักควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5.5-6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล Wojtatowicz และคณะ(1991) ได้รายงานผลการผลิตกรดมะนาว โดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอลเช่นกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ(ภาคผนวก ก1.1) ตามวิธีการในข้อ 2.3.3.2 นำหัวเชื้อที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.14) ในถังหมักขนาด 5 ลิตรให้มีปริมาณอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ตามวิธีการในข้อ 2.2.3.4 ควบคุมอัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 19 และรูปที่ 20 พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ช้าและปริมาณที่ต่ำกว่า การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต

3.2.3.2 <u>การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์</u>

Rottigni และ Cardini(1981) ได้รายงานผลการผลิตกรดมะนาวโดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งได้ผลดีเช่นกัน ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงได้ศึกษาการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในระหว่างการหมักด้วยการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ(ภาคผนวก ก1.1) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2.3.2 นำหัวเชื้อที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว(ภาคผนวก ก2.15) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้มีอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ตามวิธีการข้อ 2.2.3.4 ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.4 ตลอดการทดลองด้วยการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 20 และรูปที่ 21 พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 118.08 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดในน้ำหมักที่เหลือเท่ากับ 354.24

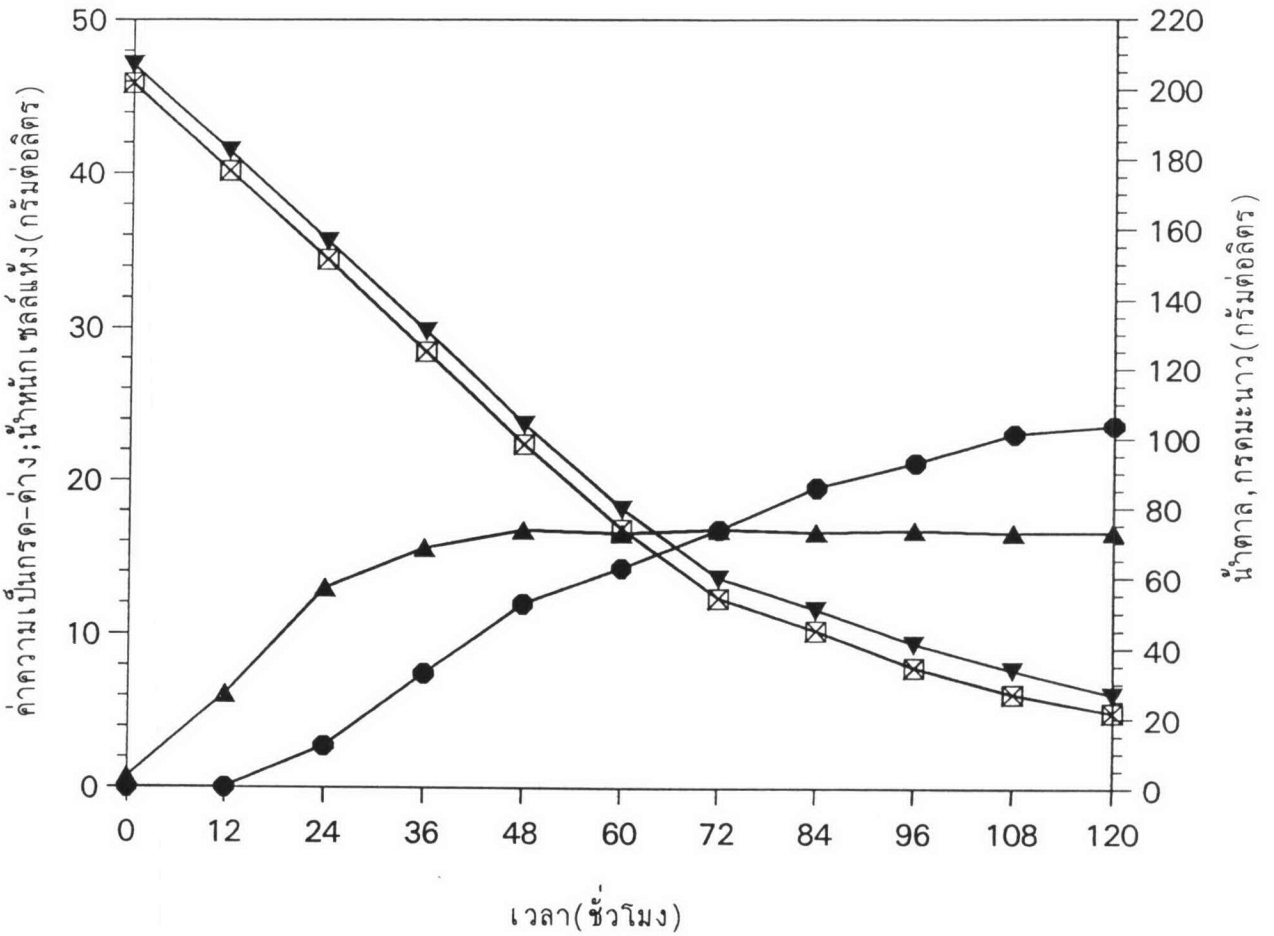
ตารางที่ 19 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาตร 10 N NaOH ที่ใช้ไป (มิลลิลิตร)
0	0.69	0.00	201.93	207.22	-
12	6.11	0.06	176.69	182.44	15.00
24	12.94	11.93	151.45	156.66	86.08
36	15.53	32.80	125.01	131.09	176.11
48	16.74	52.48	98.34	104.32	263.64
60	16.53	62.62	73.92	79.89	337.47
72	16.78	73.72	54.09	59.92	392.18
84	16.61	85.88	45.07	51.03	440.08
96	16.73	93.03	34.62	41.24	482.11
108	16.54	101.38	27.04	33.88	512.26
120	16.60	103.77	21.64	26.72	527.56

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือประมาณ 3,200 มิลลิลิตร

ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมด = 103.77 x 3.2

= 332.06 กรัม



รูปที่ 20 แสดงปริมาณกรดมะนาว(●), น้ำหนักเซลล์แห้ง(▲),น้ำตาลกลูโคส(⊠)และน้ำตาลรีดิวส์(▼)ในระยะเวลาต่างๆของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

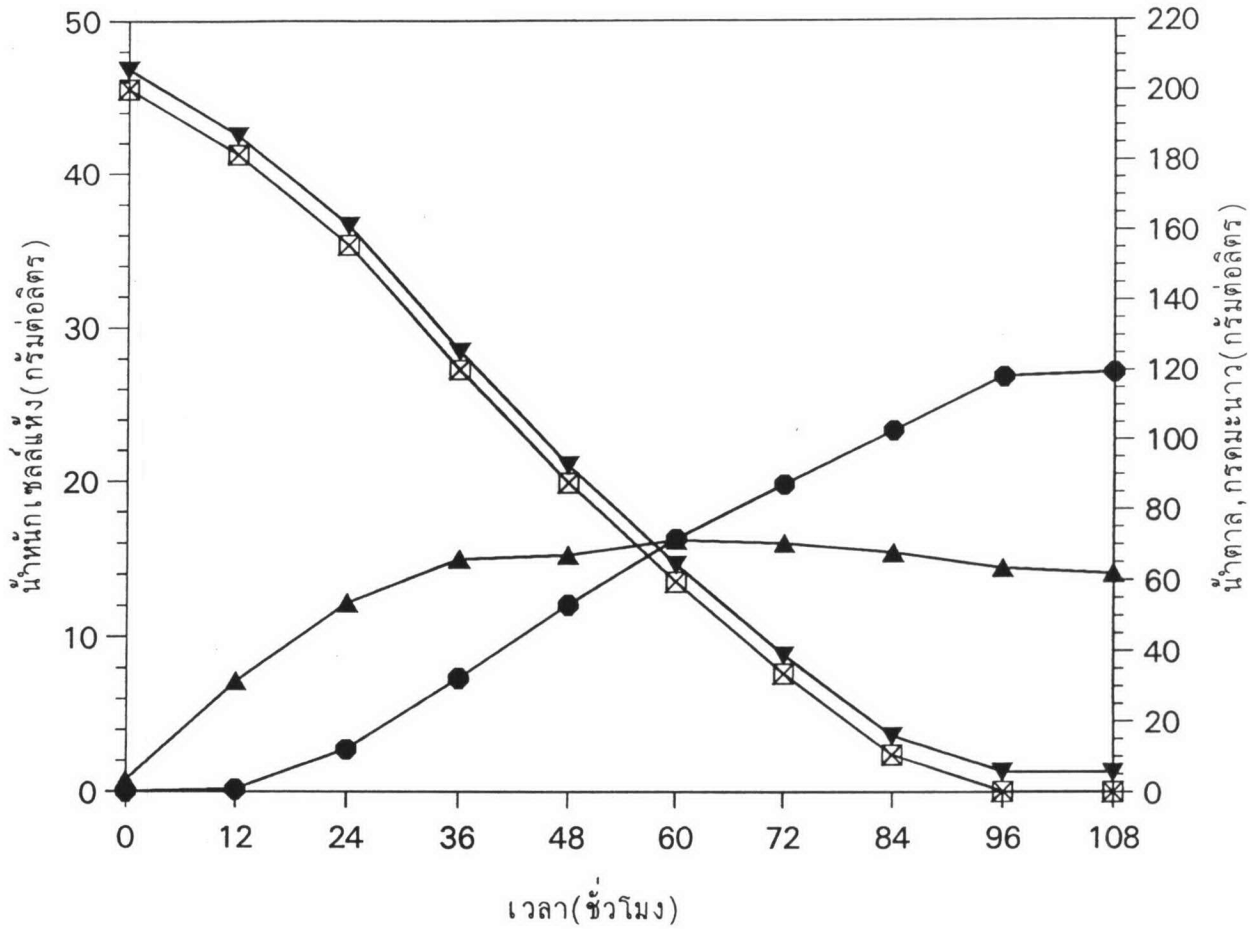
กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ใกล้เคียงกับการทดลองที่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตในข้อ 3.2.2 แต่ใช้เวลาในการหมักมากกว่าถึง 12 ชั่วโมง ส่วนการเจริญของเชื้อพบว่าสามารถเจริญได้ดีเช่นกัน

ตารางที่ 20 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.4 ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.71	0.00	200.37	206.00
12	7.12	0.62	181.52	187.04
24	12.16	11.93	155.58	161.22
36	14.94	32.20	120.04	125.39
48	15.20	52.90	87.54	92.55
60	16.18	71.56	59.44	64.28
72	15.96	87.07	33.48	38.81
84	15.38	102.52	10.39	15.82
96	14.36	118.08	0.11	5.72
108	14.04	119.34	0.00	5.46

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือประมาณ 3,000 มิลลิลิตร

ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมด = 118.08 x 3.0 = 354.24 กรัม



รูปที่ 21 แสดงปริมาณกรดมะนาว(●), น้ำหนักเซลล์แห้ง(▲),น้ำตาลกลูโคส(⊠)และน้ำตาลรีดิวส์(▼)ในระยะเวลาต่างๆของการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.4 ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

3.2.4 ผลการเพิ่มอัตราการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ

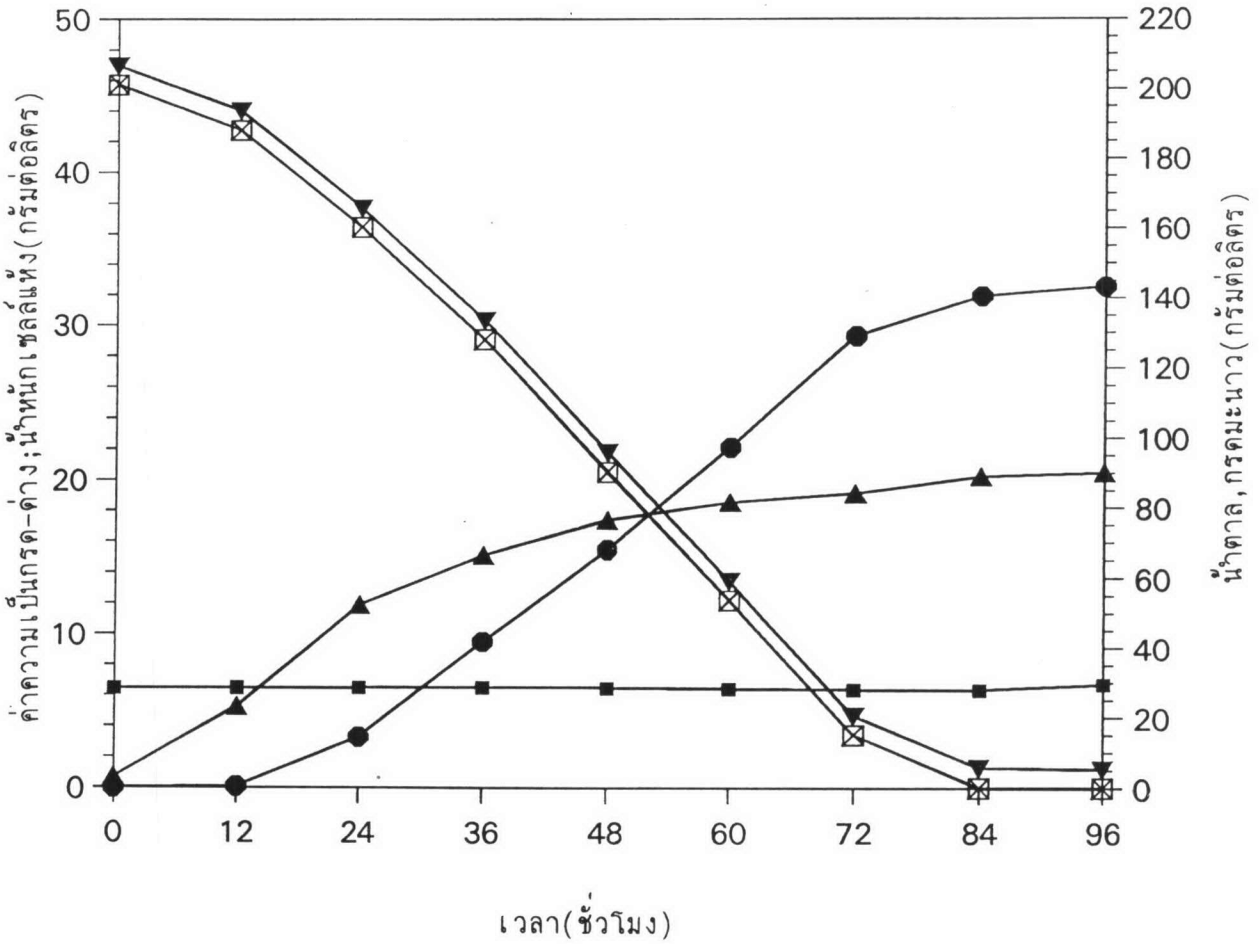
การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 เป็นการหมักในสภาวะที่ต้องการออกซิเจน Okoshi และคณะ(1987)ได้รายงานว่าการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้การผลิตกรดมะนาวเพิ่มสูงขึ้นและปริมาณกรดไอโซซิตริกจะลดลง การกวนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีการหนึ่ง ที่จะช่วยเพิ่มการละลายและการถ่ายเทออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้น Furukawa และคณะ(1977) ได้รายงานผลการเลี้ยงเชื้อ *Candida citrica* ในอาหารที่มีนอร์มัล-พาราฟฟินส์ เมื่อแปรผันอัตราการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 250-600 รอบต่อนาที พบว่าอัตราการกวนที่เหมาะสมคือ 600 รอบต่อนาที จากการทดลองข้อ 3.2.2 ได้เลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในถังหมักโดยใช้อัตราการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ 500 รอบต่อนาที ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทดลองเพิ่มอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารและสภาวะเช่นเดียวกับที่ใช้ในข้อ 3.2.2 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 21 รูปที่ 22 และ 23 จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที การเจริญและการผลิตกรดมะนาวจะเกิดขึ้นได้เร็วกว่าการเลี้ยงเชื้อที่ให้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีเพียงเล็กน้อยแต่สูงกว่าโดยตลอด ได้กรดมะนาว 140.36 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 84 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 69.80 เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที

ตารางที่ 21 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและผลผลิต ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

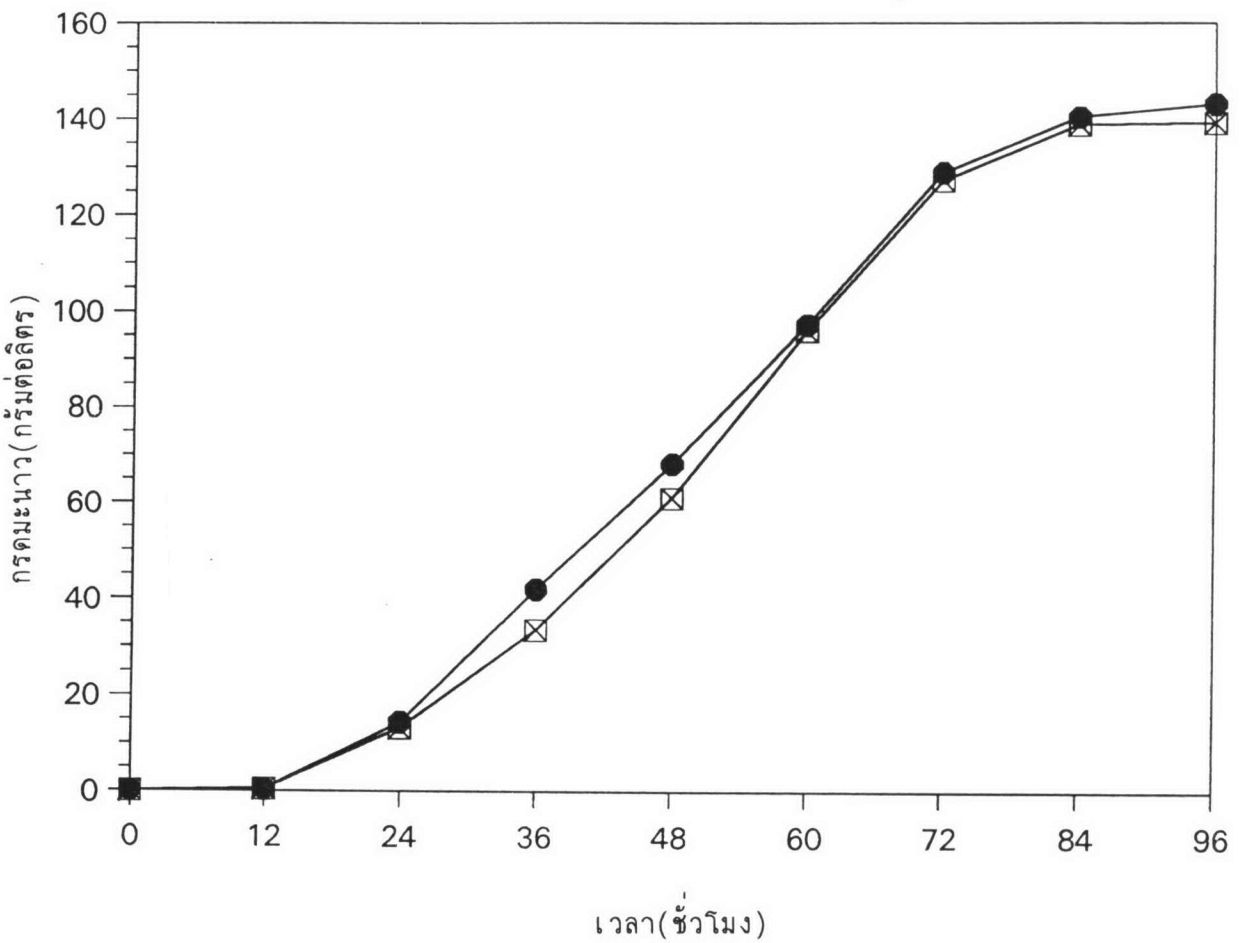
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (ร้อยละ)
0	6.44	0.68	0.00	201.13	206.58	0.00
12	6.46	5.23	0.36	187.97	193.62	2.74
24	6.47	11.88	14.31	160.26	165.71	35.01
36	6.49	15.08	41.75	127.82	133.35	56.95
48	6.45	17.37	67.99	90.23	95.80	61.31
60	6.40	18.52	97.23	53.63	59.08	65.39
72	6.35	19.10	128.82	15.04	20.48	69.22
84	6.32	20.21	140.36	0.03	5.66	69.80
96	6.68	20.46	143.13	0.00	5.22	71.16

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือประมาณ 2,600 มล.

ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมด = 143.13 x 2.6 = 372.14 กรัม



รูปที่ 22 แสดงปริมาณกรดมะนาว(●), น้ำหนักเซลล์แห้ง(▲), ค่าความเป็นกรด-ด่าง (■), น้ำตาลกลูโคส(⊠)และน้ำตาลรีดิวส์(▼) ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวน 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm



<u>รูปที่ 23</u> เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่ได้ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่อัตราการกวน 500 (⊠)และ 600(●) รอบต่อนาที ควบคุมอัตราการให้อากาศ 1 vvm

3.2.5 ผลการแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น

จากการทดลองในข้อ 3.2.4 ได้ใช้ปริมาณเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แล้ว 200 กรัมต่อลิตร จะเห็นว่าน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดในเวลา 84 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 220 และ 250 กรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารและสภาวะเช่นเดียวกับที่ใช้ในข้อ 3.2.4 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 22 , 23 รูปที่ 24 และ 25 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง เชื้อ *C. oleophila* C-73 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงถึง 149.09 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 67.20 เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป เมื่อเพิ่มน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 250 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 132.70 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 64.05 เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไปและยังมีน้ำตาลกลูโคสเหลือในน้ำหมักด้วย จากการเปรียบเทียบผลการแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น(รูปที่ 26) จะเห็นว่าการเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นสูงขึ้น การผลิตกรดมะนาวจะช้าลงเมื่อใช้เวลาในการหมักเท่ากัน

ดังนั้นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 220.0 กรัม แคลเซียมคาร์บอเนต 120 กรัม ส่วนองค์ประกอบอื่นๆเหมือนในระดับขวดเขย่า และสภาวะในการเลี้ยงเชื้อคือ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

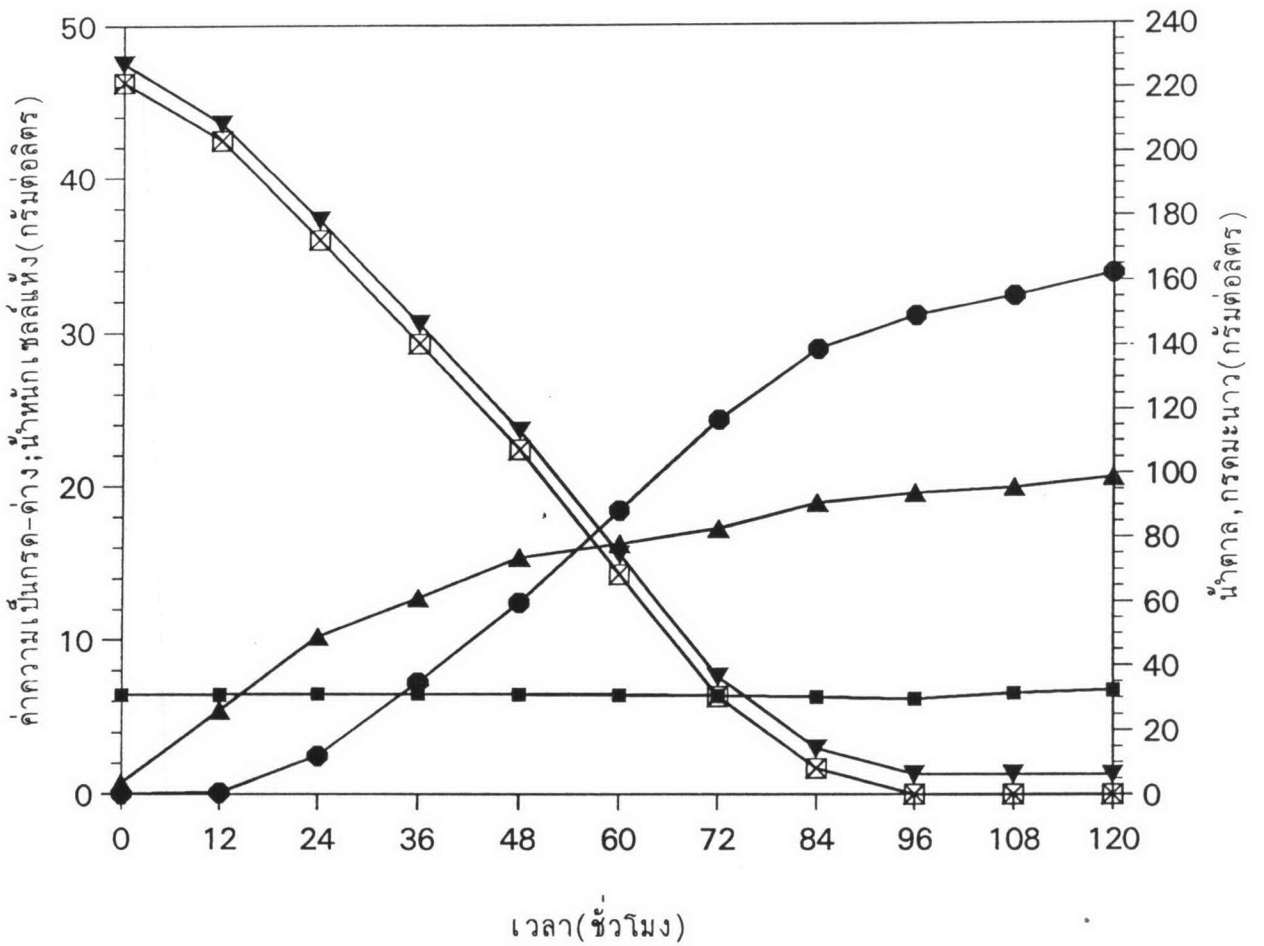
ตารางที่ 22 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและผลผลิต ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวน 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (ร้อยละ)
0	6.40	0.70	0.00	221.86	228.01	-
12	6.42	5.40	0.42	203.88	209.12	2.21
24	6.47	10.21	11.93	172.70	178.89	24.27
36	6.47	12.72	34.59	140.62	146.77	42.58
48	6.44	15.32	59.64	107.34	113.51	52.08
60	6.40	16.22	88.26	68.39	74.60	57.51
72	6.33	17.20	116.77	30.27	36.41	60.95
84	6.26	18.88	138.82	8.06	14.22	64.93
96	6.13	19.49	149.09	0.00	6.11	67.20
108	6.51	19.86	155.06	0.00	6.27	69.89
120	6.71	20.55	162.21	0.00	6.12	73.11

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือประมาณ 2,600 มล.

ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมด = 149.09 X 2.6

= 387.63 กรัม



รูปที่ 24 แสดงปริมาณกรดมะนาว(●), น้ำหนักเซลล์แห้ง(▲), ค่าความเป็นกรด-ด่าง (■), น้ำตาลกลูโคส(⊠)และน้ำตาลรีดิวส์(▼) ในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวน 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

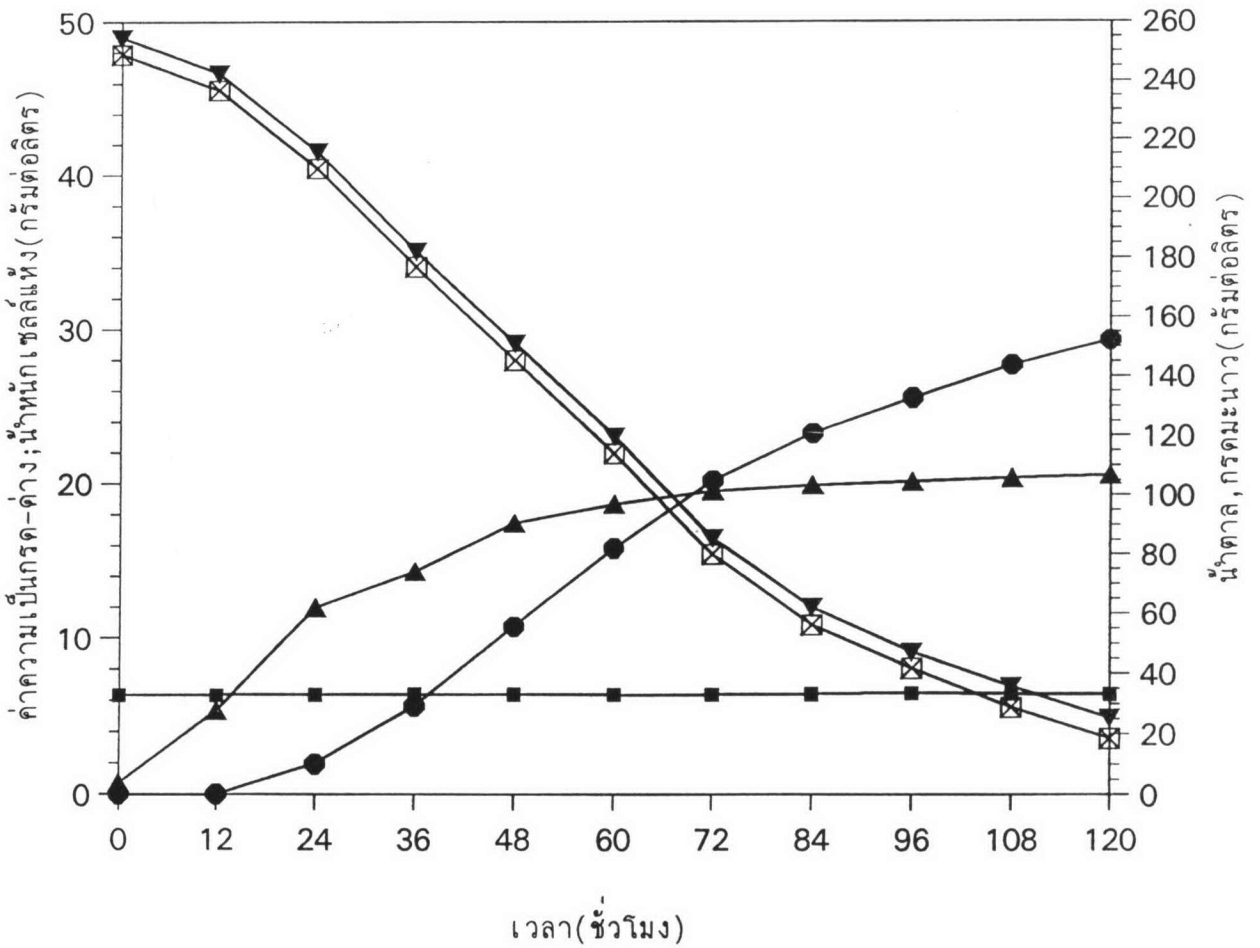
ตารางที่ 23 ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและผลผลิต ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวน 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิต (ร้อยละ)
0	6.30	0.69	0.00	248.87	254.62	-
12	6.32	5.32	0.00	236.92	242.65	0.00
24	6.36	11.95	10.12	210.24	216.10	26.20
36	6.38	14.30	29.19	176.98	182.65	40.60
48	6.38	17.42	55.73	145.39	151.22	53.86
60	6.35	18.67	82.27	114.01	119.89	61.00
72	6.34	19.48	104.83	80.02	85.58	62.08
84	6.38	19.86	120.78	56.05	62.08	62.64
96	6.35	20.10	132.70	41.69	47.11	64.05
108	6.40	20.32	143.72	28.77	35.20	65.30
120	6.38	20.51	152.11	18.82	25.31	66.01

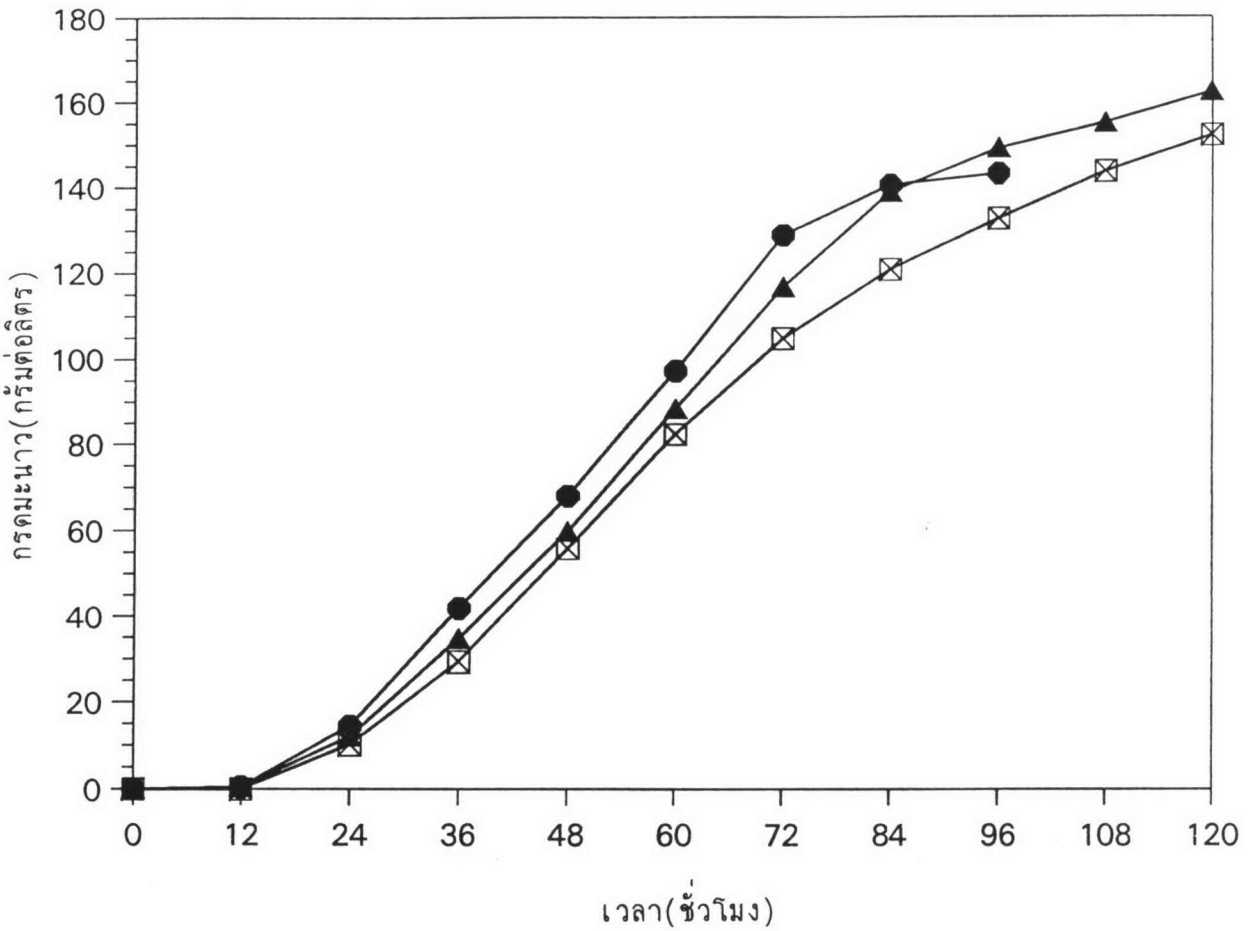
ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือประมาณ 2,550 มล.

ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมด = 152.11 X 2.55

= 387.88 กรัม



รูปที่ 25 แสดงปริมาณกรดมะนาว(●), น้ำหนักเซลล์แห้ง(▲), ค่าความเป็นกรด-ด่าง (■), น้ำตาลกลูโคส(⊠)และน้ำตาลรีดิวส์(▼) ในระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวน 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm



<u>รูปที่ 26</u> เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่ได้ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 200 (●), 220 (▲)และ 250 (⊠)กรัมต่อลิตร ควบคุมอัตราการกวน 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 vvm