บทที่ 3

ผลการทดลอง

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์สายพันธุ์กลายของ Candida oleophila ในระดับขวดเขย่า

3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายของยีสต์ Candida oleophila C-73 ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดมะนาว

สมศักดิ์ นาคซื่อตรง (2537) ได้ทำการกลายพันธุ์ยีสต์ Candida oleophila C-73 และคัดเลือกได้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดมะนาวคือสายพันธุ์ NNU-62 เนื่องจากในงานวิจัยต่อไปนี้ จะใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเกรดทางการค้า (ผลิตในประเทศ) เป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรดด่างซึ่งต่างจากของสมศักดิ์ที่ใช้เกรดสำหรับห้องปฏิบัติการ (สั่งจากต่างประเทศ) ดังนั้น จึงทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของยีสต์ Candida oleophila C-73 ใหม่ โดยนำสายพันธุ์กลายจำนวน 6 สายพันธุ์มาคัดเลือก ได้แก่ สายพันธุ์ NN-1 NNU-48 NN-39 NNU-62 NNU-54 และ NNU-58 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น (C-73) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก1.1) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวจนเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง ซึ่งประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ได้วิจัยแล้วว่าเป็นอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว นำมาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก2.1) ตามวิธีในข้อ 2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างเมื่อใช้เวลาในการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง วิเคราะห์หาค่าต่าง ๆ คือ ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลกลูโคส กรดมะนาว และกรดไอโซซิตริก ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 1-6 ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 3 , 4 และรูปที่ 4 , 5 พบว่าที่เวลา 96 ชั่วโมง ยีสต์สายพันธุ์ NNU-48 มี ประสิทธิภาพการผลิตดีที่สุดคือ ให้กรดมะนาว 136.68 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนของกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก 12.19 และผลผลิตกรดมะนาวร้อยละ 74.60 แต่ยีสต์สายพันธุ์นี้ รวมทั้งสายพันธุ์ NNU-54 และ NNU-58 ทำให้น้ำหมักมีความหนืดสูงซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อการกวนและการถ่ายเทออกซิเจนในระดับถังหมัก สายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวได้ดี และไม่ทำให้น้ำหมักหนืดมากนัก ได้แก่ สายพันธุ์ NN-39

และ NNU-62 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 130.79 และ 131.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันในทางสถิติ สำหรับสายพันธุ์ C-73 นั้น จะผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณต่ำกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % แต่เมื่อใช้เวลาในการหมักต่อไปถึง 120 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดมะนาวได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงเลือกยีสต์สายพันธุ์ NN-39ในการศึกษาต่อไป

3.2 ลักษณะการเจริญของ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ(ภาคผนวก ก1.1)ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว ติดตามการเจริญของเชื้อทุก 3 ชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมง โดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 3.ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 6 พบว่า เชื้อจะอยู่ในระยะพักตัว (lag phase) เป็นช่วงเวลาสั้น ๆ และเริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบทวีคูณ (log phase หรือ trophophase) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็วจนเมื่อถึงชั่วโมงที่ 15 เชื้อก็เข้าสู่ช่วงท้ายของการเจริญแบบทวีคูณและเริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบคงที่ (stationary phase หรือ idiophase) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 7 กรัมต่อลิตร ซึ่งรูปแบบการเจริญในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อของ Candida oleophila NN-39 นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของประเสริฐ (2537) ที่ใช้เชื้อ Candida oleophila C-73 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้หัวเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวเท่ากับ 0.7 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) เช่นเดียวกับการทดลองของประเสริฐ

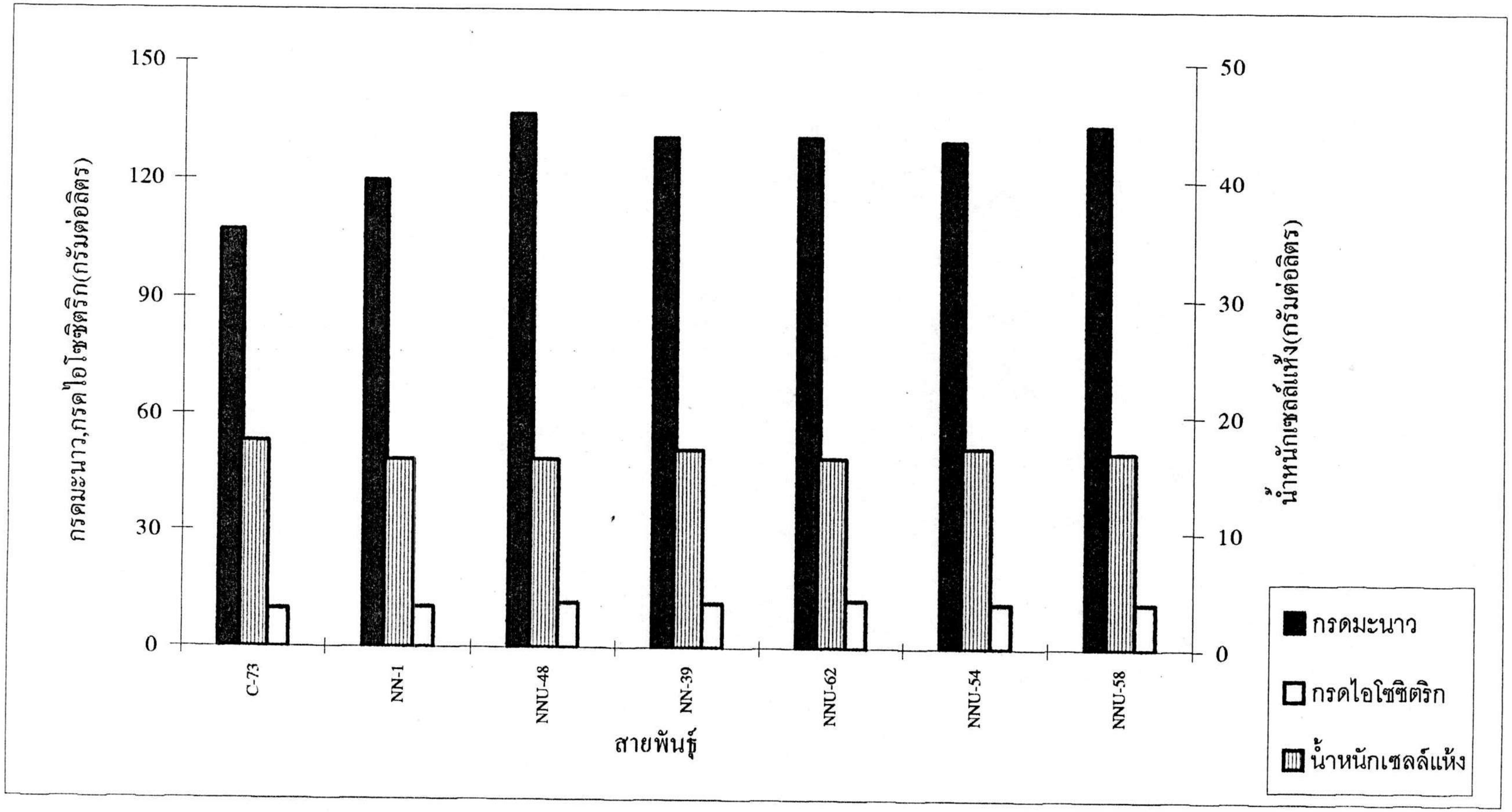
<u>ตารางที่ 3</u> เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> 7 สายพันธุ์ ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
C-73	2+	6.31	17.71	39.20	55.74	107.15	9.69	11.06	64.63
NN-1	3+	6.25	16.15	35.14	52.26	119.68	10.17	11.77	70.46
NNU-48	4+	5.62	16.18	21.78	36.69	136.68	11.21	12.19	74.60
NN-39	3+	6.12	17.00	22.65	39.33	130.79	11.16	11.72	71.72
NNU-62	3+	5.88	16.28	22.81	38.48	131.00	11.85	11.05	71.90
NNU-54	4+	6.12	17.23	23.23	41.35	129.94	11.25	11.55	71.49
NNU-58	4+	6.06	16.86	18.59	35.51	133.87	11.42	11.72	71.81

<u>หมายเหตุ</u> 1. ระดับความหนืดเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยดังนี้ 5+>4+>3+>2+>1+>0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดระดับ 5+ นั้น สามารถคว่ำขวดรูปชมพู่ได้โดยน้ำหมักในขวดไม่ไหล

2. ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) = $[(P_1-P_0)/(S_0-S_1)] \times 100$

คือ (กรดมะนาวที่ได้(กรัมต่อลิตร) / น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป(กรัมต่อลิตร)) x 100

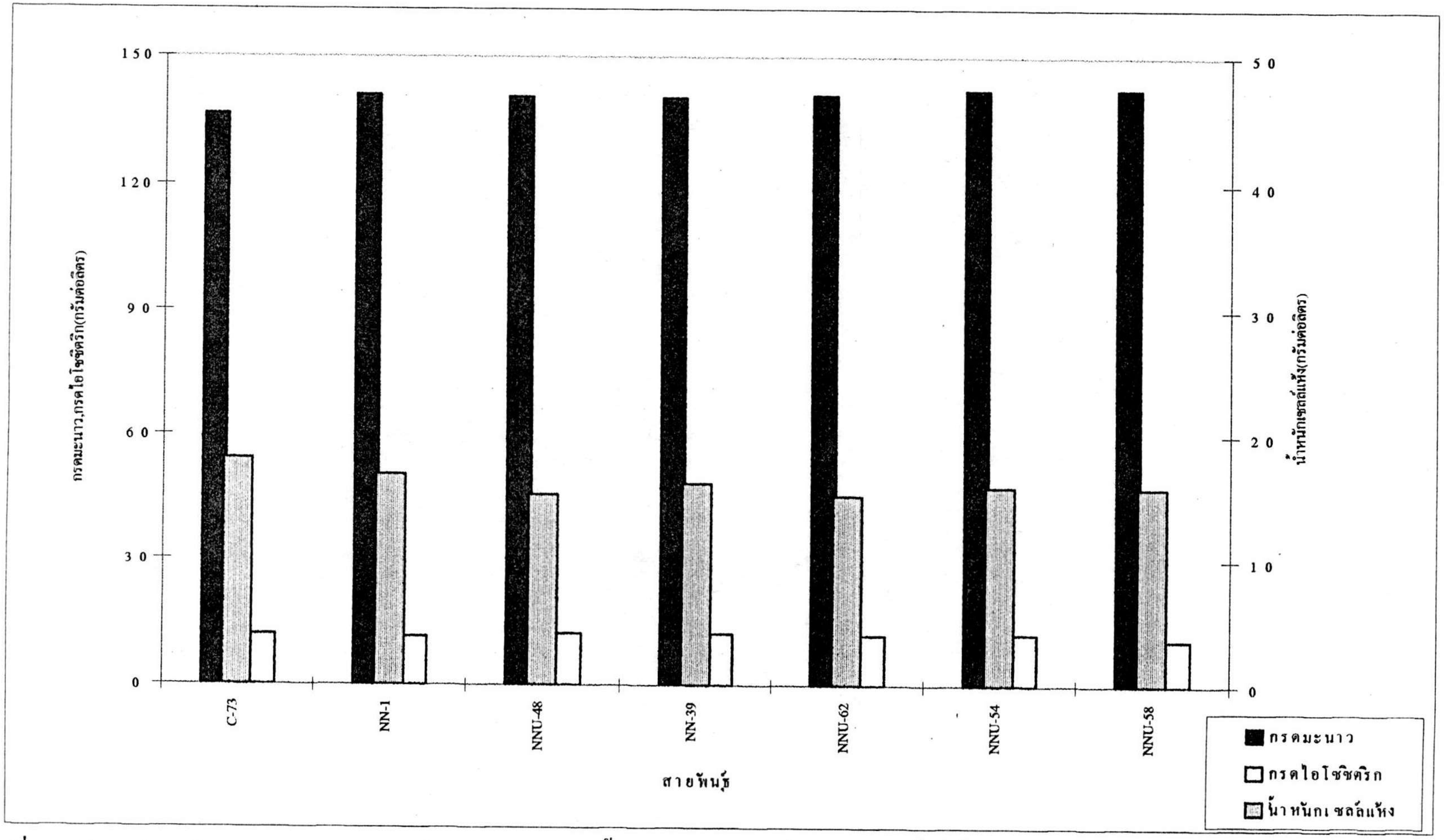


<u>รูปที่ 4</u> เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> 7 สายพันธุ์ ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่เวลาหมัก 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila 7 สายพันธุ์ ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
C-73	4+	4.96	18.11	5.67	21.69	136.47	12.20	11.19	68.46
NN-1	4+	4.25	16.88	5.30	22.24	141.08	11.72	12.04	70.65
NNU-48	5+	4.20	15.25	14.36	29.75	140.59	12.29	11.44	73.75
NN-39	4+	4.08	16.16	9.07	26.03	140.31	12.42	11.22	71.61
NNU-62	4+	3.76	15.16	8.67	26.27	141.08	12.16	11.60	71.86
NNU-54	5+	4.17	15.86	8.72	23.59	142.29	12.28	11.59	72.49
NNU-58	5+	4.20	15.83	11.77	28.21	142.43	10.82	13.16	73.71

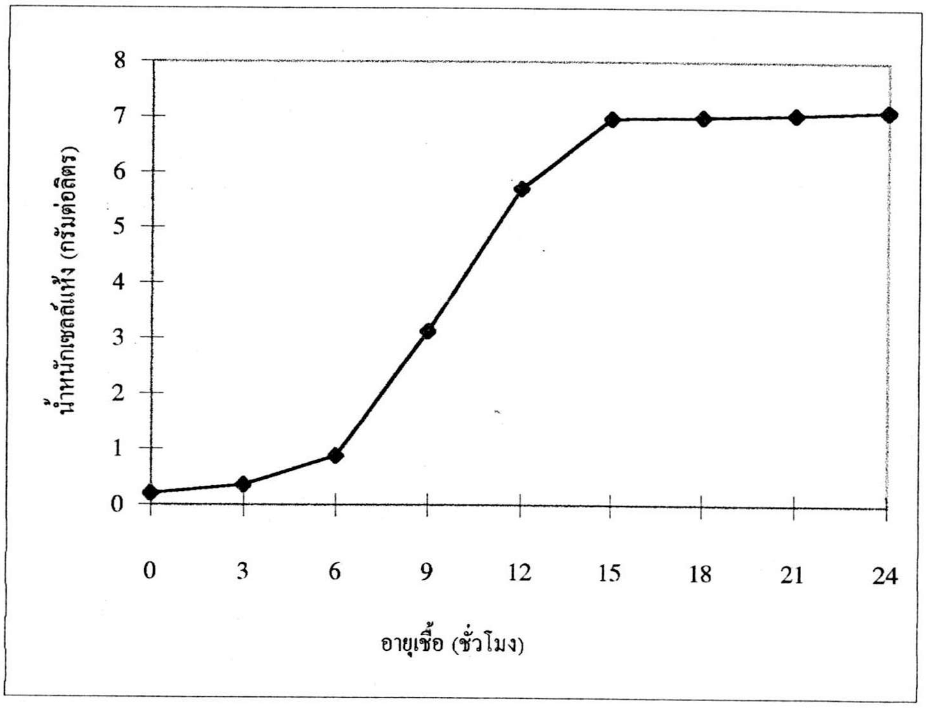
หมายเหตุ ระดับความหนืดเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยดังนี้ 5+>4+>3+>2+>1+>0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดระดับ 5+ นั้น สามารถคว่ำขวดรูปชมพู่ได้โดยน้ำหมักในขวดไม่ไหล



รูปที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* 7 สายพันธุ์ ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ที่เวลาหมัก 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 น้ำหนักเซลล์แห้งของ Candida oleophila NN-39 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในระยะเวลาต่างๆ

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	0	3	6	9	12	15	18	21	24
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	0.21	0.37	0.89	3.13	5.72	6.98	7.01	7.06	7.12



รูปที่ 6 รูปแบบการเจริญของ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

3.3 การคัดเลือกแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว

การผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าโดยยีสต์นั้น นิยมเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปด้วยเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง เนื่องจากการผลิตกรดจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว เกิดเป็นพิษต่อเซลล์ แคลเซียมคาร์บอเนตที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์เคยใช้อยู่นั้น เป็นเกรดสำหรับห้องปฏิบัติการ ซึ่งสั่งจากต่างประเทศและมีราคาแพง ไม่สามารถนำมาใช้ผลิตในอุตสาหกรรมเพราะจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงมาก ดังนั้นในการทดลองนี้ต้องการศึกษาเพื่อหาชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนตเกรดทางการค้าที่ผลิตในประเทศที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก2.1) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว โดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเกรดทางการค้า 6 ชนิด คือ 100 Mesh L-208 L-039 FC-111 L-25 และ OMEGA ซึ่งมีราคาถูกกว่าแคลเซียมคาร์บอเนตเกรดสำหรับห้องปฏิบัติการของ FLUKA ประมาณร้อยเท่า เปรียบเทียบกับแคลเซียมคาร์บอเนตของบริษัท FLUKA ซึ่งเป็นชนิดที่เคยใช้ในห้องปฏิบัติการมาแต่ต้น เก็บตัวอย่างในระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 6 , 7 และรูปที่ 7, 8 พบว่า ชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนตมีผลต่อปริมาณกรดมะนาวที่เชื้อ Candida oleophila NN-39 ผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง เชื้อ Candida oleophila NN-39 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด และน้ำหมักมีความหนืดน้อยที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตของ FLUKA สำหรับแคลเซียมคาร์บอเนตเกรดทางการค้าทั้ง 6 ชนิดนั้น พบว่า ชนิด 100 Mesh, FC-111, L-25 และ OMEGA ให้ปริมาณกรดมะนาวได้ดีใกล้เคียงกัน โดย OMEGA จะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงที่สุด คือ 131.10 กรัมต่อลิตร อีกทั้งยังไม่ทำให้น้ำหมักหนืดมากนัก ส่วน FC-111 นั้นทำให้น้ำหมักมีความหนืดสูง เมื่อใช้ระยะเวลาหมักต่อไปถึง 120 ชั่วโมง น้ำหมักที่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตทุก ๆ ชนิด จะมีความหนืดเพิ่มขึ้นจนใกล้เคียงกัน แต่ OMEGA และ 100 Mesh ยังคงให้ปริมาณและผลผลิตกรดมะนาวที่ดี ดังนั้น แคลเซียมคาร์บอเนตสองชนิดนี้จึงเหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาต่อไป นอกจากนี้ ในด้านการเจริญของเชื้อ ยังพบว่านอกจากอาหารที่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตของ FLUKA แล้ว เชื้อจะมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ OMEGA และเนื่องจากในการทดลองคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์นั้น ได้ใช้ OMEGA เป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ดังนั้น จึงเลือกใช้แคลเซียมคาร์บอเนตชนิด OMEGA เป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนต ที่เวลา 96 ชั่วโมง

ชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนต	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น	ค่าความเป็นกรดด่างที่ 96 ชั่วโมง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว(ร้อยละ)
FLUKA	1+	6.44	6.02	16.79	14.68	136.65	12.14	11.26	71.42
100 MESH	2+	6.32	5.60	14.63	24.02	129.26	11.20	11.54	71.03
L-208	4+	7.54	5.91	14.15	41.96	118.35	10.01	11.82	72.15
L-039	4+	7.49	6.36	12.94	35.95	120.54	14.51	8.31	70.89
FC-111	4+	7.04	6.23	15.41	25.96	130.76	13.66	9.57	72.63
L-25	2+	6.90	6.19	15.43	24.02	127.19	13.55	9.39	69.89
OMEGA	2+	6.77	6.11	16.37	20.92	131.10	11.26	11.64	70.83

หมายเหตุ แคลเซียมคาร์บอเนตชนิด FLUKA หมายถึง แคลเซียมคาร์บอเนตเกรดสำหรับห้องปฏิบัติการของบริษัท FLUKA ส่วนแคลเซียมคาร์บอเนตชนิดอื่นๆ เป็นเกรดทางการค้า ผลิตภายในประเทศ

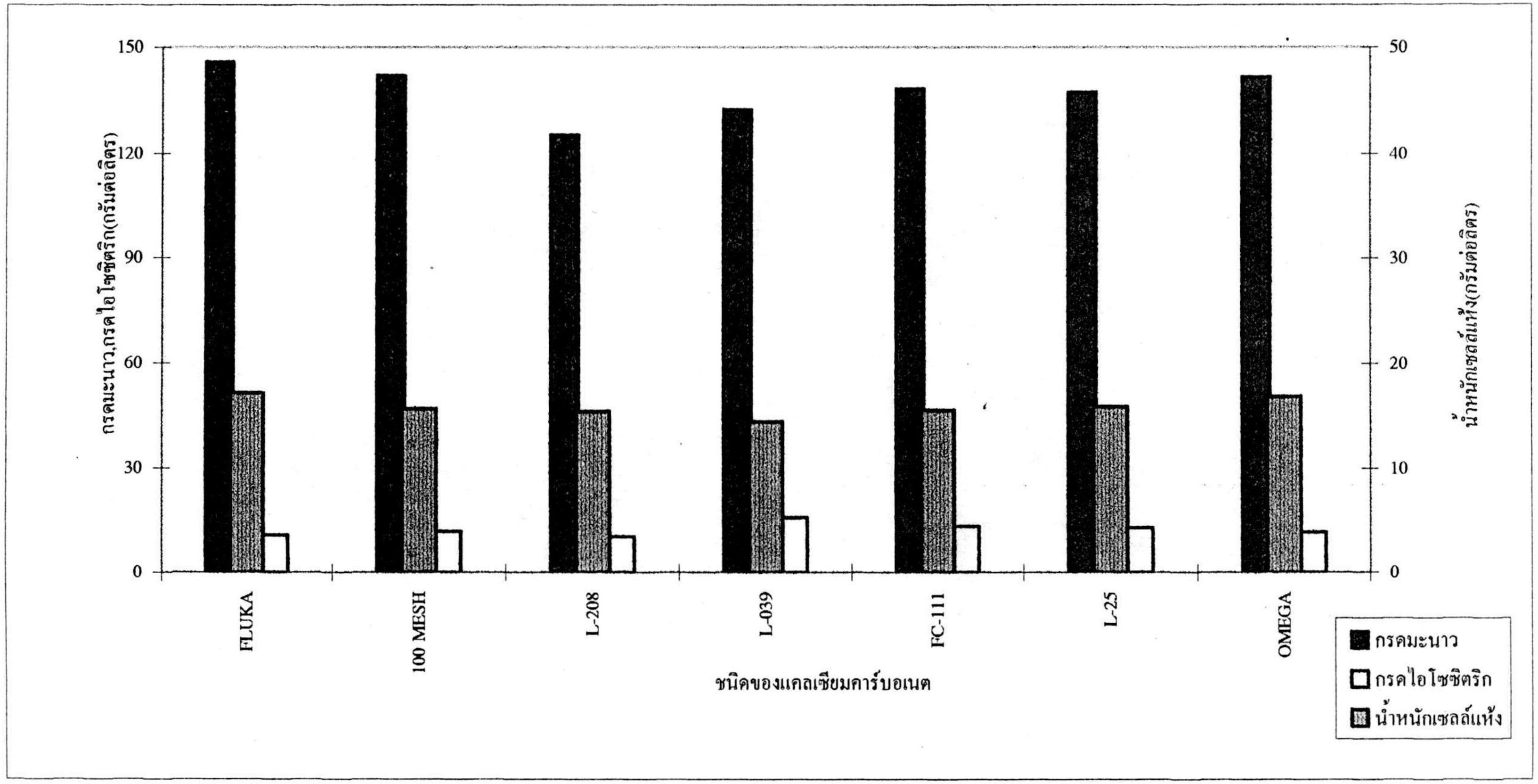
<u>รูปที่ 7</u> เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนต โดยใช้ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง

<u>หมายเหตุ</u> คำอธิบายชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนต แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนต ที่เวลา 120 ชั่วโมง

ชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนต	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว(ร้อยละ)
FLUKA	5+	4.09	17.09	0.00	145.82	11.21	13.01	70.79
100 MESH	5+	4.07	15.62	5.55	142.09	12.37	11.49	70.89
L-208	5+	5.49	15.37	22.77	125.40	10.70	11.72	68.44
L-039	5+	4.62	14.45	12.23	132.56	16.31	8.13	68.41
FC-111	5+	4.05	15.53	5.85	138.41	13.85	9.99	69.15
L-25	5+	4.14	15.89	7.24	137.42	13.54	10.15	69.14
OMEGA	5+	4.03	16.81	4.73	141.65	12.12	11.69	70.38

หมายเหตุ คำอธิบายชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนต แสดงดังตารางที่ 6



<u>รูปที่ 8</u> เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนต โดยใช้ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง

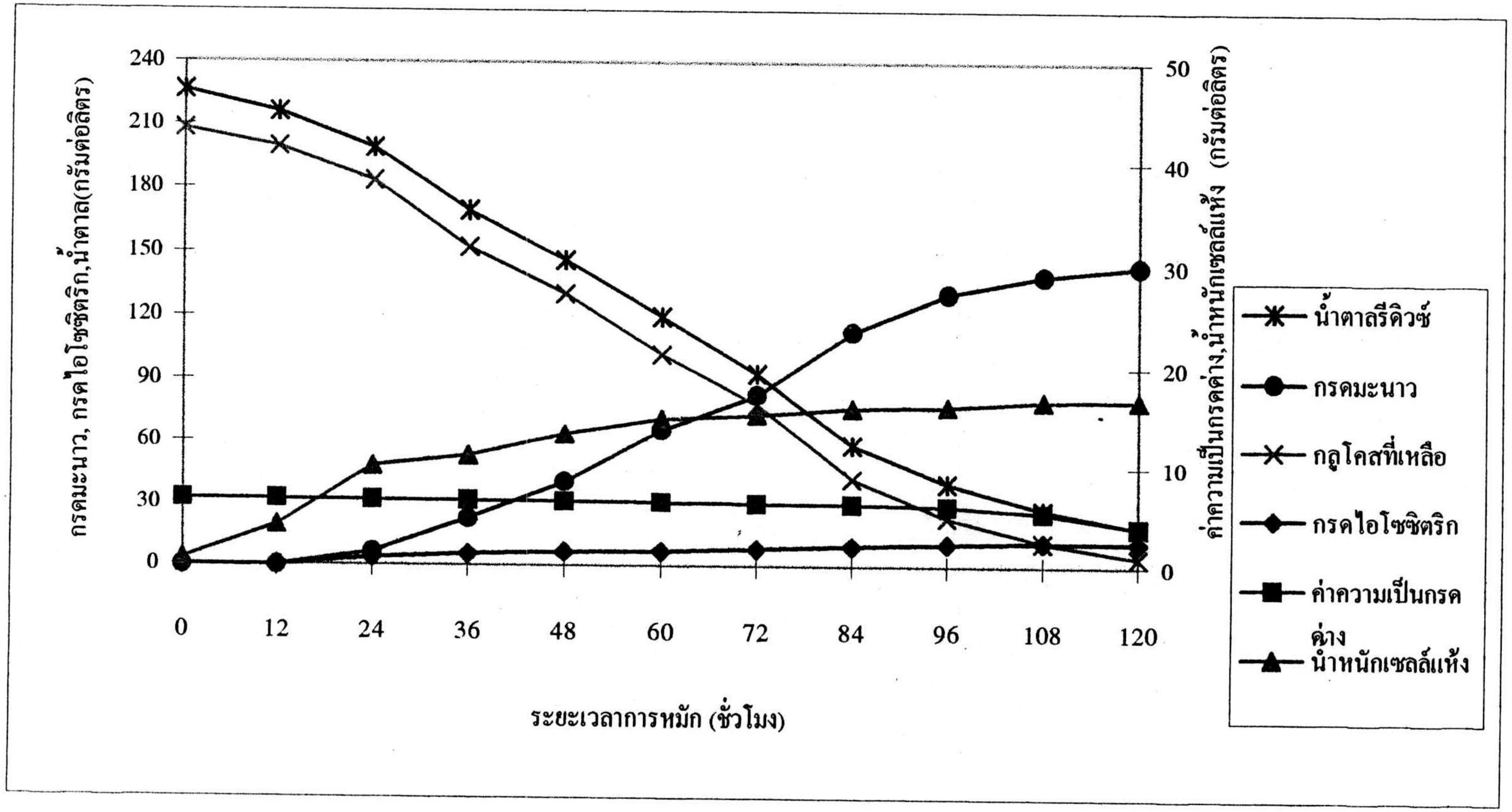
<u>หมายเหตุ</u> คำอธิบายชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนต แสดงดังตารางที่ 6

3.4 ลักษณะการเจริญ การผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และการใช้น้ำตาลของ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.1) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว นำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก2.1) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนครบ 120 ชั่วโมง วัดค่าความเป็นกรดด่าง วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง กรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำตาลที่เหลือตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ1-6 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 9 พบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในระหว่างชั่วโมงที่ 0 ถึง 84 หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อจะค่อนข้างคงที่ จนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 16.86 กรัมต่อลิตร และเป็นเวลาเดียวกับที่น้ำหมักเริ่มมีความหนืดขึ้นเรื่อยๆ ในระหว่างการหมักเชื้อจะเริ่มผลิตกรดมะนาวหลังจาก 12 ชั่วโมง และปริมาณกรดมะนาวจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนได้ประมาณ 131.06 และ 143.85 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ คิดเป็นผลผลิตกรดมะนาวประมาณร้อยละ 71 การเพิ่มขึ้นของกรดมะนาวนี้สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลง พบว่าที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักนั้น เหลือน้ำตาลกลูโคส 4.85 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 4.01 สำหรับอัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก พบว่า มีค่าสูงขึ้นเรื่อยๆเช่นกันและจะเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 84 และจากผลการวิเคราะห์น้ำตาลที่ได้พบว่าค่าความแตกต่างของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคสจะค่อนข้างคงที่ตลอดการหมัก แสดงว่าเชื้อ Candida oleophila NN-39 ไม่ใช้สารที่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ชนิดอื่นในขณะที่ยังมีกลูโคสอยู่

<u>ตารางที่ 8</u> ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระยะเวลาต่างๆ

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0	0	6.75	0.72	208.34	226.75	0.00	0.00	-	0.00
12	0	6.73	4.06	199.78	216.43	0.00	0.00	-	0.00
24	0	6.69	10.08	183.43	199.27	6.65	3.95	1.68	26.70
36	0	6.59	11.14	152.67	169.74	22.95	5.88	3.90	41.23
48	0	6.51	13.32	130.72	146.35	40.79	6.94	5.88	52.55
60	0	6.46	14.90	102.38	120.11	66.16	7.21	9.18	62.44
72	1+	6.38	15.34	78.69	93.36	83.23	8.44	9.39	64.20
84	2+	6.30	16.05	42.64	58.89	113.17	10.07	11.24	68.30
96	3+	6.09	16.23	23.92	40.38	131.06	11.21	11.69	71.07
108	4+	5.46	16.78	12.15	27.76	139.42	12.08	11.54	71.06
120	5+	4.01	16.86	4.85	18.91	143.85	11.86	12.13	70.69



<u>รูปที่ 9</u> ลักษณะการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง การผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก ตลอดจนการใช้น้ำตาลของ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ในระยะเวลาต่าง ๆ

I20503477

3.5. การคัดเลือกสารสกัดจากมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว

สารสกัดจากมอลต์ประกอบด้วยแป้ง และน้ำตาลหลายชนิด (Stanbury and Whitaker, 1984) รวมทั้งโปรตีน และวิตามิน (Sikyta,1983) จึงอาจใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และเป็นสารที่ช่วยในการเจริญของเชื้อยีสต์ ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1) จะมีสารสกัดจากมอลต์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารสกัดจากมอลต์ที่เคยใช้อยู่เป็นเกรดสำหรับห้องปฏิบัติการและมีราคาแพง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาชนิดของสารสกัดจากมอลต์ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila NN-39 โดยใช้สารสกัดจากมอลต์ของ DIFCO เปรียบเทียบกับสารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าของบริษัท Food Ingredient Specialities (FIS) ทั้งชนิดที่เป็นผง และชนิดของเหลวข้น (paste)

3.5.1. ผลของสารสกัดจากมอลต์ต่อการเจริญของยีสต์ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.2) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว แบ่งชุดทดลองออกเป็น 5 ชุด คือ ชุดที่ 1 ไม่เติมสารสกัดจากมอลต์ ชุดที่ 2 เติมสารสกัดจากมอลต์ ของ DIFCO 3 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) ชุดที่ 3 เติมสารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าชนิดผง 3 กรัมต่อลิตร ชุดที่ 4 เติมสารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าชนิดของเหลวข้นคิดเป็นน้ำหนักแห้ง 3 กรัมต่อลิตร ชุดที่ 5 เติมสารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าชนิดของเหลวข้น คิดเป็นน้ำหนักแห้ง 4.5 กรัมต่อลิตร ติดตามการเจริญของเชื้อทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 10 พบว่าสารสกัดจากมอลต์ทั้ง 3 ชนิด ให้น้ำหนักเซลล์แห้งของ Candida oleophila NN-39 ใกล้เคียงกันโดยตลอดเมื่อเติมในปริมาณเท่ากัน การเพิ่มสารสกัดจากมอลต์ชนิดของเหลวข้นทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีขึ้นเล็กน้อย โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 7.34 กรัม และการเจริญของเชื้อจะลดลงไม่มากนักหากไม่เติมสารสกัดจากมอลต์ อย่างไรก็ตาม การเข้าสู่ระยะต่างๆของการเจริญของเชื้อจะเป็นไปที่เวลาเดียวกันในทุกชุดการทดลอง

<u>ตารางที่ 9</u> เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ในระยะเวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ใช้สารสกัดจากมอลต์ชนิดต่างๆ

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4	ชุดที่ 5
0	0.23	0.21	0.21	0.22	0.20
3	0.45	0.34	0.33	0.36	0.43
6	0.89	0.73	0.74	0.78	0.82
9	2.54	2.82	2.77	2.87	2.79
12	5.26	5.37	5.41	5.54	5.87
15	6.38	6.91	6.96	6.90	7.25
18	6.34	7.05	6.98	6.93	7.30
21	6.35	7.10	7.03	7.05	7.33
24	6.36	7.08	6.94	7.11	7.34

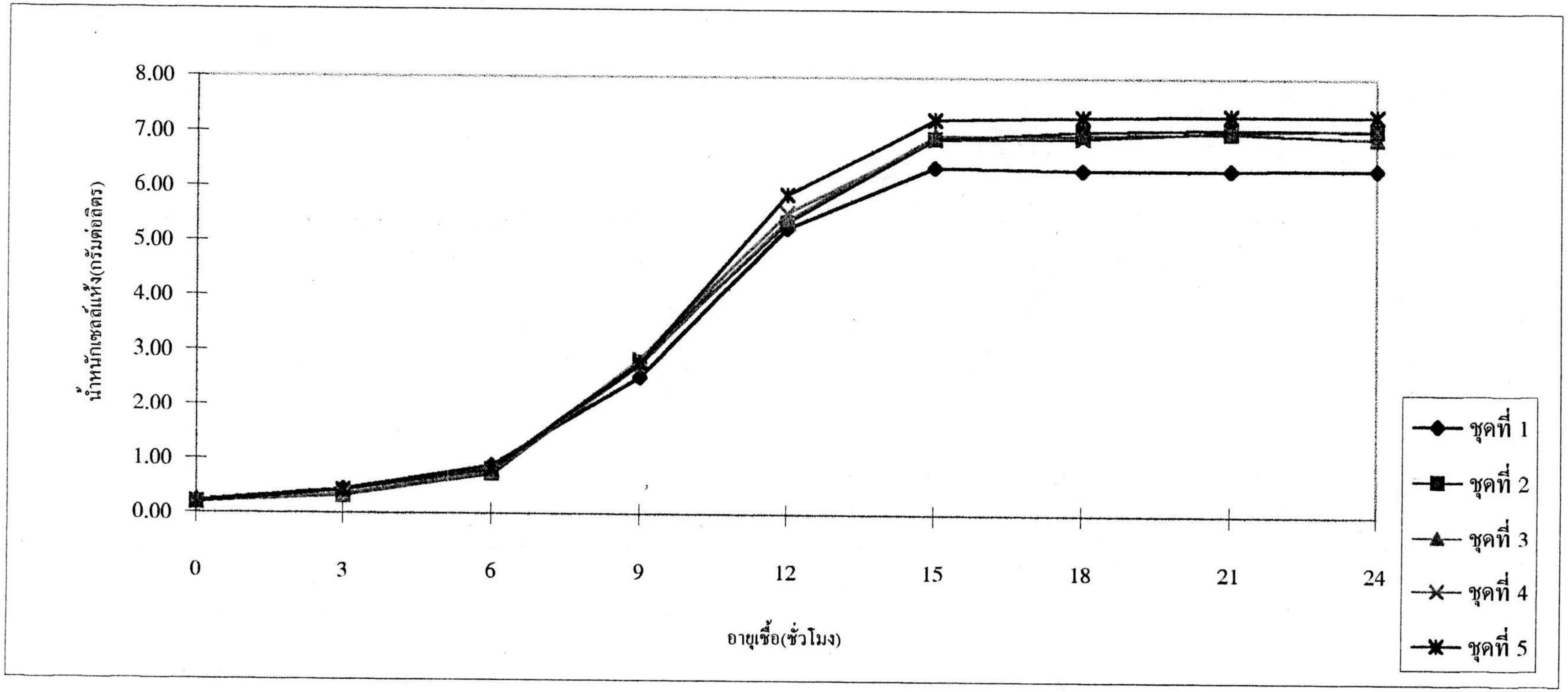
<u>หมายเหตุ</u> ชุดที่ 1 ไม่เติมสารสกัดจากมอลต์

ชุดที่ 2 เติมสารสกัดจากมอลต์ ของ DIFCO 3 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม)

ชุดที่ 3 เติมสารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าชนิดผง 3 กรัมต่อลิตร

ชุดที่ 4 เติมสารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าชนิดของเหลวข้นคิดเป็นน้ำหนักแห้ง 3 กรัมต่อลิตร

ชุดที่ 5 เติมสารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าชนิดของเหลวข้นคิดเป็นน้ำหนักแห้ง 4.5 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 10 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการแปรผันชนิดของสารสกัดจากมอลต์

หมายเหตุ คำอธิบายชุดที่ 1-5 แสดงดังตารางที่ 9

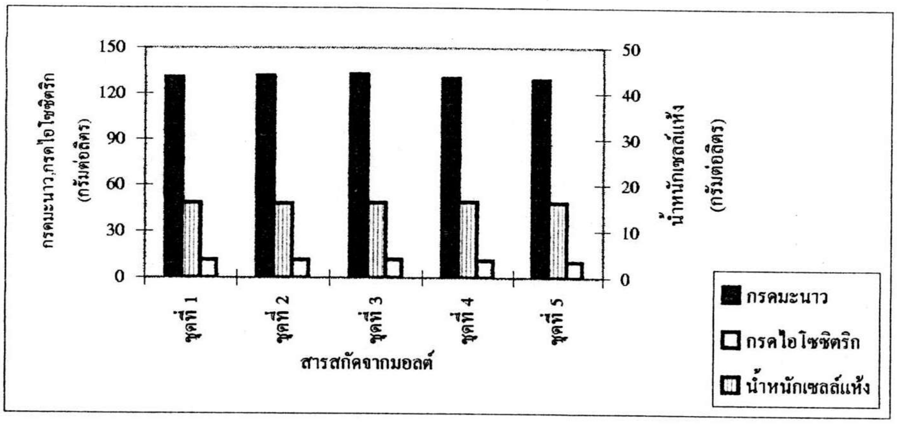
3.5.2.ผลของสารสกัดจากมอลต์ต่อการเจริญ และการผลิตกรดมะนาวในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว

จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า Candida oleophila NN-39 สามารถเจริญได้ดีเช่นกันเมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่เติมสารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าทั้งชนิดผงและของเหลวข้น แม้แต่ชุดที่ไม่เติมสารสกัดจากมอลต์ก็ไม่ทำให้การเจริญของเชื้อลดลงมากนัก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพของหัวเชื้อในการผลิตกรดมะนาวเมื่อเตรียมหัวเชื้อโดยใช้อาหารที่มีสารสกัดจากมอลต์ชนิดต่างๆ โดยเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.1) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว ควบคุมน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น 0.7 กรัมต่อลิตรเท่ากันทุกชุด เก็บตัวอย่างเมื่อใช้เวลาในการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 11 , 12 พบว่าเชื้อ Candida oleophila NN-39 สามารถเจริญ และผลิตกรดมะนาวได้ไม่แตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง โดยผลิตกรดมะนาวได้ประมาณ 131 และ141 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 96 และ120 ชั่วโมง ตามลำดับ แต่ชุดที่ไม่เติมสารสกัดจากมอลต์จะต้องใช้ปริมาณหัวเชื้อมากกว่าชุดอื่น ๆ จึงจะทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นเท่ากัน ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าชนิดของเหลวข้นในการทดลอง เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

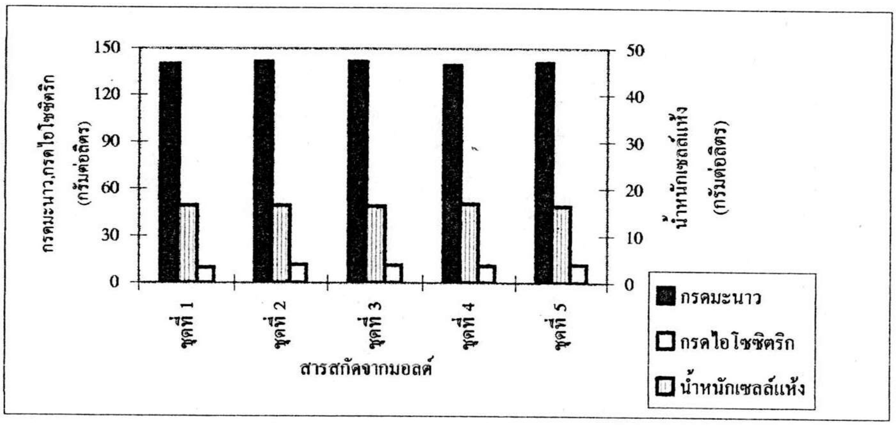
<u>ตารางที่ 10</u> เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยใช้หัวเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากมอลต์ชนิดต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	สารสกัดจากมอลต์	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว(ร้อยละ)
96	ชุดที่ 1	2+	6.15	16.20	21.89	130.59	11.85	11.02	70.17
	ชุดที่ 2	2+	6.10	16.12	21.95	131.66	11.75	11.21	70.77
	ชุดที่ 3	2+	6.12	16.21	19.23	132.58	11.94	11.10	70.23
	ชุดที่ 4	2+	6.08	16.53	22.67	130.33	11.39	11.44	70.32
	ชุดที่ 5	2+	6.05	16.29	23.08	129.19	10.21	12.65	69.86
120	ชุดที่ 1	4+	3.85	16.49	8.47	140.18	10.10	13.88	70.26
	ชุดที่ 2	4+	3.83	16.52	7.63	141.77	11.59	12.23	70.75
	ชุดที่ 3	4+	3.92	16.35	7.46	141.91	11.38	12.47	70.76
	ชุดที่ 4	4+	3.93	16.86	8.32	139.42	11.11	12.55	69.82
	ชุดที่ 5	4+	3.82	16.40	6.92	141.21	11.77	12.00	70.26

<u>หมายเหตุ</u> คำอธิบายชุดที่ 1-5 แสดงดังตารางที่ 9



รูปที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยใช้หัวเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากมอลต์ชนิดต่างๆ เมื่อใช้เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง



รูปที่ 12 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้หัวเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากมอลต์ชนิดต่างๆ เมื่อใช้เวลาในการหมัก 120 ชั่วโมง

3.6 ผลของกากที่เหลือหลังจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ต่อการผลิตกรดมะนาว

ในการทดลองที่ผ่านมาการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นั้น จะกำจัดกากออกก่อนโดยการตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยง(centrifuge) ซึ่งแม้จะไม่ยุ่งยากในการทดลองระดับขวดเขย่า แต่ในการผลิตระดับถังหมักขนาดใหญ่ ๆ นั้นหากสามารถใช้แป้งที่ย่อยแล้วรวมทั้งกากได้ก็น่าจะสะดวกขึ้นมาก เพราะนอกจากจะลดขั้นตอนการแยกกากออกแล้วยังช่วยลดโอกาสการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นอีกด้วย Shah และคณะ (1993) ได้รายงานผลการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (TSH) ในการผลิตกรดมะนาวจากเชื้อ Yarrowia lipolytica (DS-1) พบว่าการใช้ TSH ที่ผ่านการขจัดสิ่งปนเปื้อนจะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงกว่าเมื่อใช้ TSH ทั้งกาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วโดยไม่แยกกากออกเปรียบเทียบกับการใช้เฉพาะส่วนใสที่ขจัดกากแล้ว โดยเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อตามภาวะที่ได้ในข้อ 3.5.2 และวิธีในข้อ 2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว นำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.1) ตามวิธีทดลองในข้อ 2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 11 , 12 และรูปที่ 13 พบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วทั้งกากกับการใช้เฉพาะส่วนใสให้ผลใกล้เคียงกัน ทั้งปริมาณ และผลผลิตกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง ความหนืดของน้ำหมัก การใช้น้ำตาลรวมทั้งอัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก

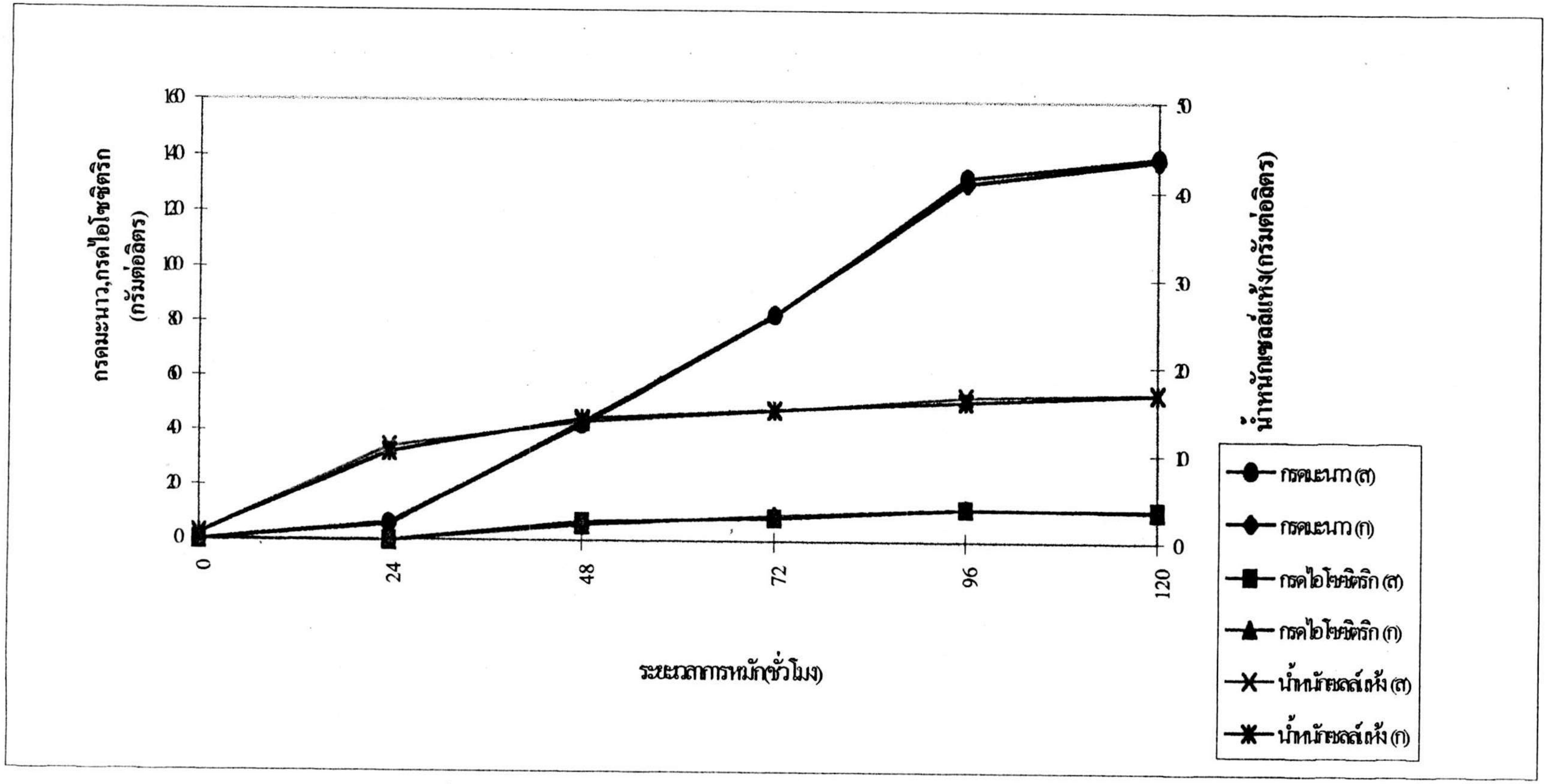
<u>ตารางที่ 11</u> ปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วชนิดไม่กำจัดกาก

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว(ร้อยละ)
0	0	6.73	0.72	205.00	0.00	0.00	-	0.00
24	0	6.67	10.12	180.25	5.74	-	-	23.19
48	0	6.48	13.99	128.50	43.38	7.13	6.08	56.71
72	1+	6.34	15.10	72.90	83.02	8.91	9.32	62.85
96	3+	6.04	16.09	24.47	131.20	10.82	12.22	72.67
120	5+	3.89	17.02	9.32	139.88	12.55	11.15	71.48

<u>หมายเหตุ</u> - หมายถึง ปริมาณต่ำมากจนไม่สามารถคำนวณได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

<u>ตารางที่ 12</u> ปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเฉพาะส่วนใส (ชุดควบคุม)

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว(ร้อยละ)
0	0	6.73	0.69	203.84	0.00	0.00	-	0.00
24	0	6.64	10.73	178.80	6.15	-	-	24.56
48	0	6.52	13.63	126.90	42.59	6.92	6.15	55.35
72	1+	6.38	15.02	73.75	82.82	8.48	9.77	63.66
96	3+	5.95	16.61	21.50	133.27	11.85	11.33	73.09
120	5+	3.82	17.06	6.03	140.63	11.77	11.95	71.09



รูปที่ 13 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเฉพาะส่วนใส (ส) กับการใช้รวมทั้งกาก (ก)

3.7.ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต และแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตที่เหมาะสม

แมกนีเซียม และแมงกานีสเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญ และการผลิตกรดมะนาวของเชื้อจุลินทรีย์ โดยแมกนีเซียมเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิด ที่สำคัญคือ เอนไซม์จำพวกไคเนส ได้แก่ เฮกโซไคเนส ฟอสโฟฟรุคโตไคเนส ไพรูเวทไคเนส เป็นต้น เอนไซม์ในวัฏจักรเครปส์ที่มีแมกนีเซียมเป็นโคแฟคเตอร์ ได้แก่ ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส และ 2-ออกโซกลูตาเรทดีไฮโดรจีเนสคอมเพล็กซ์ สำหรับบทบาทของแมงกานีสนั้นยังไม่ทราบชัดเจน แต่พบว่า แมงกานีสสามารถเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์บางชนิดได้เช่นกันคือ เอนไซม์อีนอลเลส Bahadur และ Malviya (1966) ได้รายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์จะใช้สับสเตรทได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟต เป็นองค์ประกอบในความเข้มข้นที่เหมาะสม (อ้างถึงใน Abou-Zeid และ Ashy,1984) Hattori, Yokoo และ Imada (1974) ได้รายงานว่าความเข้มข้นของแมงกานีสซัลเฟตเตตระไฮเดรตมีผลต่อปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกแต่ไม่มีผลต่ออัตราส่วนของกรดทั้งสอง และจากการศึกษาของประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) พบว่าปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต และแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยยีสต์ Candida oleophila C-73 คือ 0.5 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของแร่ธาตุทั้งสอง โดยเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อตามภาวะที่ได้ในข้อ 3.5.2 และวิธีในข้อ 2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว นำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.5) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต($MgSO_4.7H_2O$) และแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4.H_2O$) เริ่มต้นเท่ากับ 0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 กรัมต่อลิตร โดยใช้แผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาคผนวก ก2.1) เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 14 พบว่า แร่ธาตุทั้งสองต่างมีอิทธิพลและมีอิทธิพลร่วมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ต่อปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตโดยเชื้อ Candida oleophila NN-39 เชื้อจะใช้น้ำตาลและผลิตกรดมะนาวได้น้อยมากในชุดทดลองที่ไม่เติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต แม้กระทั่งผลผลิตกรดมะนาวก็ต่ำกว่าชุดทดลองอื่น ๆ อย่างชัดเจน และเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 137.94 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต และแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตเริ่มต้น 0.4 และ 0.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % นอกจากนี้ จะสังเกตได้ว่า การใช้แร่ธาตุทั้ง

สองที่ปริมาณเริ่มต้นดังกล่าว จะให้อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริกสูงกว่าชุดควบคุมเล็กน้อยอีกด้วย การเพิ่มปริมาณแร่ธาตุทั้งสองหรืออย่างใดอย่างหนึ่งจะทำให้ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ลดลง สำหรับการเจริญของเชื้อนั้น พบว่า ทุกชุดทดลองให้น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อใกล้เคียงกัน ดังนั้น จึงเลือกใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.4 กรัมต่อลิตร และใช้แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.3 กรัมต่อลิตร ในการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต เมื่อใช้เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง

$MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.H_2O$ (กรัมต่อลิตร)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0.0,0.0	3+	6.79	16.16	85.50	75.15	8.16	9.21	60.36
0.0,0.1	3+	6.36	16.89	39.60	119.77	10.38	11.54	70.29
0.0,0.2	3+	6.31	16.53	36.18	124.45	11.85	10.50	71.60
0.0,0.3	3+	6.32	15.81	34.74	125.56	11.25	11.16	71.64
0.0,0.4	2+	6.43	15.99	44.28	117.60	10.47	11.23	70.96
0.0,0.5	2+	6.48	15.73	62.46	101.03	9.43	10.71	68.48
0.1,0.0	3+	6.74	16.46	75.60	78.51	8.24	9.53	58.42
0.1,0.1	3+	6.21	16.89	30.62	128.52	10.99	11.69	71.65
0.1,0.2	3+	6.14	16.92	27.83	130.67	11.19	11.68	71.73
0.1,0.3	2+	6.14	16.56	25.56	132.07	11.94	11.06	71.61
0.1,0.4	2+	6.20	16.32	28.29	130.61	11.08	11.79	71.88
0.1,0.5	2+	6.44	16.53	44.82	115.33	10.64	10.84	69.82

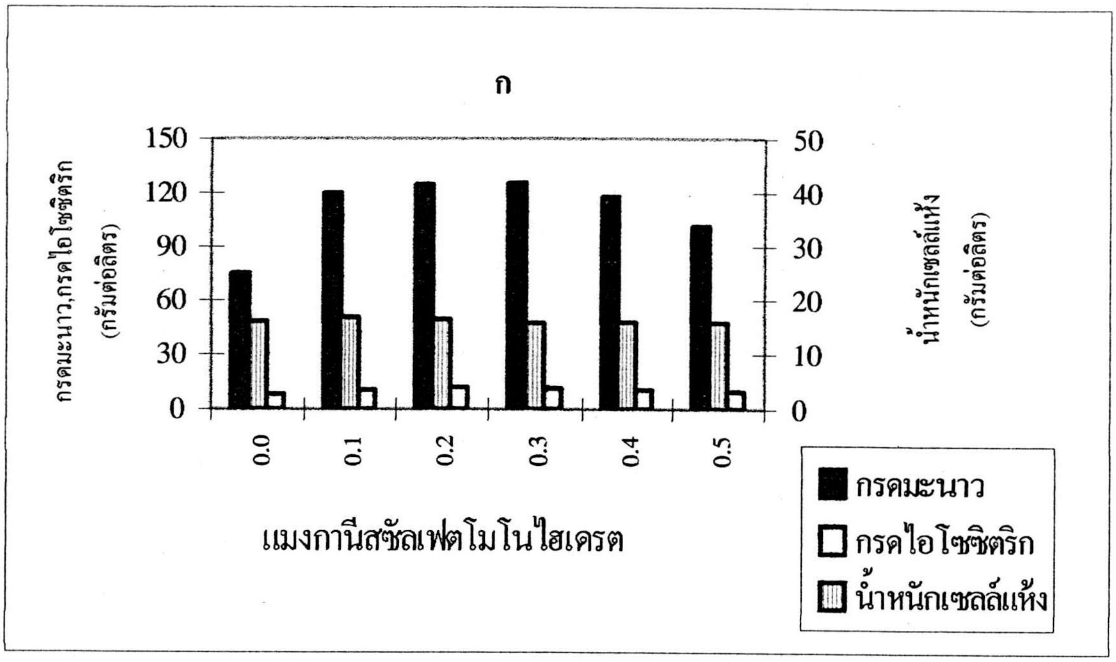
ตารางที่ 13(ต่อ) เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต เมื่อใช้เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง

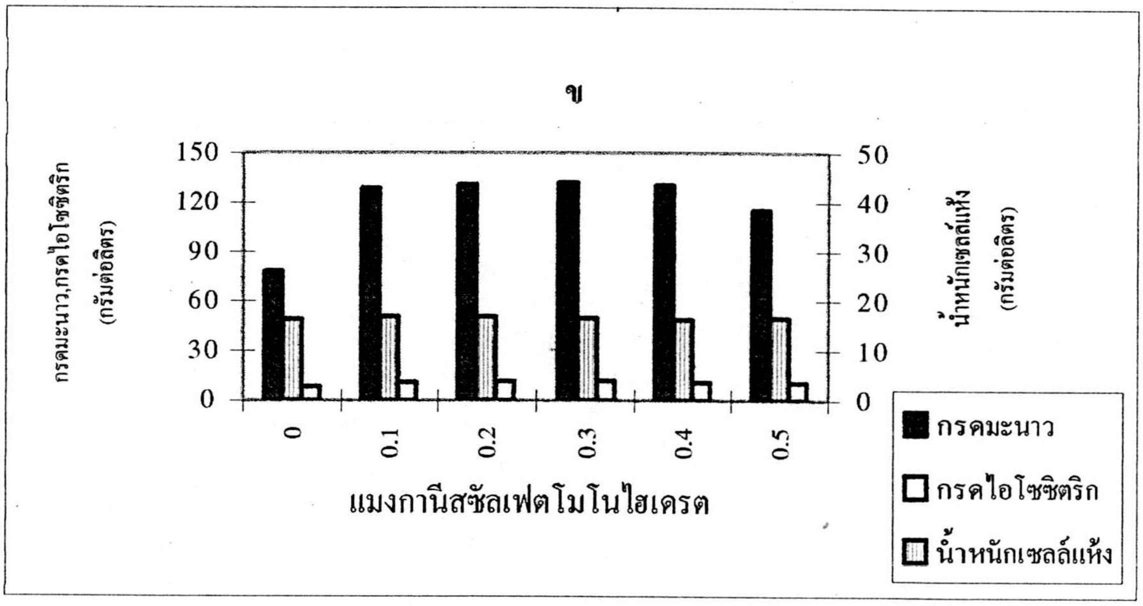
$MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.H_2O$ (กรัมต่อลิตร)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0.2,0.0	3+	6.75	16.94	72.00	80.88	8.65	9.35	59.99
0.2,0.1	2+	6.25	16.53	30.24	127.94	11.94	10.72	71.17
0.2,0.2	3+	6.12	16.29	25.85	130.97	11.16	11.74	71.12
0.2,0.3	3+	6.13	16.11	24.63	132.80	11.33	11.72	71.64
0.2,0.4	3+	6.21	16.44	29.64	129.75	10.99	11.81	71.94
0.2,0.5	3+	6.30	16.47	33.23	126.23	10.21	12.15	71.41
0.3,0.0	3+	6.70	16.79	61.65	88.45	8.73	10.13	59.62
0.3,0.1	2+	6.18	17.16	28.14	129.99	11.08	11.73	71.48
0.3,0.2	2+	6.13	16.71	23.92	132.49	11.42	11.60	71.20
0.3,0.3	2+	6.10	16.62	22.14	134.02	11.59	11.56	71.34
0.3,0.4	3+	6.12	16.83	23.13	133.10	11.33	11.75	71.23
0.3,0.5	3+	6.26	16.26	28.58	127.49	11.59	10.54	70.27

ตารางที่ 13(ต่อ) เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต เมื่อใช้เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง

$MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.H_2O$ (กรัมต่อลิตร)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0.4,0.0	3+	6.72	16.40	64.80	86.69	6.66	9.82	59.70
0.4,0.1	2+	6.14	17.16	21.96	130.38	11.77	11.08	69.33
0.4,0.2	2+	6.08	16.80	20.58	134.13	12.11	11.08	70.81
0.4,0.3	2+	6.05	16.89	17.13	137.94	10.90	12.66	71.52
0.4,0.4	3+	6.04	16.20	20.15	135.78	10.82	12.55	71.52
0.4,0.5	3+	6.09	16.35	26.10	132.29	11.68	11.33	71.94
0.5,0.0	3+	6.61	17.27	46.85	108.26	9.09	11.91	66.36
0.5,0.1	2+	6.10	17.37	18.72	132.57	11.77	11.26	69.31
0.5,0.2	2+	6.04	16.08	22.42	133.99	11.68	11.47	71.43
0.5,0.3	2+	6.02	17.55	22.82	134.21	11.25	11.93	71.70
0.5,0.4	2+	6.13	16.41	28.89	130.21	11.59	11.23	71.90
0.5,0.5	2+	6.15	17.16	27.00	130.33	11.33	11.50	71.22
ชุดควบคุม	2+	6.14	16.56	25.72	129.69	11.33	11.45	70.38

หมายเหตุ ชุดควบคุมใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.2 และ 0.25 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

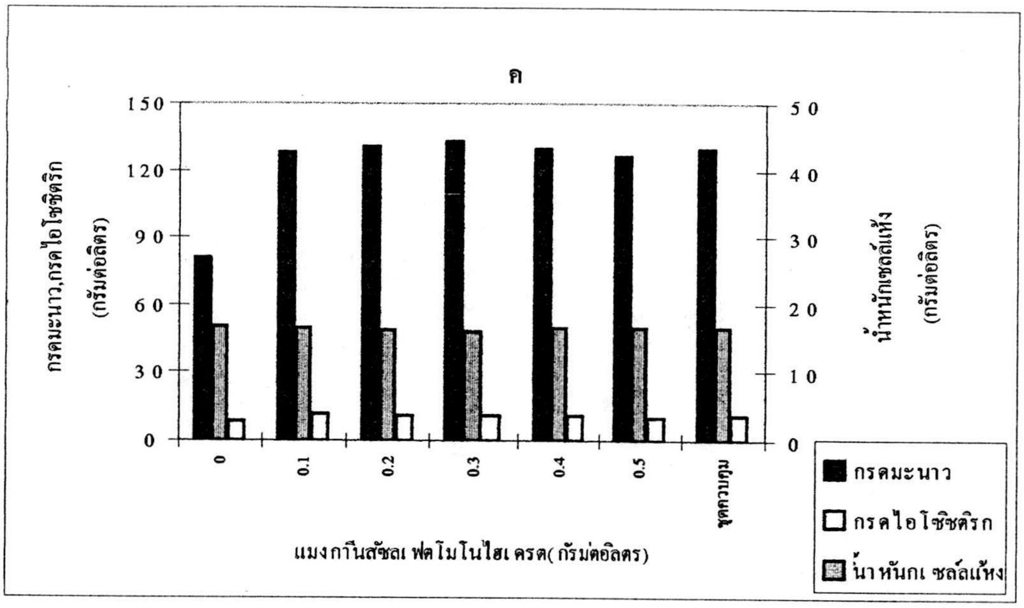


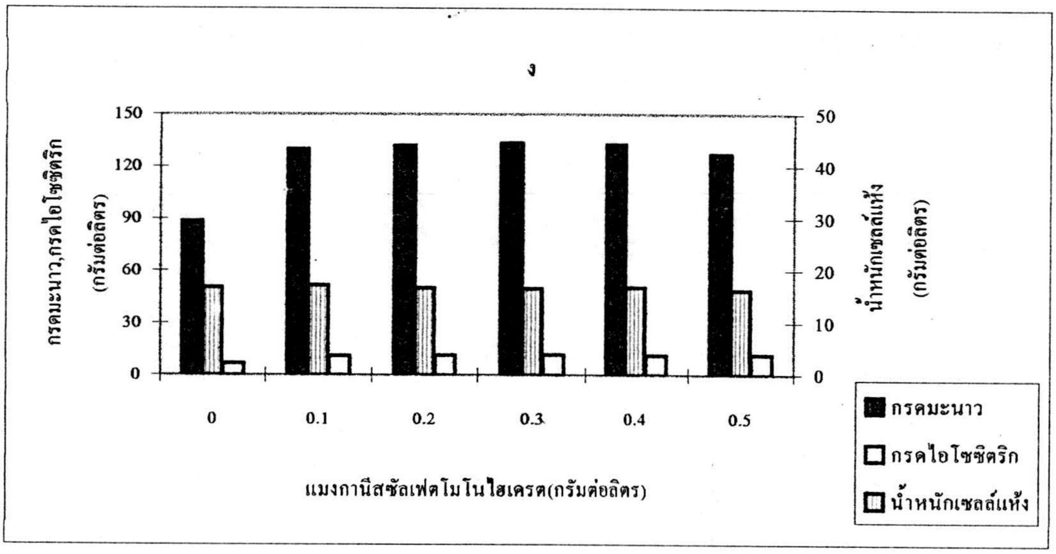


<u>รูปที่ 14</u> เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต เมื่อใช้เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง

รูป ก ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.0 กรัมต่อลิตร

รูป ข ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.1 กรัมต่อลิตร

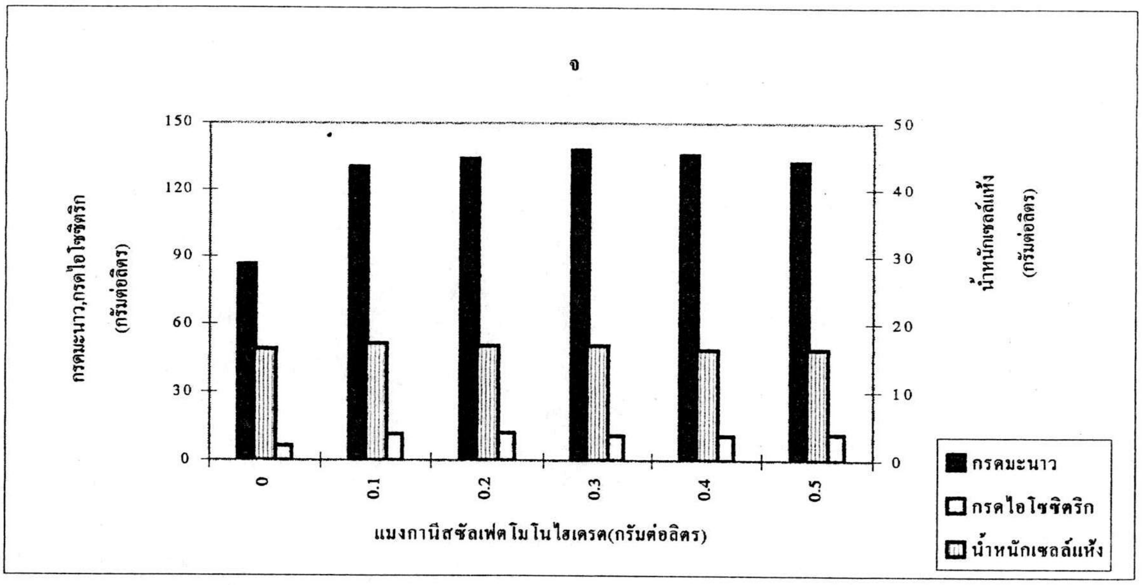


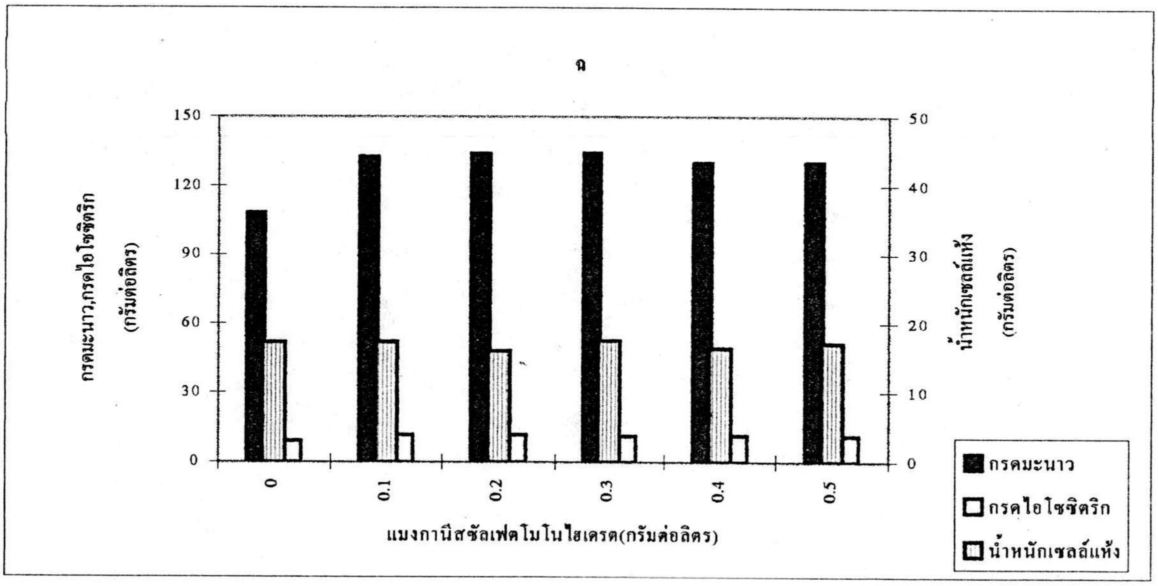


<u>รูปที่ 14(ต่อ)</u> เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต เมื่อใช้เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง

รูป ค ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร

รูป ง ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.3 กรัมต่อลิตร





รูปที่ 14(ต่อ) เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต เมื่อใช้เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง

รูป จ ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.4 กรัมต่อลิตร

รูป ฉ ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.5 กรัมต่อลิตร

3.8. ผลของสารสกัดจากยีสต์ที่มีต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

สารสกัดจากยีสต์สามารถใช้เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี เนื่องจากอุดมด้วยกรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด Sikyta (1983) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบของสารสกัดจากยีสต์ พบว่าประกอบด้วยวิตามินชนิดต่าง ๆ ที่สำคัญ 8 ชนิด ได้แก่ ไธอะมีน ไรโบเฟลวิน กรดนิโคตินิค กรดแพนโตเธนิค ไพริดอกซิน ไบโอติน อินโนซิทอล และโคลีน ซึ่งส่งเสริมการเจริญ และการผลิตกรดมะนาวของยีสต์ Abou-Zeid และคณะ(1983) รายงานว่าในสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ Candida lipolytica ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น 8 ชนิด ได้แก่ วาลีน ลูซีน ธรีโอนีน เมไธโอนีน เฟนิลอะลานีน ไลซีน และ อาร์จีนีน เรวดี เลิศไตรรักษ์ (2535) และประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ได้รายงานว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวโดย Candida oleophila C-73 คือ 1.0 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการผลิตกรดมะนาวโดย Candida oleophila NN-39 ทั้งในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ และอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ของบริษัท DIFCO ประเทศสหรัฐอเมริกา และสารสกัดจากยีสต์ที่ผลิตโดยสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IBGE)

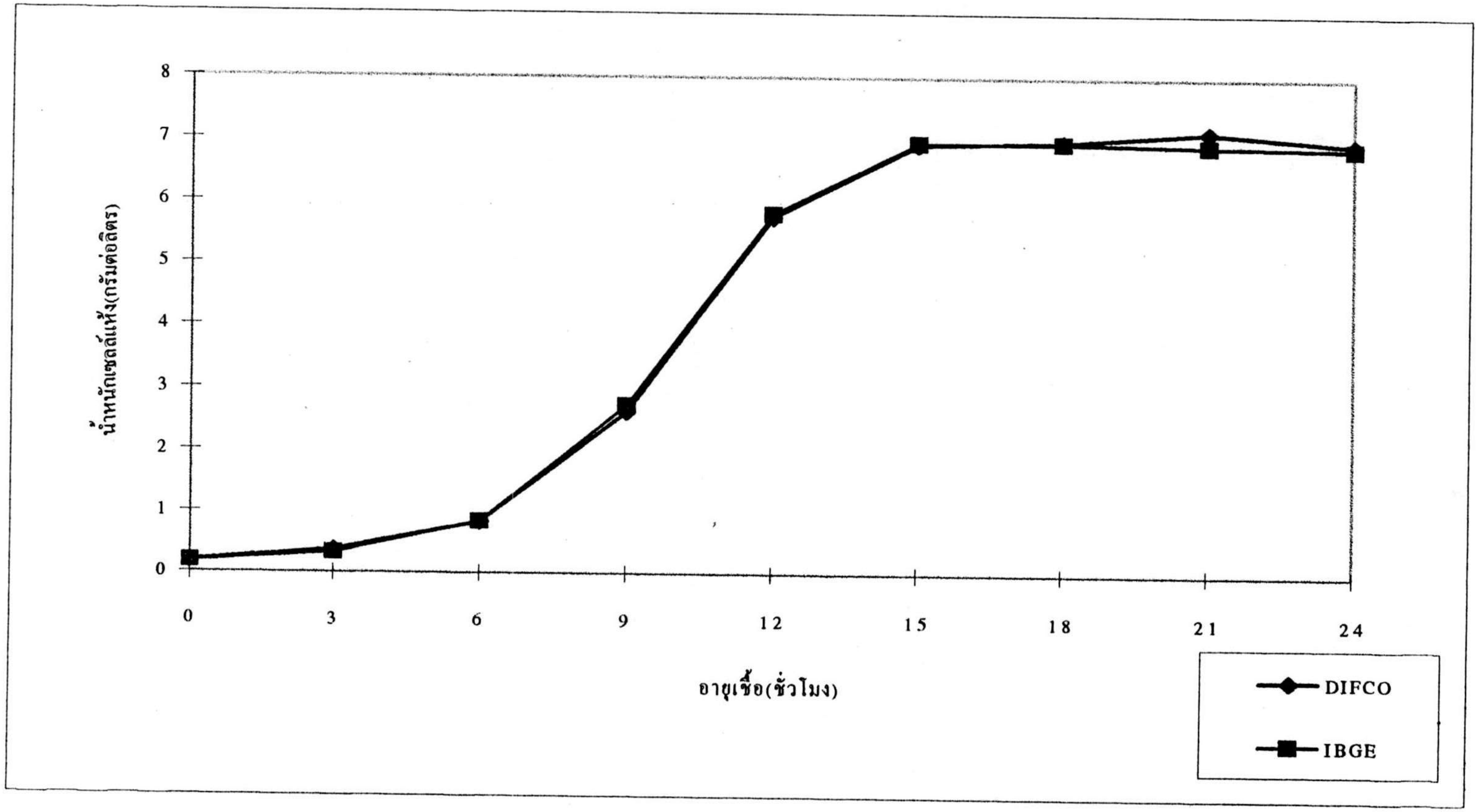
3.8.1. ผลของชนิดสารสกัดจากยีสต์ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

3.8.1.1 ผลต่อการเจริญของยีสต์ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.3) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว ใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO และ IBGE ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรเปรียบเทียบกัน ติดตามการเจริญของเชื้อทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 3 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 14 และรูปที่ 15 พบว่าเชื้อ Candida oleophila NN-39 มีการเจริญใกล้เคียงกันเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ทั้ง 2 ชนิดคือ DIFCO และ IBGE โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 7 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 15 ชั่วโมง เป็นต้นไป

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Candida oleophila* NN-39 ในเวลาต่างๆเมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO และ IBGE

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	
	DIFCO	IBGE
0	0.20	0.19
3	0.38	0.34
6	0.84	0.85
9	2.64	2.74
12	5.76	5.81
15	6.93	6.95
18	6.98	6.96
21	7.14	6.92
24	6.95	6.89



รูปที่ 15 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญของ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO และ IBGE

3.8.1.2. ผลของชนิดสารสกัดจากยีสต์ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อต่อการเจริญ และการผลิตกรดมะนาวของเชื้อในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว

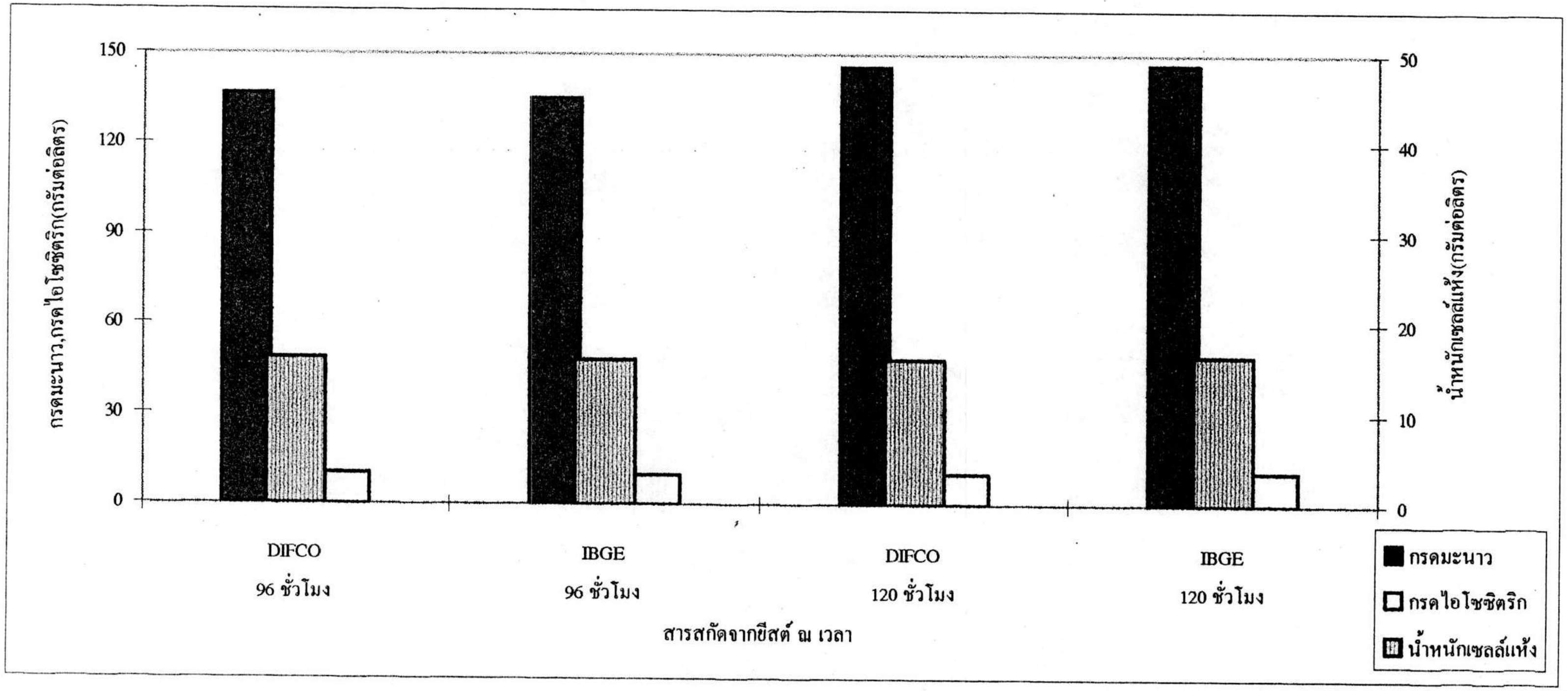
จากผลการทดลองในข้อ 3.8.1.1 พบว่าเชื้อ Candida oleophila NN-39 สามารถเจริญได้ใกล้เคียงกันในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ทั้งของ DIFCO และ IBGE ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ทั้ง 2 ชนิดต่อการเจริญ และการผลิตกรดมะนาวโดย Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ๆ ดังนี้

3.8.1.2.1 ใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.3) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ DIFCO เปรียบเทียบกับ IBGE นำมาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.6) ที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ DIFCO 1.0กรัมต่อลิตร ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 96 และ 120 ของการหมัก ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 16 จากการทดลองพบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ทั้งของ DIFCO และ IBGE ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อนั้นให้ผลการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila NN-39 ใกล้เคียงกัน เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยปริมาณกรดมะนาวที่ได้ประมาณ 136 และ 146 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ

<u>ตารางที่ 15</u> เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO โดยอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อใช้สารสกัดจากยีสต์ IBGE และ DIFCO

เวลา (ชั่วโมง)	สารสกัดจากยีสต์ในYM	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว(ร้อยละ)
96	DIFCO	3+	6.05	16.24	14.31	136.61	10.67	12.80	71.15
	IBGE	3+	6.11	16.05	13.58	135.24	10.22	13.23	70.17
120	DIFCO	5+	3.96	16.11	0.00	146.08	10.73	13.61	70.80
	IBGE	5+	3.92	16.48	0.10	146.85	11.45	12.83	71.21



รูปที่ 16 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO โดยอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อใช้สารสกัดจากยีสต์ IBGE และ DIFCO

3.8.1.2.2 ใช้สารสกัดจากยีสต์ IBGE ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว

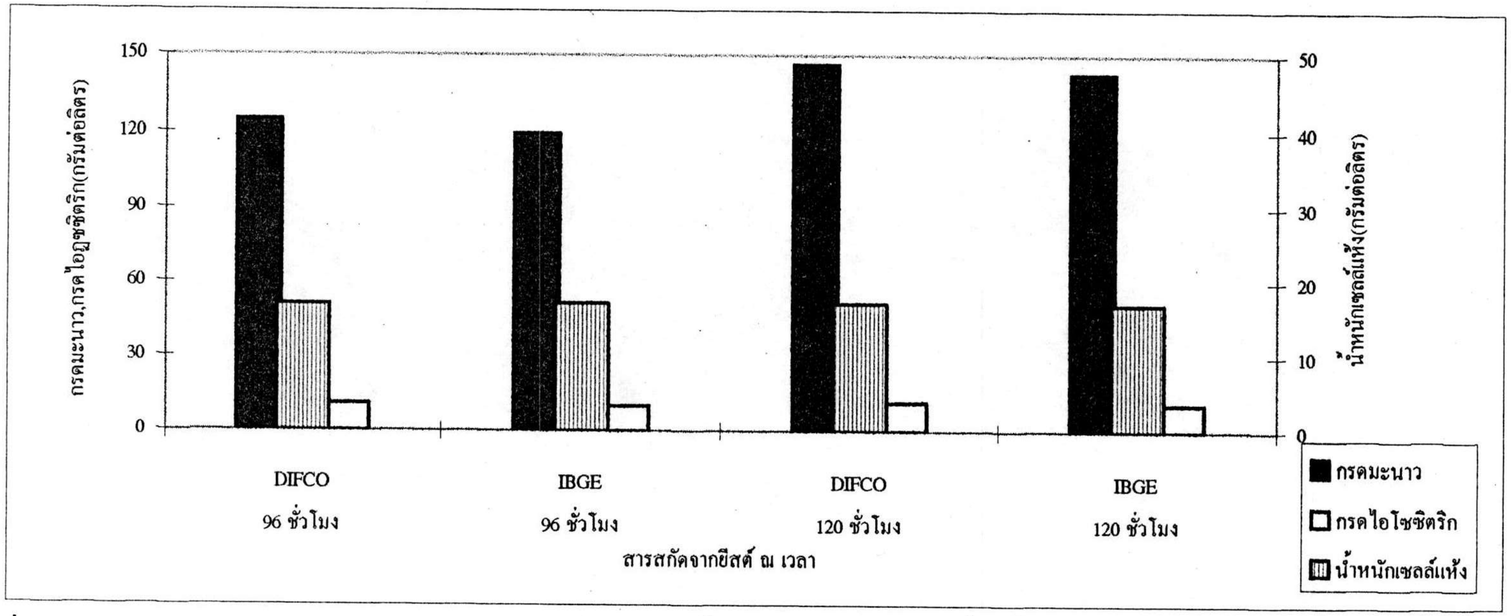
ทำการทดลองเช่นเดียวกับ 3.9.1.2.1 แต่ใช้สารสกัดจากยีสต์ของ IBGE 1.0 กรัมต่อลิตรในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.6) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 17 จะเห็นได้ว่าในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก การใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่เติมสารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO จะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงกว่าชนิดที่เติมสารสกัดจากยีสต์ของ IBGE ประมาณ 5.54 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แต่เมื่อใช้เวลาในการหมักต่อไปถึง 120 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณสูงขึ้นมาก จนปริมาณกรดมะนาวของทั้งสองชุดทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ อีกทั้งสารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO มีราคาแพง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้สารสกัดจากยีสต์ของ IBGE ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเพื่อศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

3.8.1.3 ผลของการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ชนิด IBGE ต่อการเจริญของยีสต์ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.3) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว แปรผันปริมาณเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์ชนิด IBGE เป็น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 กรัมต่อลิตร ติดตามการเจริญของเชื้อทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 3 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 18 พบว่า การเจริญของเชื้อในอาหารทั้ง 5 ชุด จะแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเชื้อจะเจริญได้เพียงเล็กน้อยในอาหารที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์เลย ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเพียง 3.13 กรัมต่อลิตร และเชื้อจะเจริญได้ดีขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์สูงขึ้นแต่การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งไม่เป็นสัดส่วนตามการเพิ่มขึ้นของสารสกัดจากยีสต์ เชื้ออายุ 15 ชั่วโมง จะมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.94 5.28 5.94 6.98 และ 7.30 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 0.0 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ 3.0 และ 4.0 กรัมต่อลิตรไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้สารสกัดจากยีสต์ของ IBGE ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ของ IBGE โดยอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อใช้สารสกัดจากยีสต์ของ IBGE และ DIFCO

เวลา (ชั่วโมง)	สารสกัดจากยีสต์ใน YM	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว(ร้อยละ)
96	DIFCO	2+	6.20	17.06	24.44	125.03	11.34	11.03	69.25
	IBGE	2+	6.27	17.20	31.45	119.49	10.38	11.51	68.85
120	DIFCO	5+	3.88	17.16	0.00	146.42	11.79	12.42	71.42
	IBGE	5+	4.02	17.02	1.38	143.21	11.32	12.65	70.33

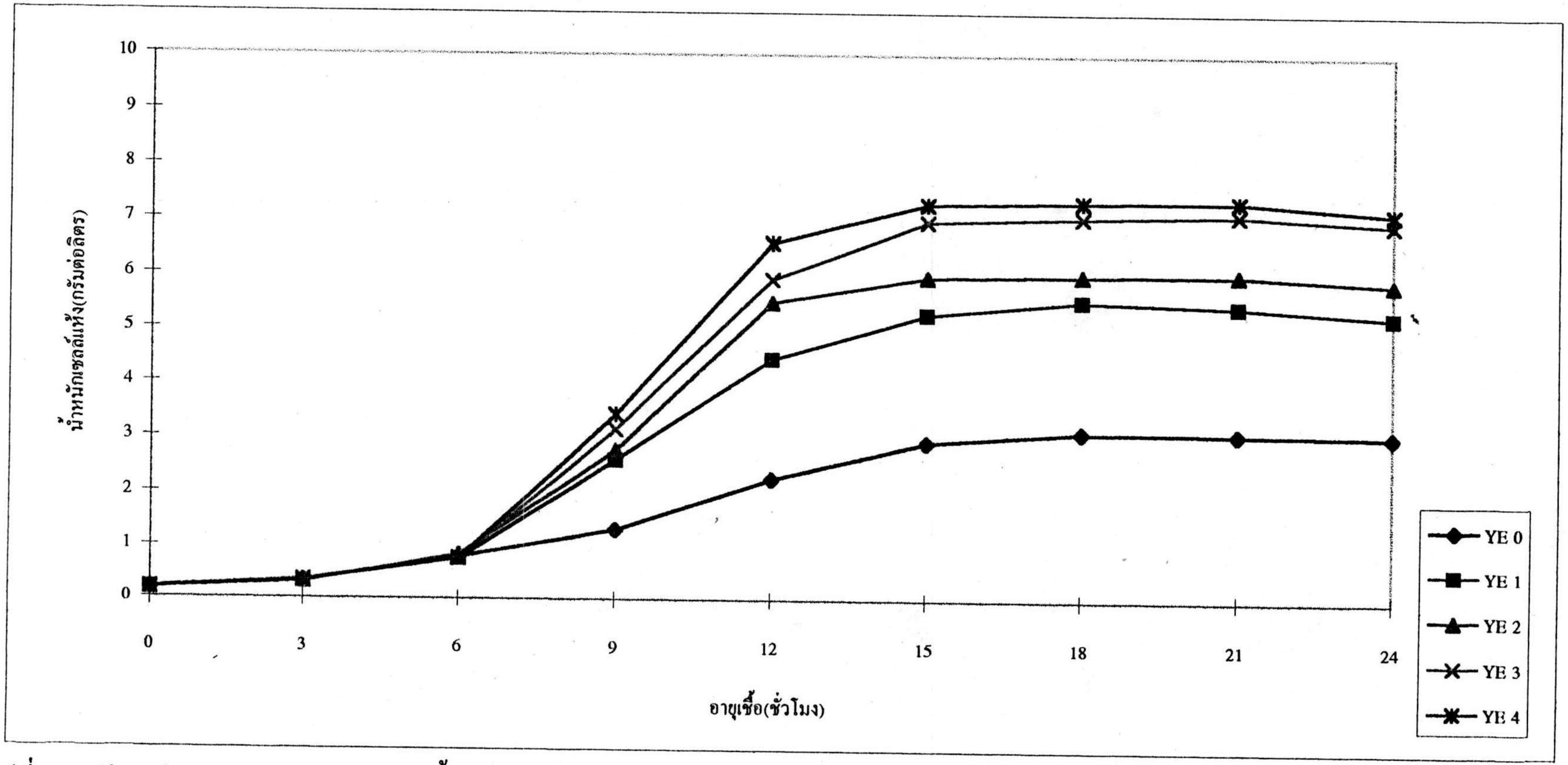


รูปที่ 17 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ของ IBGE โดยอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อใช้สารสกัดจากยีสต์ของ IBGE และ DIFCO

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ในระยะเวลาต่างๆเมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ IBGE

อายุเชื้อ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				
(ชั่วโมง)	YE 0	YE 1	YE 2	YE 3	YE 4
0	0.19	0.20	0.19	0.21	0.20
3	0.36	0.34	0.33	0.38	0.34
6	0.81	0.78	0.86	0.78	0.79
9	1.32	2.60	2.78	3.16	3.43
12	2.27	4.45	5.50	5.93	6.59
15	2.94	5.28	5.94	6.98	7.30
18	3.13	5.53	6.01	7.06	7.34
21	3.11	5.44	6.03	7.12	7.36
24	3.08	5.26	5.88	6.96	7.15

หมายเหตุ YE 0 YE 1 YE 2 YE 3 YE 4 หมายถึงอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่มีสารสกัดจากยีสต์ IBGE ความเข้มข้นเริ่มต้น 0 1 2 3 4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 18 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่แปรผันปริมาณเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์ IBGE ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ คำอธิบาย YE0 - YE4 แสดงดังตารางที่ 17

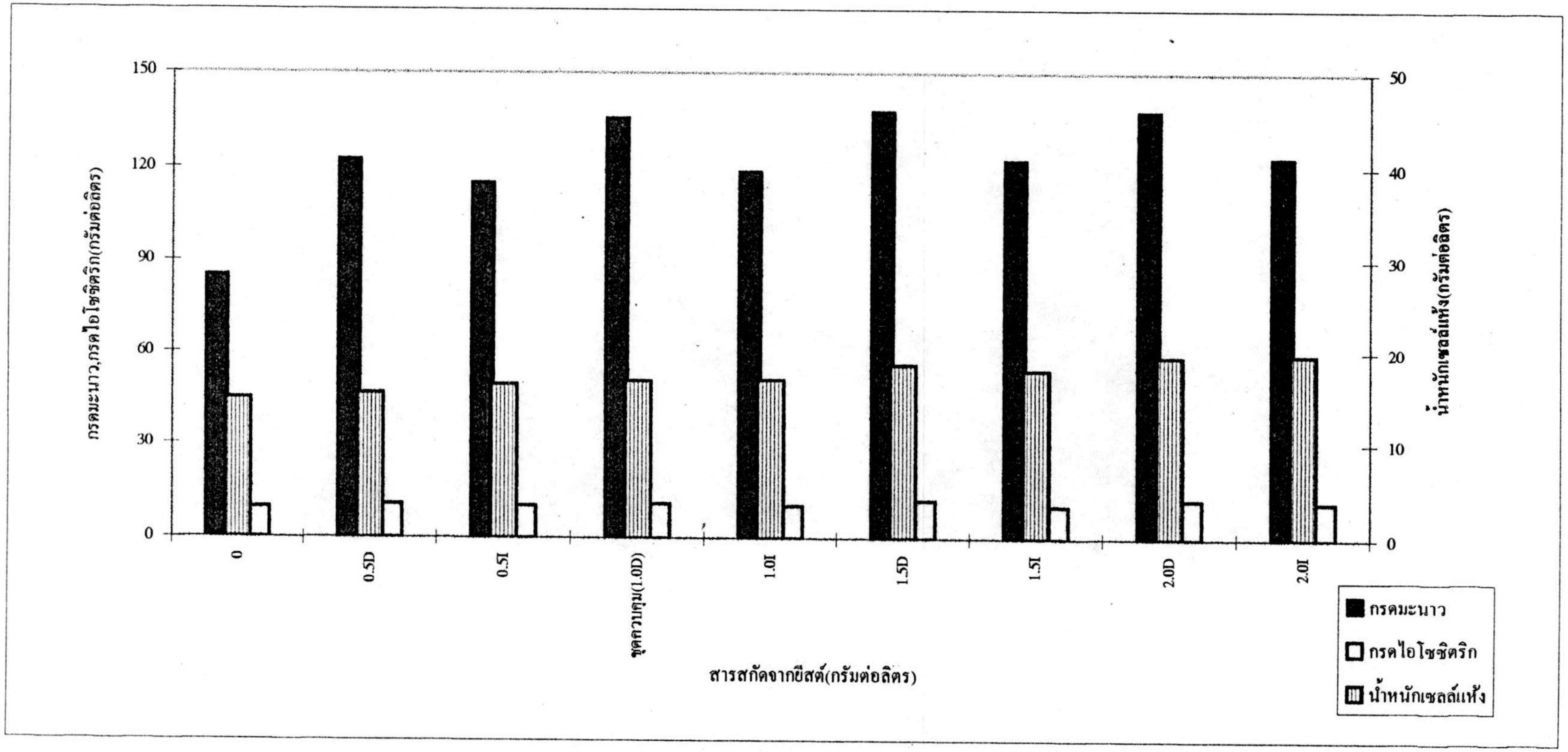
3.8.2 ผลของสารสกัดจากยีสต์ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว

เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.4) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว นำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.6) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว แปรผันปริมาณเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์ทั้ง DIFCO และ IBGE เป็น 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างเมื่อใช้เวลาในการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 18 , 19 และรูปที่ 19 , 20 พบว่าสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวอย่างมาก จากการทดลองจะเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ของปริมาณกรดมะนาวระหว่างการใช้สารสกัดจากยีสต์ทั้งสองชนิด ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก เชื้อ Candida oleophila NN-39 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีเมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO ความเข้มข้น 1.0-2.0 กรัมต่อลิตร แต่ในชั่วโมงสุดท้ายของการหมักกรดมะนาวที่ได้เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ของ IBGE กลับสูงขึ้นจนใกล้เคียงกับของ DIFCO โดยได้กรดมะนาวสูงสุด 143.71 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO คือ 146.08 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นเดียวกัน การเพิ่มปริมาณสารสกัดจากยีสต์จะทำให้การเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นแต่ไม่ช่วยเพิ่มปริมาณกรดกรดมะนาว และสำหรับชุดที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์เลย พบว่าทั้งปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก ตลอดจนน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำกว่าชุดทดลองอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด ดังนั้น ในการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป จะใช้สารสกัดจากยีสต์ของ IBGE ความเข้มข้นเริ่มต้น 1.0 กรัมต่อลิตร ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันชนิดและปริมาณเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์ ที่เวลา 96 ชั่วโมง

สารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว(ร้อยละ)
0	1+	6.45	15.04	67.50	84.96	9.67	8.79	60.47
0.5D	2+	6.21	15.60	27.16	122.56	10.88	11.26	67.77
0.5I	2+	6.29	16.53	35.44	115.13	10.27	11.21	66.72
ชุดควบคุม(1.0D)	3+	6.04	16.94	16.06	135.70	11.09	12.24	70.70
1.0I	2+	6.25	17.06	31.43	118.91	10.27	11.58	67.34
1.5D	3+	5.79	18.68	8.51	137.99	12.11	11.39	69.17
1.5I	2+	6.22	18.04	22.61	122.58	10.27	11.94	66.12
2.0D	3+	5.53	19.54	6.78	137.91	12.46	11.07	68.54
2.0I	2+	6.19	19.78	18.86	123.50	11.65	10.60	65.30

หมายเหตุ D และ I หมายถึงใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO และ IBGE ตามลำดับ

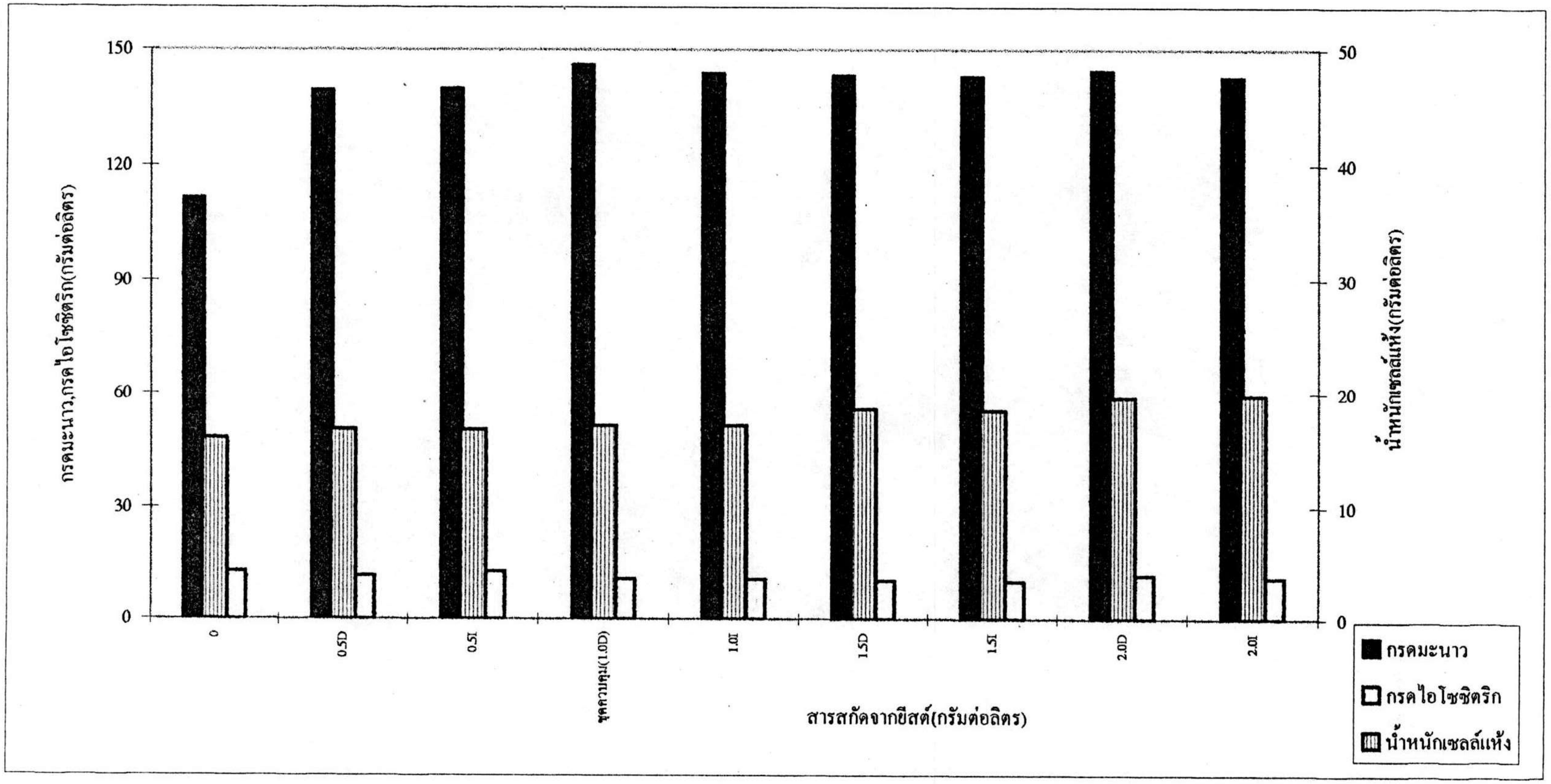


รูปที่ 19 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันชนิดและปริมาณเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์ ที่เวลา 96 ชั่วโมง

<u>ตารางที่ 19</u> เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันชนิดและปริมาณเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์ ที่เวลา 120 ชั่วโมง

สารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว(ร้อยละ)
0	3+	5.97	16.08	32.90	111.59	13.38	8.34	63.73
0.5D	5+	4.58	16.84	1.38	139.31	12.17	11.45	67.42
0.5I	4+	4.44	16.80	2.06	139.87	13.23	10.57	67.92
ชุดควบคุม(1.0D)	5+	3.92	17.16	0.00	146.08	11.14	13.11	70.23
1.0I	5+	4.10	17.14	1.05	143.71	11.11	12.94	69.44
1.5D	5+	3.93	18.64	0.00	143.21	10.73	13.35	68.85
1.5I	5+	4.08	18.50	0.00	142.94	10.48	13.64	68.72
2.0D	5+	3.99	19.60	0.00	144.56	12.06	11.99	69.50
2.0I	5+	4.28	19.83	1.26	142.67	11.34	12.58	69.01

<u>หมายเหตุ</u> D และ I หมายถึงใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO และ IBGE ตามลำดับ



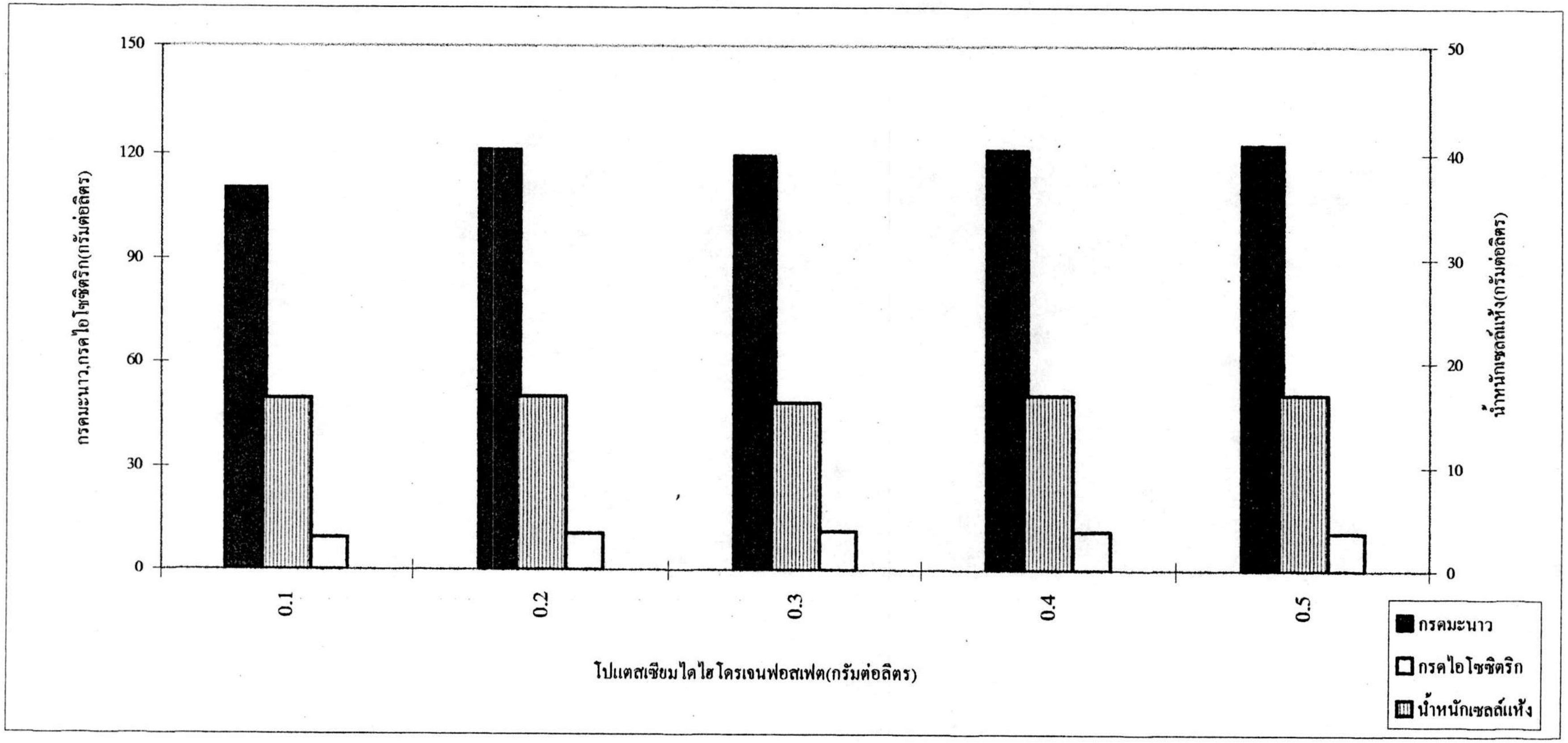
<u>รูปที่ 20</u> เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันชนิดและปริมาณเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์ ที่เวลา 120 ชั่วโมง

3.9 ปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสม

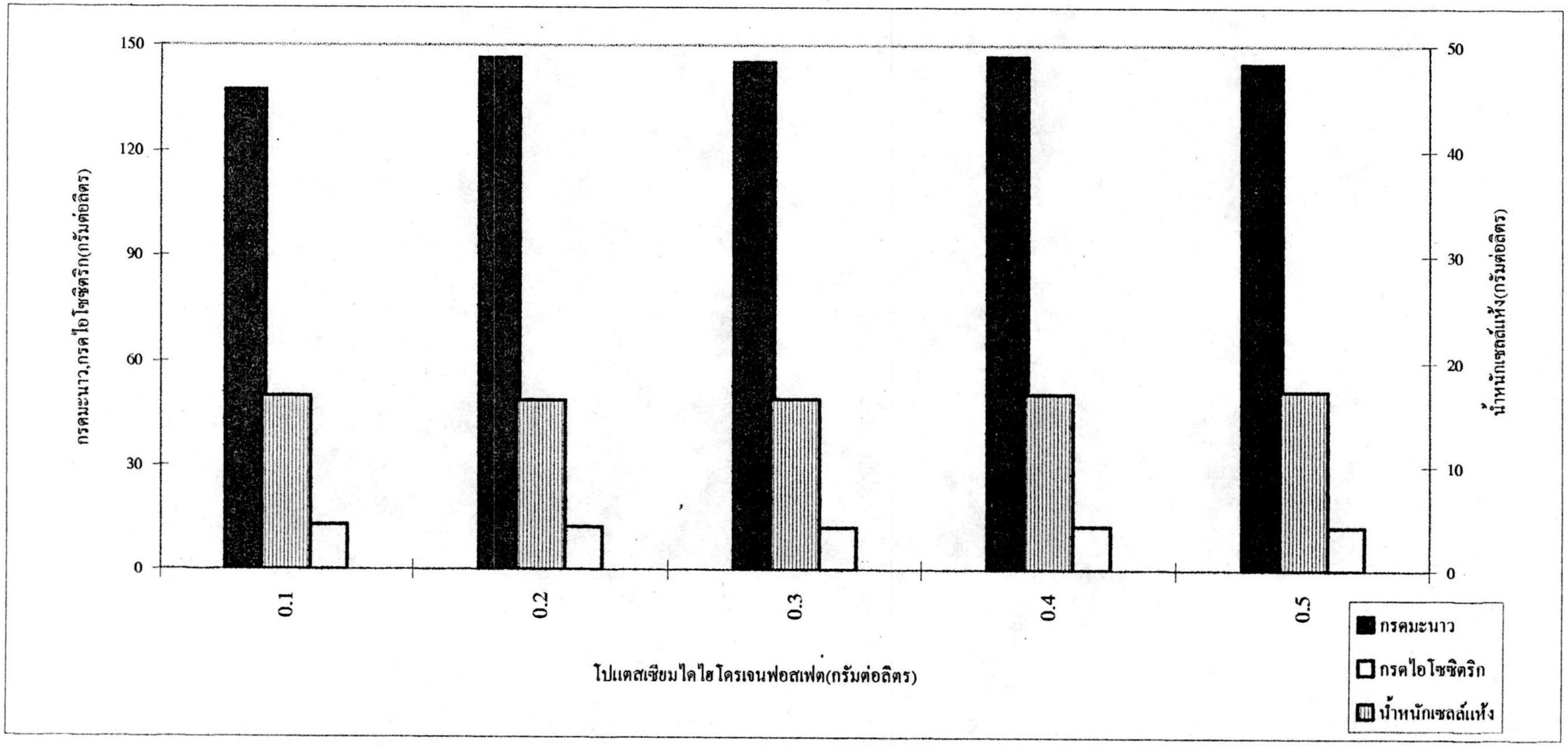
ในสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวนั้นจะต้องมีสารแหล่งฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นสารที่จำเป็นต่อการเจริญและการหมักของเชื้อยีสต์ แหล่งของฟอสฟอรัสที่นิยมใช้ในการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ ได้แก่ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ซึ่งจะเติมด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เช่น Moresi (1994) ใช้ 1.0 กรัมต่อลิตร Briffaud และ Engasser (1979) ใช้ 4.0 กรัมต่อลิตร ประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) รายงานการใช้โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73 ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.2 กรัมต่อลิตร เป็นต้น ดังนั้นในการทดลองนี้จะหาปริมาณที่เหมาะสมของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.4) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว นำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.7) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว แปรผันปริมาณเริ่มต้นของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 96 และ 120 ของการหมัก ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 20 และรูปที่ 21 , 22 จากการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2-0.5 กรัมต่อลิตรนั้น เชื้อ Candida oleophila NN-39 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณไม่แตกต่างกัน คือประมาณ 120 และ 145 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เวลาในการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการใช้ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % แสดงว่าโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตรนั้น เพียงพอสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดย Candida oleophila NN-39 จึงเลือกใช้ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาต่อไป สำหรับการเจริญของเชื้อนั้น พบว่า ปริมาณของสารแหล่งฟอสฟอรัสนี้ไม่มีผลอย่างเด่นชัดต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

เวลา (ชั่วโมง)	KH_2PO_4 (กรัมต่อลิตร)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว(ร้อยละ)
96	0.1	3+	6.32	16.54	36.61	110.35	9.98	11.06	65.61
	0.2	2+	6.21	16.72	26.48	121.27	11.25	10.78	68.00
	0.3	2+	6.24	16.12	28.12	119.54	11.88	10.06	67.66
	0.4	2+	6.20	16.84	26.52	121.32	11.94	10.16	68.05
	0.5	2+	6.16	16.96	23.83	122.74	11.59	10.59	67.82
120	0.1	5+	5.79	16.68	5.74	137.33	13.14	10.45	68.99
	0.2	5+	4.05	16.22	0.00	146.37	12.64	11.58	71.47
	0.3	5+	3.99	16.40	0.00	145.22	12.48	11.64	70.90
	0.4	5+	3.89	16.88	0.00	146.87	12.93	11.36	71.71
	0.5	5+	3.85	17.22	0.00	144.90	12.76	11.36	70.75



<u>รูปที่ 21</u> เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง



รูปที่ 22 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 120 ชั่วโมง

<u>การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร</u>

จากการทดลองที่ผ่านมา ได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในระดับขวดเขย่าคือ อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อตามภาคผนวก ก 1.4 และอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวตามภาคผนวก ก 2.8 จึงได้นำภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับศึกษาการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยปัจจัยต่าง ๆ ที่สนใจศึกษา ได้แก่ การเจริญและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร ข้อแตกต่างระหว่างอาหารที่ใช้ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต และแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตต่างกัน การแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต การแบ่งเติมน้ำตาลโดยควบคุมความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ผลของการเติมน้ำเป็นระยะ ๆ และการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างด้วยแคลเซียมออกไซด์

3.10 การเจริญและการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.9)ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 21 และรูปที่ 23 , 24 พบว่า ในช่วงแรก ๆ ของการหมักเชื้อจะให้ปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว ตลอดจนอัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริกสูงกว่าในระดับขวดเขย่าอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อการหมักดำเนินไปถึงชั่วโมงท้าย ๆ ความแตกต่างนี้จะลดลง จนในชั่วโมงที่ 96 ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดที่เชื้อผลิตได้คือ 124.67 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 67.34 ซึ่งไม่แตกต่างจากผลการทดลองที่ได้ในระดับขวดเขย่า (ข้อ 3.9) ที่ใช้สูตรอาหารเดียวกัน ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดในน้ำหมักที่เหลือประมาณ 355.93 กรัม คิดเป็นผลผลิตทั้งหมดในถังหมักประมาณร้อยละ52.87 สำหรับการเจริญของเชื้อ พบว่าเชื้อมีการเจริญมากกว่าการเลี้ยงในระดับขวดเขย่าโดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 20.83 กรัมต่อลิตร ที่เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง การทดลองนี้พบว่าน้ำหมักเริ่มหนืดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเร็วกว่าในขวดเขย่า และหนืดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อย่างรวดเร็ว

<u>ตารางที่ 21</u> ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ระยะเวลาการหมัก(ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$
0	0	6.23	0.76	224.31	0.00	0.00	-	0.000	0.000	-
12	0	6.20	6.45	210.17	0.00	0.00	-	0.000	0.402	0.000
24	0	5.98	9.95	183.49	12.44	-	-	0.305	0.225	1.354
36	0	5.93	14.05	155.67	40.93	4.80	8.53	0.596	0.194	3.080
48	1+	5.89	16.25	125.88	68.59	6.25	10.97	0.697	0.157	4.428
60	3+	5.87	16.20	93.63	92.05	7.09	12.98	0.704	0.118	5.962
72	4+	5.96	19.00	65.10	113.28	8.10	13.99	0.712	0.115	6.211
84	5+	6.00	20.30	47.65	119.34	9.09	13.13	0.676	0.111	6.107
96	5+	6.01	20.83	39.17	124.67	12.38	10.07	0.673	0.114	6.212

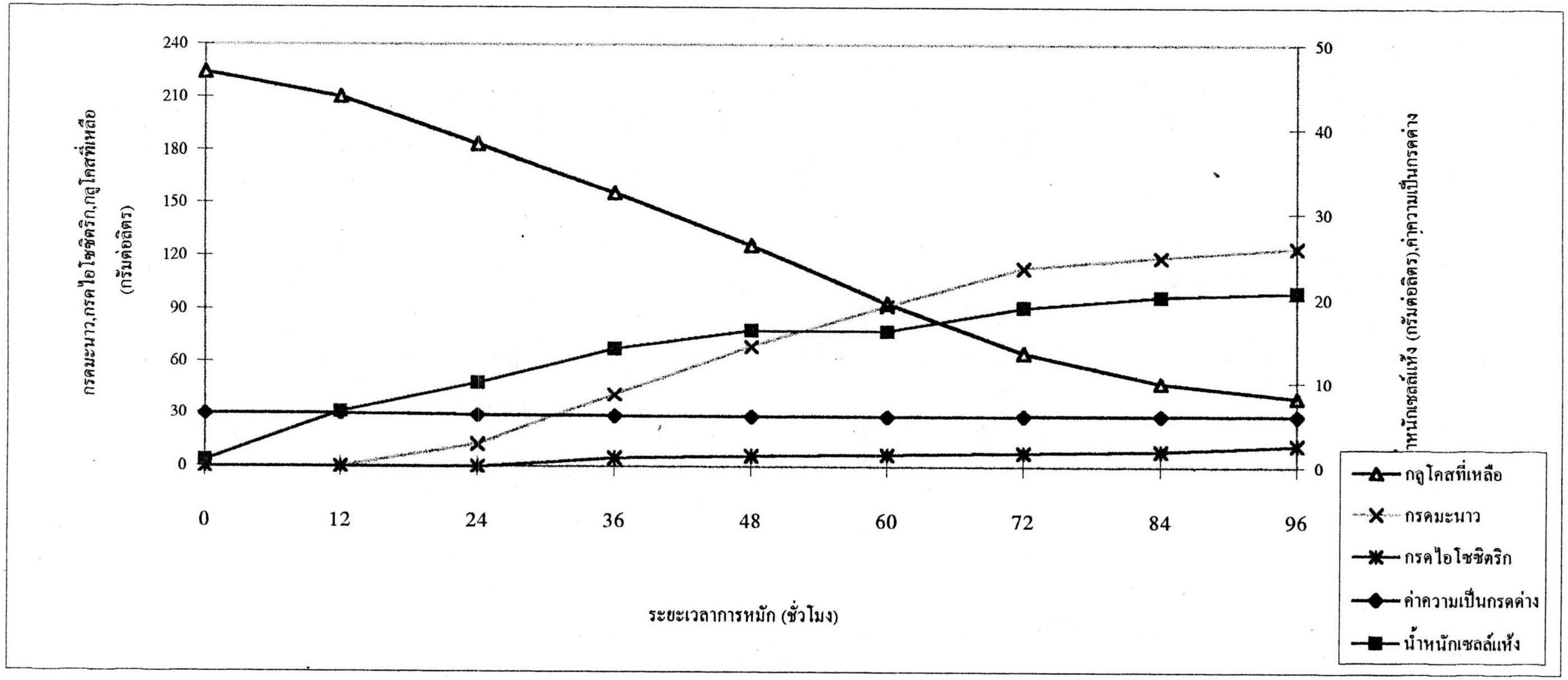
ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 2,855 มิลลิลิตร

คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 355.93 กรัม $Y_{p/s}$(ทั้งหมดในถังหมัก) ประมาณ 0.529

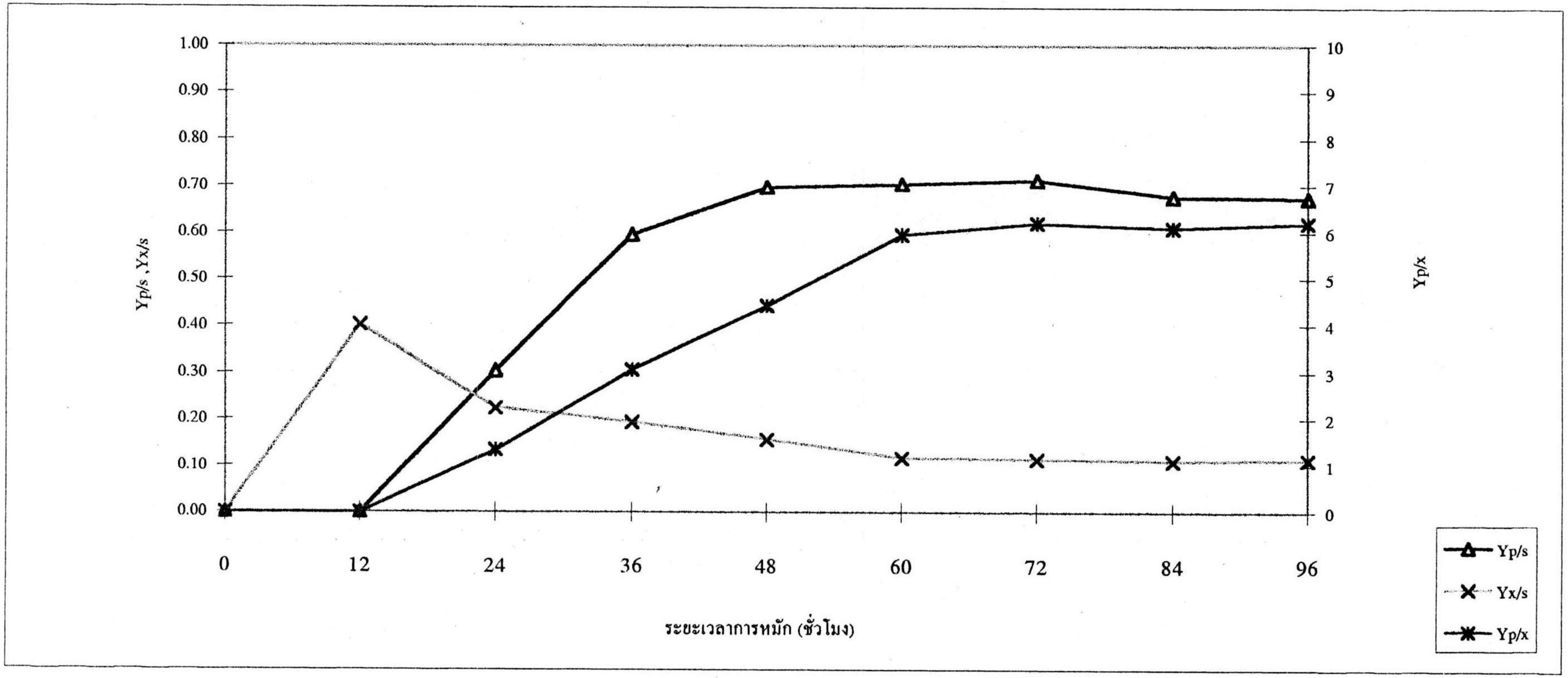
<u>หมายเหตุ</u> - หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณผลได้จากการวิเคราะห์โดย HPLC

ผลผลิตทั้งหมดในถังหมักที่คำนวณได้จะต่ำกว่าค่าที่แท้จริง เนื่องจากต้องเสียกรดมะนาวและน้ำตาลกลูโคสบางส่วนไปในขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

ความหนืดดูจากตัวอย่างน้ำหมักในกระบอกตวง เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยดังนี้ 5+>4+>3+>2+>1+>0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดระดับ 5+ นั้น สามารถคว่ำกระบอกตวงได้โดยน้ำหมักไม่ไหล



รูปที่ 23 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคส ในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



<u>รูปที่ 24</u> ค่า $Y_{p/s}$,$Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.11 ผลการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างโดยแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

จากผลการทดลองในข้อ 3.10 พบว่าน้ำหมักหนืดมาก และได้กรดมะนาวในปริมาณต่ำกว่าที่ควร ซึ่งสาเหตุหนึ่งของปัญหาความหนืดอาจมาจากแคลเซียมคาร์บอเนต ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้แบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต โดยเลี้ยงเชื้อ<u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.10) ตามวิธีในข้อ 2.3 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้ไม่ต่ำกว่า 5.00 โดยแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็น 7 ครั้ง ครั้งแรก 45 กรัม ครั้งที่ 2-6 ครั้งละ 60 กรัม และครั้งสุดท้าย 75 กรัม เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 22 และรูปที่ 25 , 26 จากการทดลองพบว่าการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีผลให้น้ำหมักหนืดน้อยลงเล็กน้อย และเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีกว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตทั้งหมดตั้งแต่ต้น โดยปริมาณกรดมะนาวสูงสุดคือ 131.18 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 65.01 ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 406.66 กรัม คิดเป็นผลผลิตทั้งหมดในถังหมักประมาณร้อยละ 56.92 แต่การเจริญของเชื้อจะลดลงได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 17.68 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับในระดับขวดเขย่า ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะควบคุมค่าความเป็นกรดด่างโดยวิธีแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

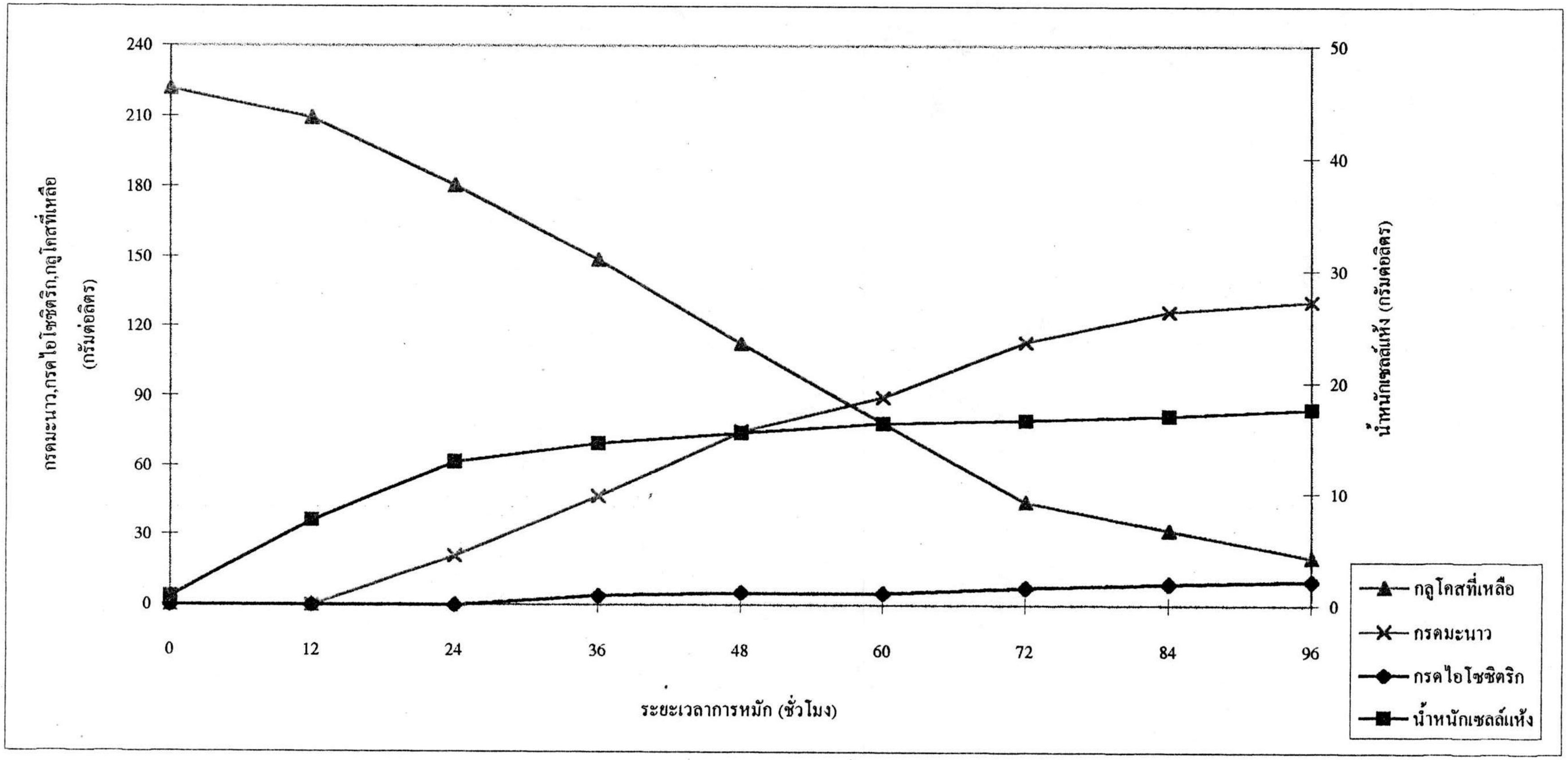
ตารางที่ 22 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างโดยแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ระยะเวลาการหมัก(ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	0	5.73	0.74	222.33	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	-
12	0	5.69	7.55	209.65	0.00	0.00	0.00	0.000	0.537	0.000
15.50 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.08 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.77										
24	0	5.16	12.90	180.66	20.92	-	-	0.502	0.292	1.720
26.50 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.05 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.87										
36	0	5.24	14.55	149.03	46.89	4.02	11.66	0.640	0.188	3.395
40 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.02 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.01										
48	1+	5.27	15.48	112.62	75.14	5.47	13.74	0.685	0.134	5.098
50.50 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.03 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.07										
60	2+	5.37	16.37	78.84	89.95	5.34	16.84	0.627	0.109	5.755
62 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.02 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.11										
72	3+	5.82	16.68	44.49	113.55	7.67	14.80	0.639	0.090	7.124
84	4+	5.11	17.05	32.19	126.73	9.36	13.54	0.667	0.086	7.770
85 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.02 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.23										
96	5+	6.13	17.68	20.56	131.18	10.48	12.52	0.650	0.084	7.744

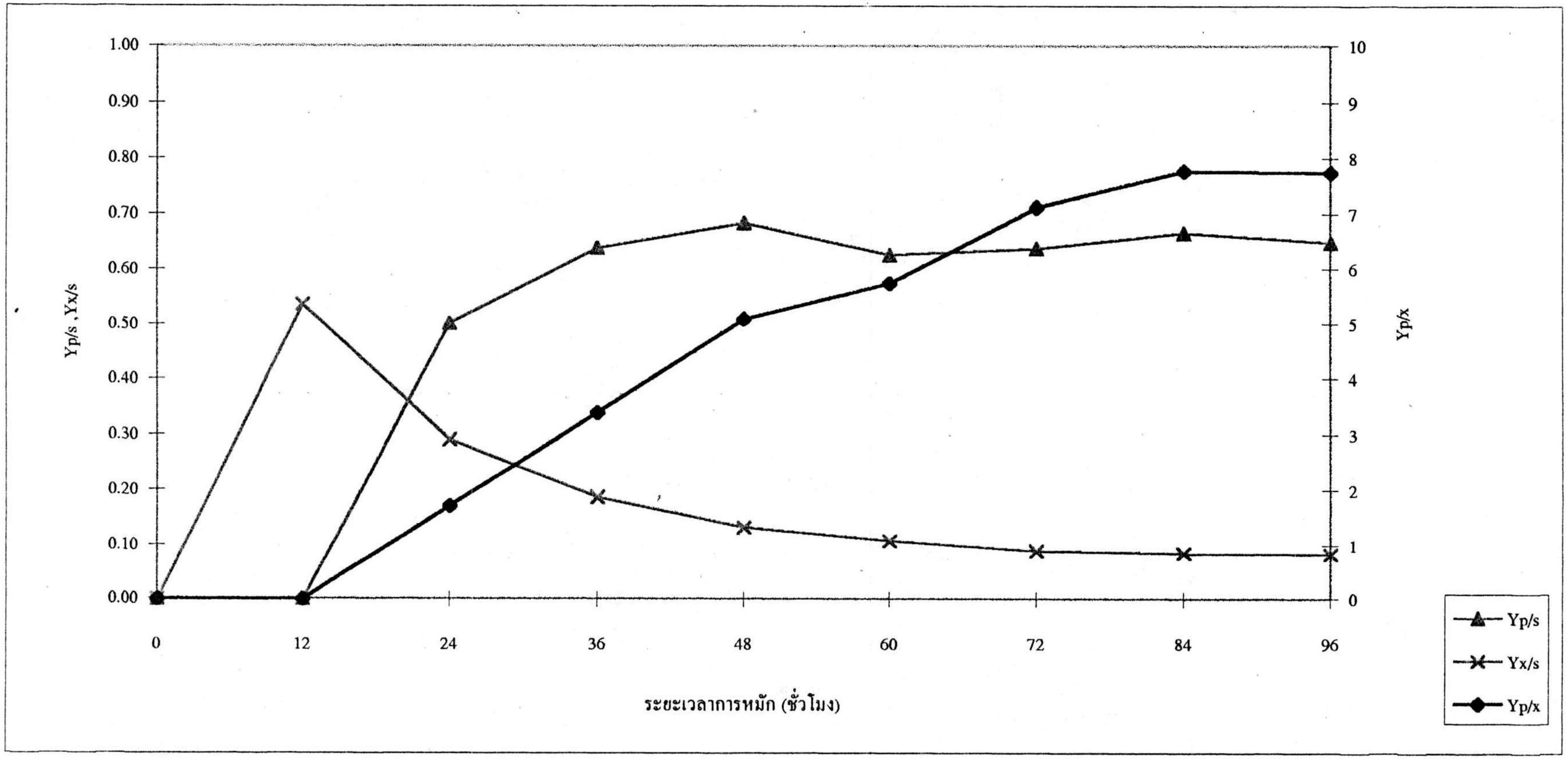
ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,100 มิลลิลิตร

คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 406.66 กรัม

$Y_{p/s}$(ทั้งหมดในถังหมัก) ประมาณ 0.569



<u>รูปที่ 25</u> ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำตาลกลูโคส ในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างโดยแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต



<u>รูปที่ 26</u> ค่า $Y_{p/s}$,$Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างโดยแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

3.12 ผลการเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่ลดปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต

จากการทดลองในข้อ 3.11 แม้ว่าการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างโดยแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะทำให้น้ำหมักหนืดน้อยกว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตทั้งหมดตั้งแต่ต้น แต่ระดับความหนืดก็ยังอยู่ในขั้นที่เป็นอุปสรรคต่อการหมัก นอกจากนี้ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่ได้ก็ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ และเนื่องจากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IBGE) ได้ทดลองผลิตกรดมะนาวระดับถังหมักโดยเชื้อ Candida oleophila NNU-62 โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ เป็นแหล่งของคาร์บอนเช่นเดียวกัน พบปัญหาความหนืดน้อยมาก ซึ่งอาจเนื่องมาจากสูตรอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตกรดมะนาวแตกต่างกัน คือ ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร และใช้แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.25 กรัมต่อลิตร (ยังไม่ได้ตีพิมพ์) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้สูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.1) เช่นเดียวกับการทดลองของ IBGE เลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว และแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.11 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 23 และรูปที่ 27 , 28 พบว่า น้ำหมักยังคงหนืดอยู่มาก และค่าความเป็นกรดด่างก็ลดลงช้ากว่าในการทดลอง 3.11 จนไม่สามารถเติมแคลเซียมคาร์บอเนตได้ครบตามจำนวนครั้งที่กำหนดไว้ นอกจากนี้ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ก็ต่ำกว่าสูตรที่ใช้ในข้อ 3.11 อีกด้วย โดยที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง เชื้อผลิตกรดมะนาวได้เพียง 127.72 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 65.01 ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมัก 391.46 กรัม คิดเป็นผลผลิตทั้งหมดในถังหมักประมาณร้อยละ 55.91 แสดงว่าสูตรอาหารนี้ไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila NN-39 ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.4 กรัมต่อลิตรและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.3 กรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาต่อไป

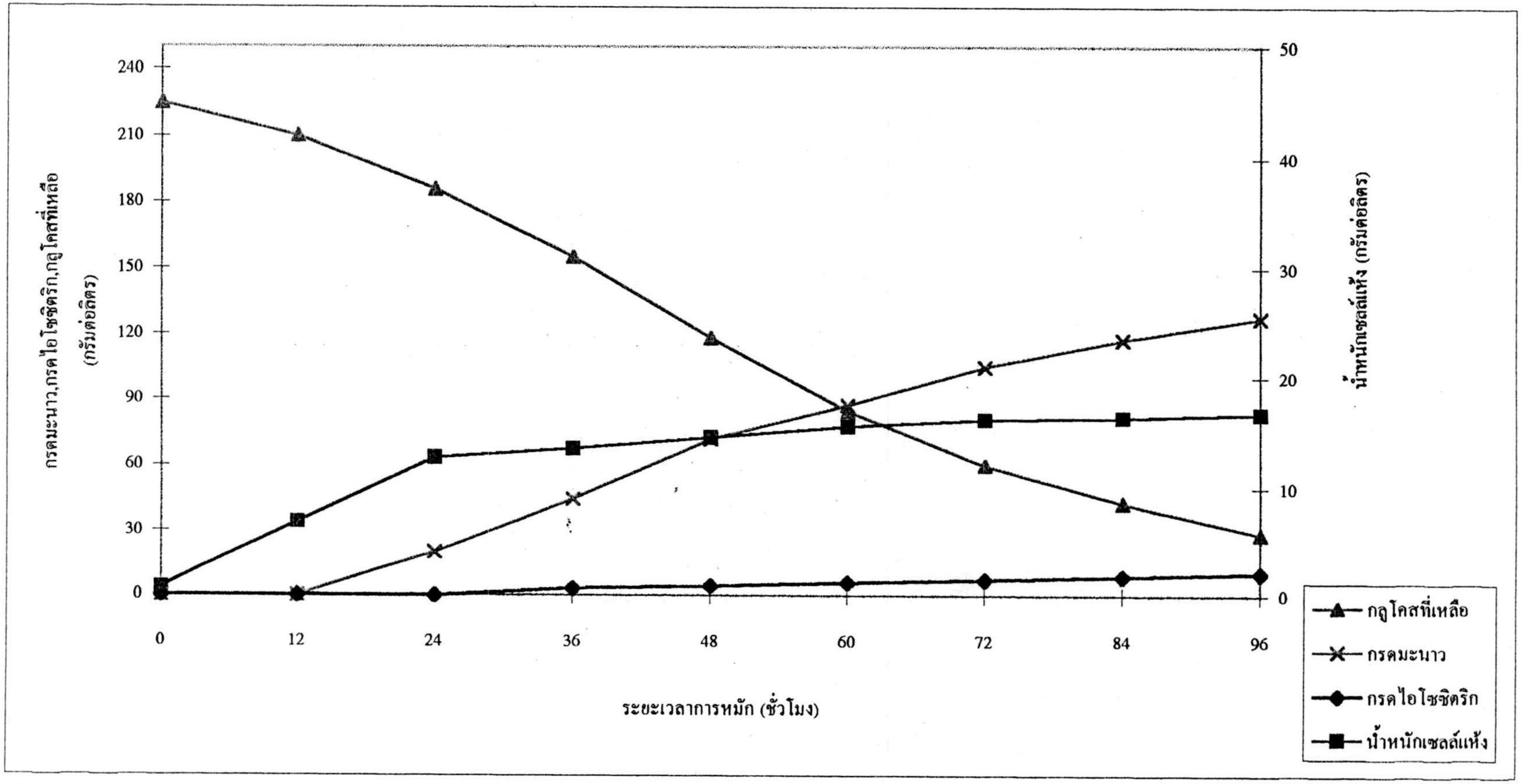
<u>ตารางที่ 23</u> ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.2 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ระยะเวลาการหมัก(ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	0	5.86	0.72	225.31	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	-
12	0	5.84	6.85	210.64	0.00	0.00	0.00	0.000	0.418	0.000
15.50 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.08 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.80										
24	0	5.33	12.75	186.01	20.01	-	-	0.509	0.306	1.663
30 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.02 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.00										
36	0	5.52	13.55	155.34	45.19	3.32	13.61	0.646	0.183	3.522
43 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.03 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.09										
48	1+	5.65	14.60	118.62	72.30	4.59	15.76	0.678	0.130	5.209
56 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.08 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.07										
60	2+	5.73	15.60	85.04	87.83	6.02	14.59	0.626	0.106	5.903
68.50 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.05 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.23										
72	3+	6.21	16.24	60.45	105.55	7.24	14.58	0.640	0.094	6.801
84	4+	6.11	16.44	43.49	117.74	8.84	13.32	0.648	0.086	7.490
96	5+	5.90	16.76	28.85	127.72	10.30	12.40	0.650	0.082	7.963

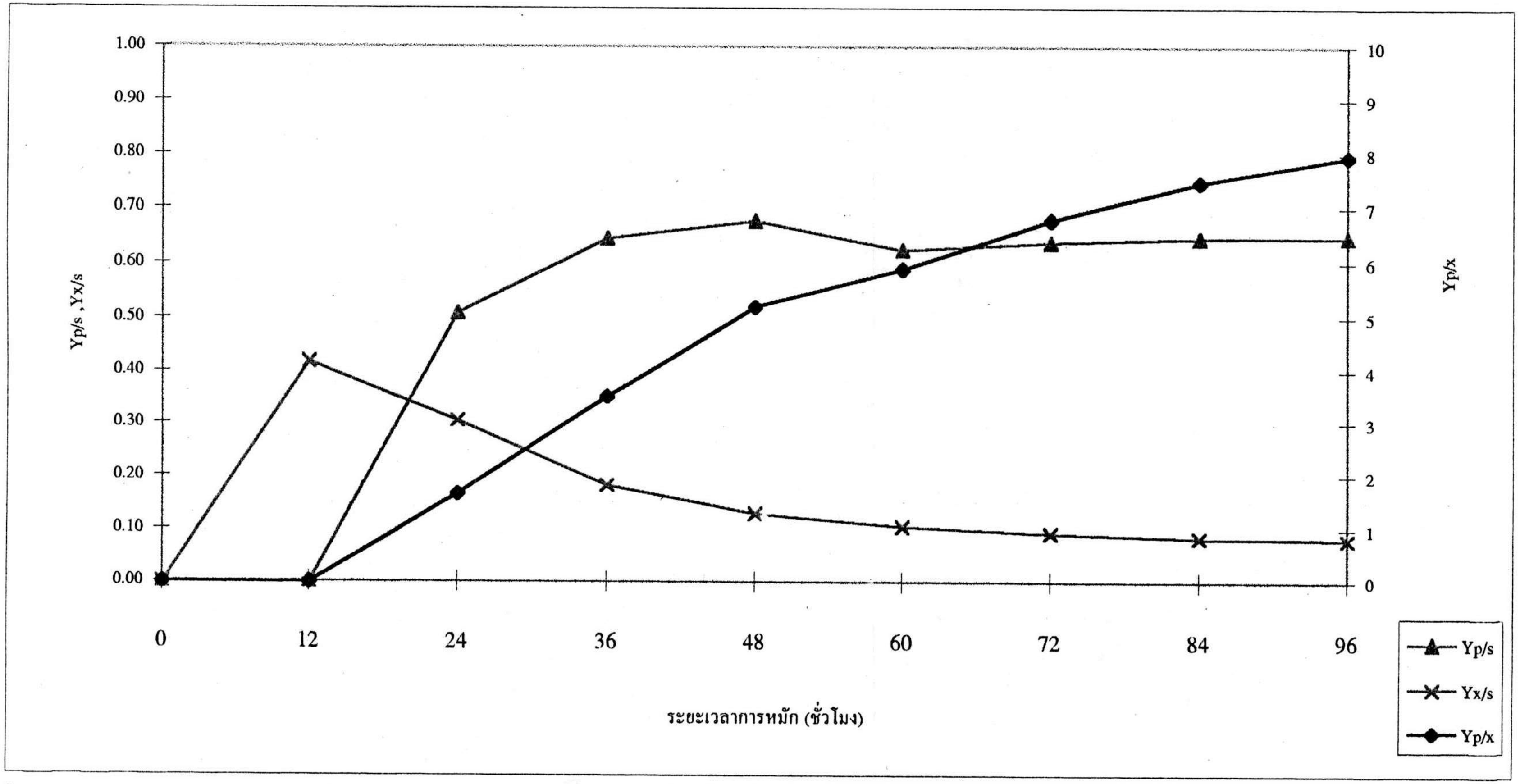
ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,065 มิลลิลิตร

คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 391.46 กรัม

$Y_{p/s}$(ทั้งหมดในถังหมัก) ประมาณ 0.559



<u>รูปที่ 27</u> ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำตาลกลูโคส ในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.2 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



<u>รูปที่ 28</u> ค่า $Y_{p/s}$,$Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร โดยมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.2 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3.13 ผลการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในถังหมัก

3.13.1 ควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ที่ 50 กรัมต่อลิตร

จากการทดลองในระดับถังหมักที่ผ่านมาจะสังเกตได้ว่าปริมาณกรดมะนาวที่เชื้อสร้างขึ้นนั้นจะเพิ่มอย่างรวดเร็วในช่วงแรก ๆ แต่หลังจากที่น้ำหมักมีความหนืดมาก ๆ แล้วจะได้กรดมะนาวเพิ่มขึ้นน้อยมาก ซึ่งสาเหตุหนึ่งของปัญหาความหนืดที่พบนั้นเป็นผลจากแคลเซียมคาร์บอเนต (ตามผลการทดลองข้อ 3.11) และอีกสาเหตุหนึ่งอาจเนื่องมาจากเชื้อสร้างสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งการใช้อาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงๆ อาจทำให้เชื้อสร้างสารโพลีแซคคาไรด์ได้มาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.11) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว แต่ให้มีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.0 ลิตร ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในถังหมัก 100 กรัมต่อลิตร และควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร ด้วยการเติมอย่างต่อเนื่องโดยใช้เพอริสตอลติคปั๊ม จนกระทั่งมีน้ำตาลกลูโคสทั้งหมดที่เติมลงไปประมาณ 220 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างตามภาวะที่ได้ในข้อ 3.11 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 24 (ครั้งที่ 1) และ 25 (ครั้งที่ 2) และรูปที่ 29 , 30 (ครั้งที่ 1) และ 31 , 32 (ครั้งที่ 2) พบว่า น้ำหมักหนืดน้อยลงมาก และเริ่มหนืดช้าลงคือประมาณชั่วโมงที่ 72 ได้ปริมาณกรดมะนาวในชั่วโมงสุดท้ายของการหมักถึง 152.63 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 459.42 กรัม สำหรับการหมักครั้งที่ 1 และปริมาณกรดมะนาว 143.30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 443.51 กรัม สำหรับการหมักครั้งที่ 2 ในด้านการเจริญของเชื้อ พบว่าเชื้อสามารถเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมักทั้ง 2 ครั้ง แต่น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ได้จะน้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อโดยเติมองค์ประกอบของอาหารทั้งหมดตั้งแต่ต้นตามผลการทดลองในข้อ 3.10

ตารางที่ 24 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ครั้งที่ 1)

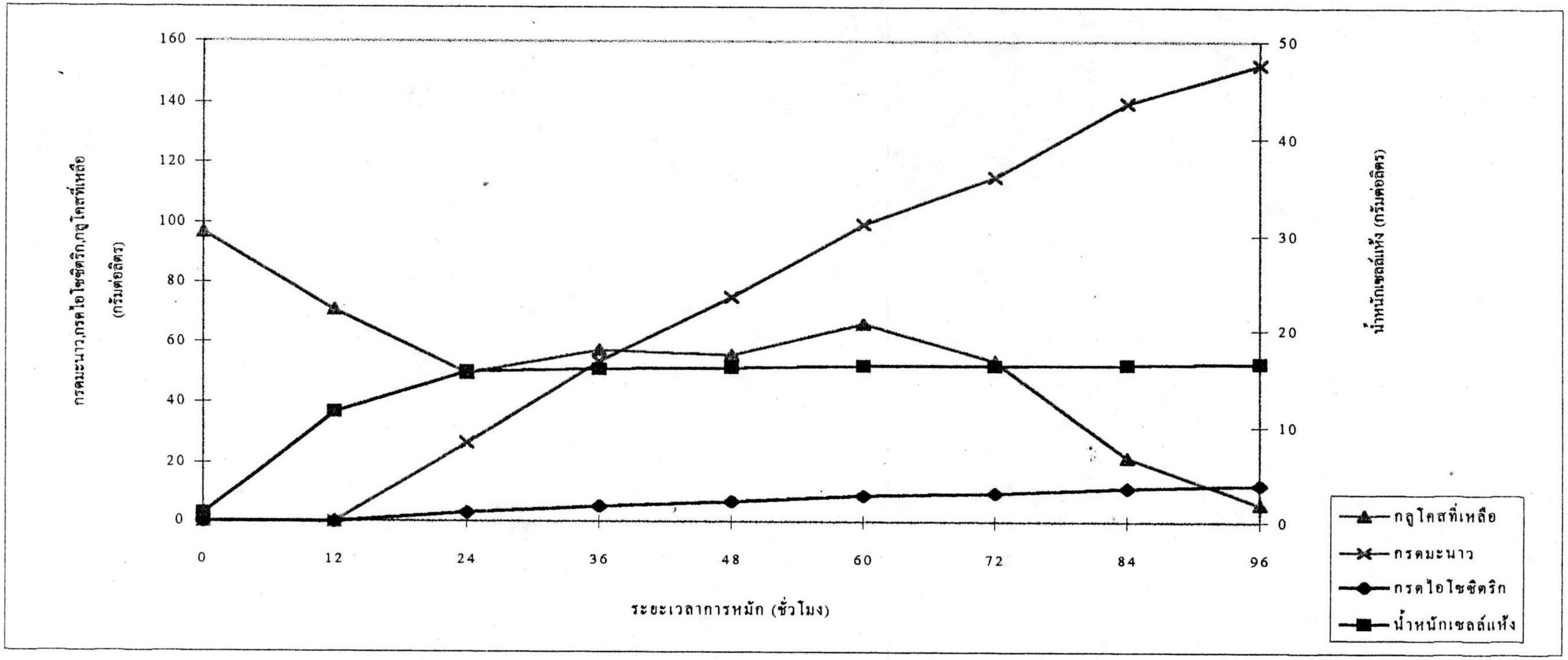
ระยะเวลาการหมัก(ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ* (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	0	5.88	0.87	97.19	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	-
12	0	5.23	11.55	71.09	0.00	0.00	0.00	0.000	0.409	0.000
13.50 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.01 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.92										
24	0	5.09	15.70	49.65	26.91	3.09	8.71	0.470	0.259	1.815
25 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.02 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.97										
36	0	5.01	16.00	57.45	53.63	5.27	10.18	0.631	0.178	3.545
36 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.01 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.98										
47.50 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.00 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.07										
48	0	6.05	16.10	55.80	75.41	6.86	10.99	0.650	0.131	4.951
60	0	5.01	16.35	66.42	99.86	8.87	11.26	0.741	0.115	6.451
60 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.01 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.98										
72	1+	5.23	16.35	53.80	115.34	9.86	11.70	0.689	0.092	7.451
74 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.01 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.13										
84	3+	5.68	16.45	22.03	140.13	11.55	12.13	0.708	0.079	8.994
96	4+	4.17	16.60	6.09	152.63	12.82	11.91	0.714	0.074	9.703

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,010 มิลลิลิตร

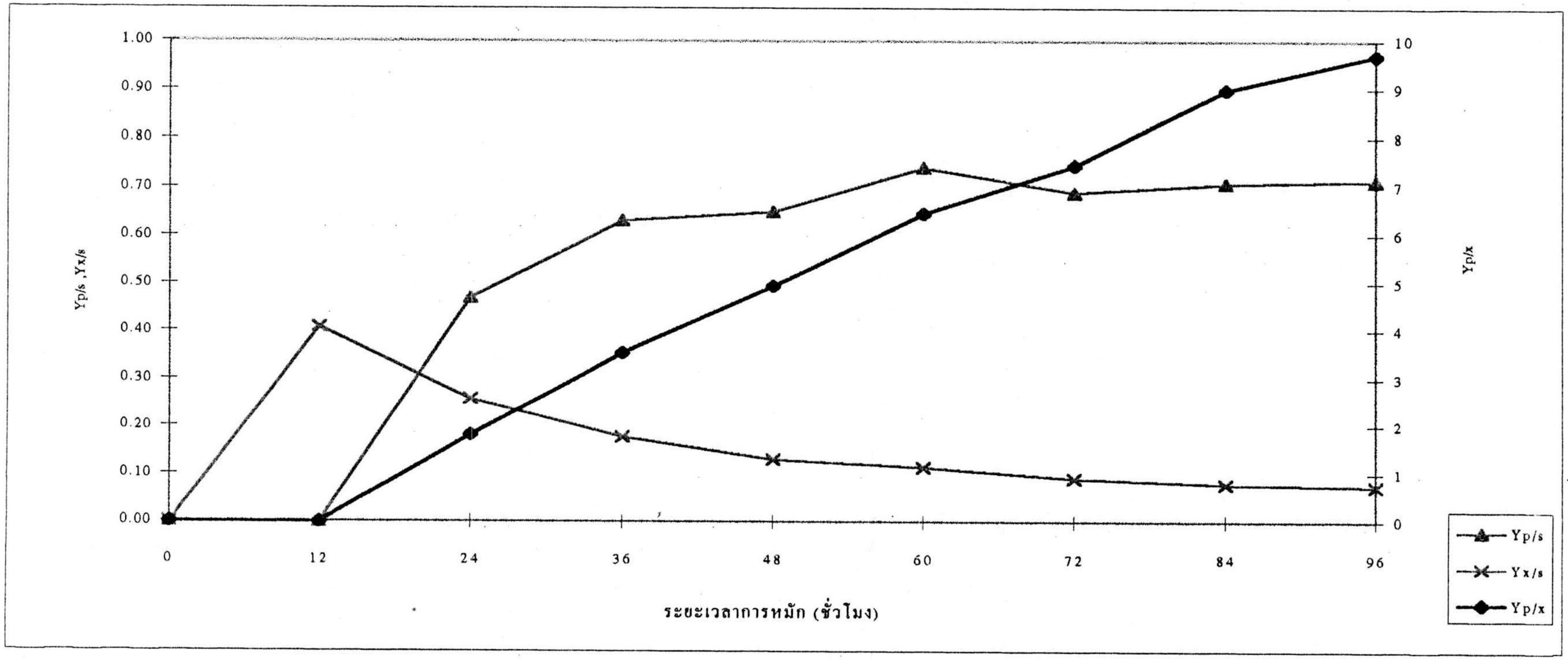
คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 459.42 กรัม

$Y_{p/s}$(ทั้งหมดในถังหมัก) ประมาณ 0.611

หมายเหตุ * เริ่มเติมน้ำตาลที่เวลา 22 ชั่วโมงของการหมัก



<u>รูปที่ 29</u> ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำตาลกลูโคส ในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ครั้งที่ 1)



<u>รูปที่ 30</u> ค่า Yp/s , Yx/s , Yp/xในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ครั้งที่1)

ตารางที่ 25 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ครั้งที่ 2)

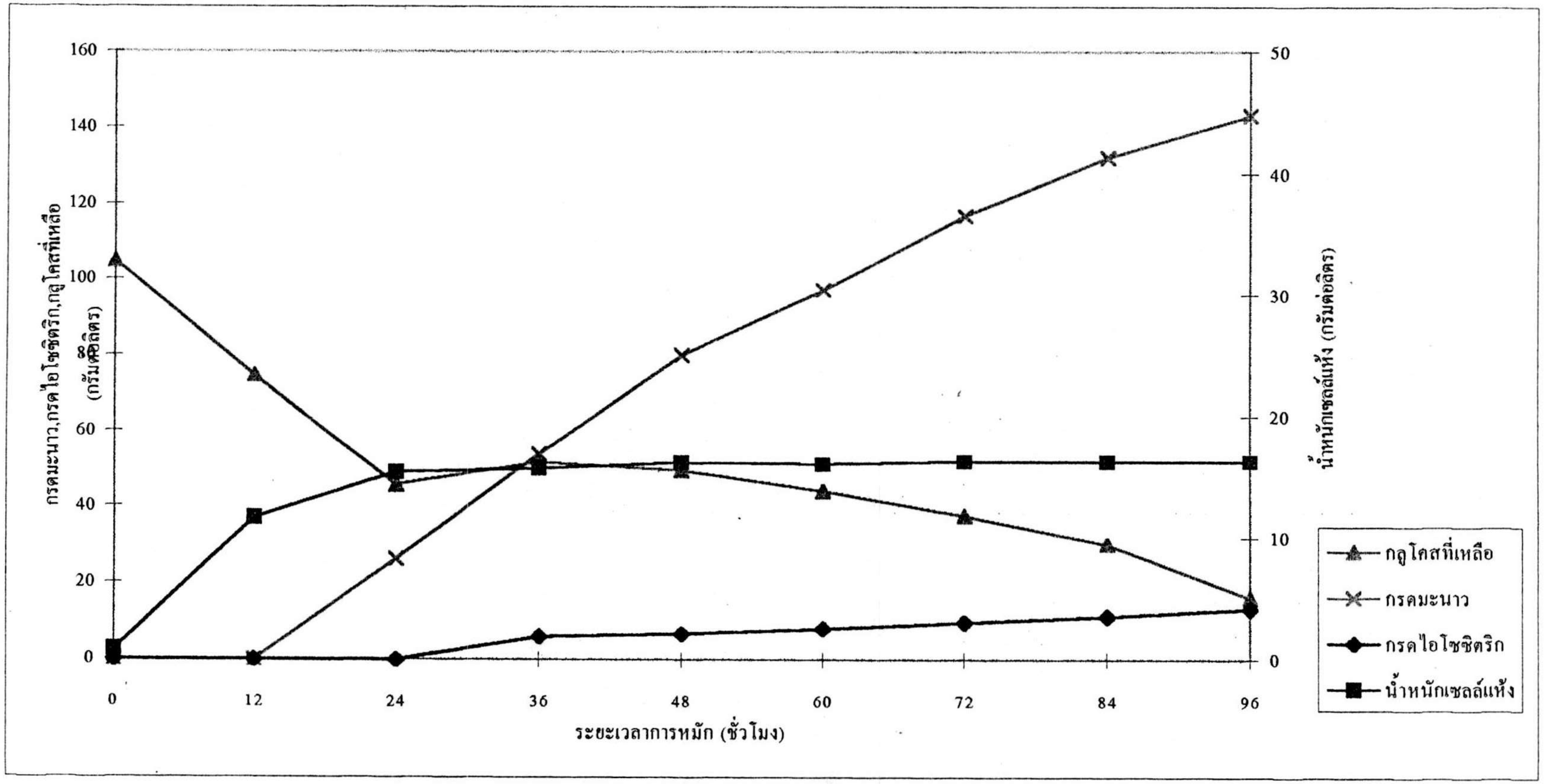
ระยะเวลาการหมัก(ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ* (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	0	6.01	0.85	104.82	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	-
12	0	5.32	11.55	74.75	0.00	0.00	0.00	0.000	0.356	0.000
14.50 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.00 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.90										
24	0	5.15	15.30	45.74	26.30	-	-	0.432	0.237	1.820
26 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.01 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.06										
36	0	5.16	15.65	51.71	54.09	6.04	8.96	0.603	0.165	3.655
37 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.06 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.08										
48	0	5.07	16.15	49.54	80.16	6.81	11.77	0.652	0.125	5.239
48.50 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.01 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.06										
60	0	5.25	16.05	44.25	97.43	8.33	11.70	0.691	0.108	6.410
62 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.01 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.11										
72	2+	5.41	16.30	37.80	117.32	9.97	11.77	0.683	0.090	7.594
75 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.01 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.22										
84	4+	5.92	16.24	30.35	132.41	11.46	11.55	0.698	0.081	8.604
96	4+	5.83	16.27	16.30	143.30	13.49	10.62	0.703	0.076	9.293

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,095 มิลลิลิตร

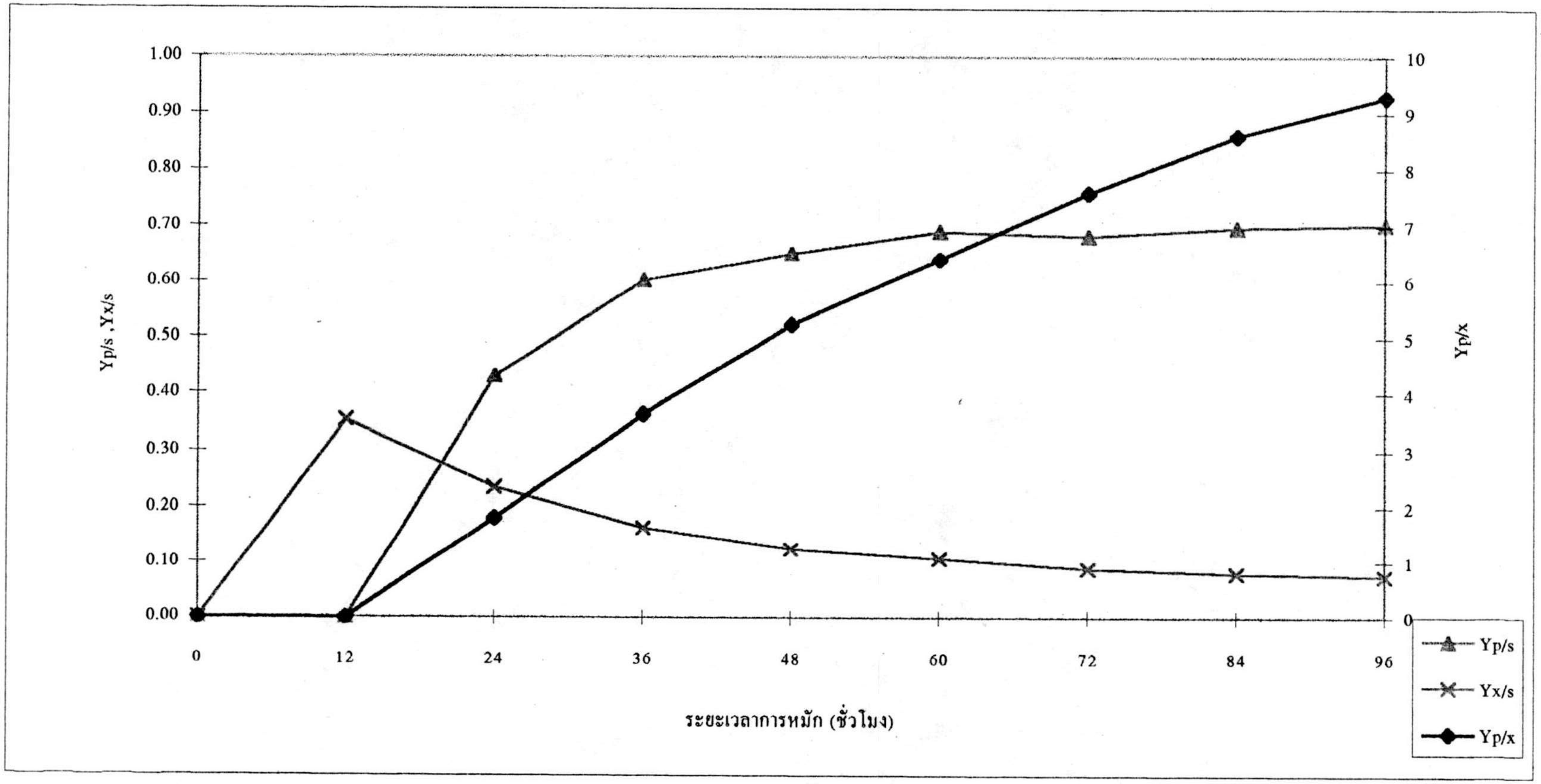
คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 443.51 กรัม

$Y_{p/s}$(ทั้งหมดในถังหมัก) ประมาณ 0.616

หมายเหตุ * เริ่มเติมน้ำตาลที่เวลา 20 ชั่วโมงของการหมัก



รูปที่ 31 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำตาลกลูโคส ในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ครั้งที่ 2)



<u>รูปที่ 32</u> ค่า Yp/s , Yx/s , Yp/xในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ครั้งที่ 2)

3.13.2 ผลการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ที่ 60 กรัมต่อลิตร

จากผลที่ได้ในข้อ 3.13.1 นั้น พบว่าการหมักครั้งที่ 1 ให้ผลดีกว่าการหมักครั้งที่ 2 กล่าวคือให้ปริมาณกรดมะนาวสูงกว่า และน้ำตาลกลูโคสในชั่วโมงที่ 96 เหลือน้อยกว่า เมื่อพิจารณาแล้วจะเห็นว่าในการหมักครั้งที่ 1 นั้นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตลอดระยะเวลาที่ควบคุม จะสูงกว่าในการหมักครั้งที่ 2 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลการควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ที่ประมาณ 60 กรัมต่อลิตร โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.13.1 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 26 และรูปที่ 33 , 34 พบว่า การเจริญและการผลิตกรดมะนาว ความหนืดของน้ำหมัก ตลอดจนการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ Candida oleophila NN-39 ไม่แตกต่างจากการหมักครั้งที่ 2 ของการทดลองที่ 3.13.1 ได้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุด 138.93 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 439.02 กรัม ดังนั้นจึงควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ที่ 50 กรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาต่อไป

3.14 ผลของปริมาณน้ำที่เติมเพิ่มลงไปในถังหมักต่อการผลิตกรดมะนาว

จากผลการทดลองข้อ 3.11 พบว่าการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีผลให้ความหนืดของน้ำหมักลดลงเล็กน้อย ซึ่งผลดังกล่าวนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำที่เติมเพิ่มลงไปพร้อมกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาผลดังกล่าวโดยเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.11) ตามวิธีในข้อ 2.3 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว แต่ให้มีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.0 ลิตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนตทั้งหมดตั้งแต่เริ่มต้น ใช้ภาวะการเติมและควบคุมความเข้มข้นของของน้ำตาลกลูโคสในถังหมักเช่นเดียวกับในการทดลองที่ 3.13.1 เติมน้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในถังหมักรวม 6 ครั้ง ๆ ละ 72 มิลลิลิตร ตามเวลาของการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตในการทดลองที่ 3.13.1 ครั้งที่ 1 (ซึ่งให้ผลการทดลองดีที่สุด) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 27 และรูปที่ 35 , 36 พบว่า เชื้อยังคงเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก แต่น้ำหมักจะเริ่มหนืดเร็วกว่าและหนืดมากกว่าการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกับการควบคุมน้ำตาล ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดที่ได้เพียง 125.55 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 390.46 กรัม ซึ่งน้อยกว่าผลการทดลองในข้อ 3.13 มาก แสดงว่าการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีผลช่วยลดความหนืดของน้ำหมัก และเพิ่มปริมาณกรดมะนาวได้จริง

ตารางที่ 26 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 60 กรัมต่อลิตร

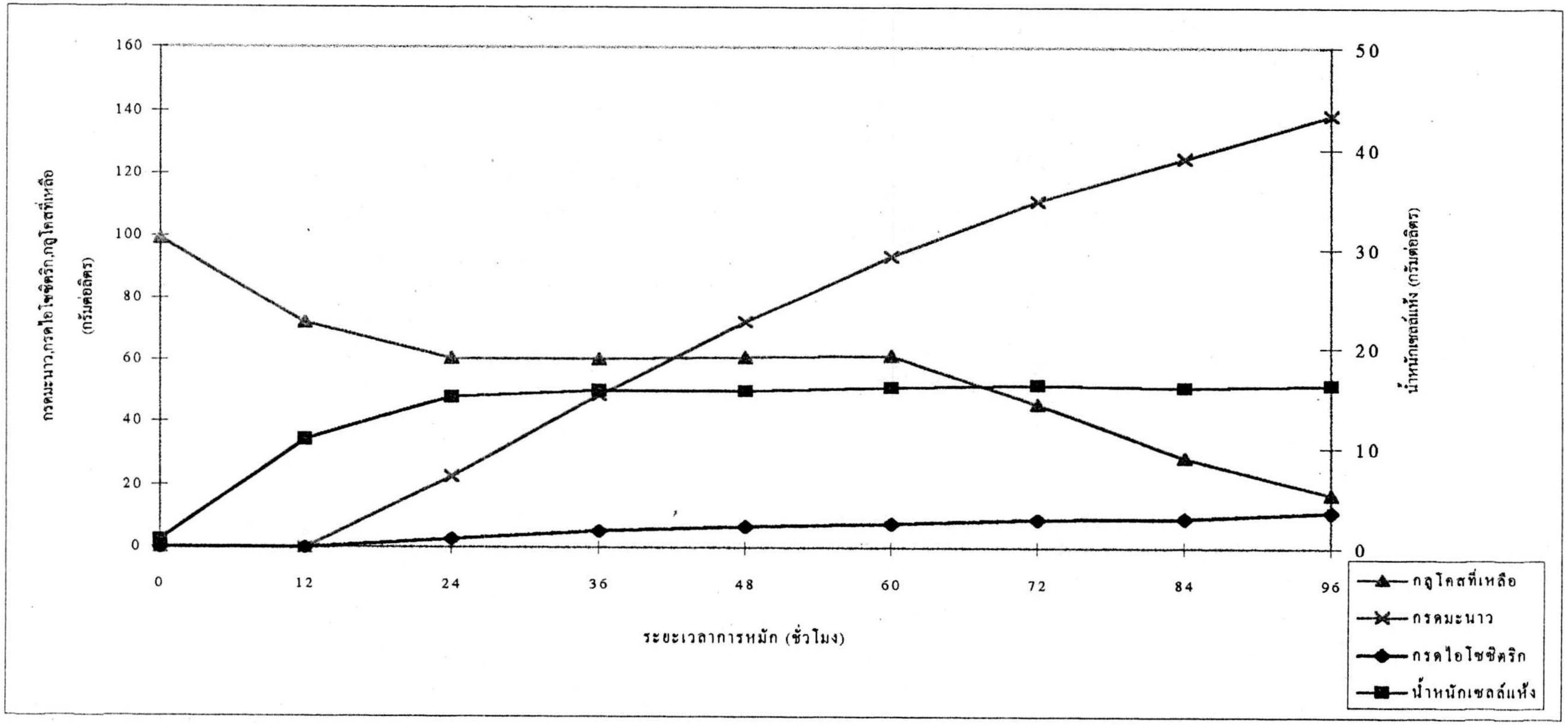
ระยะเวลาการหมัก(ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ* (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	0	6.20	0.84	99.38	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000	-
12	0	5.40	10.80	72.25	0.00	0.00	0.00	0.000	0.367	0.000
14 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.05 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.09										
24	0	5.17	15.00	60.66	23.00	3.02	7.62	0.362	0.223	1.624
26 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.00 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.16										
36	0	5.28	15.70	60.42	48.73	5.57	8.75	0.492	0.150	3.279
38 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.06 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.02										
48	0	5.23	15.65	61.16	72.64	7.01	10.36	0.571	0.116	4.905
50 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.00 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.00										
60	0	5.49	16.05	61.65	93.85	7.95	11.81	0.603	0.098	6.170
63 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.04 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.23										
72	2+	5.57	16.30	45.87	111.52	9.35	11.93	0.642	0.089	7.213
77 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.02 เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.20										
84	4+	5.99	16.04	29.22	125.31	9.75	12.85	0.657	0.080	8.244
96	4+	5.86	16.29	17.46	138.93	11.76	11.81	0.686	0.076	8.992

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,160 มิลลิลิตร

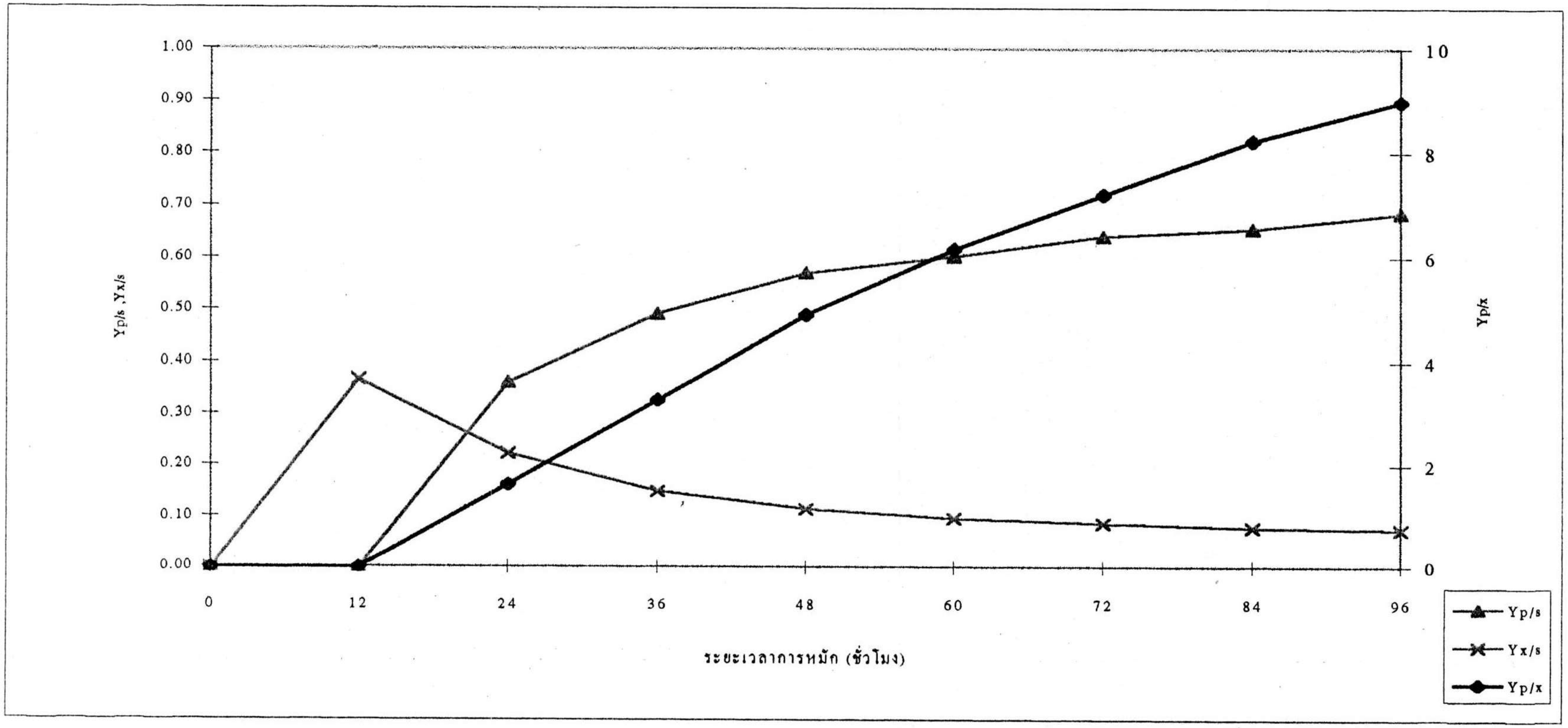
คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 439.02 กรัม

$Y_{p/s}$(ทั้งหมดในถังหมัก)ประมาณ 0.614

หมายเหตุ * เริ่มเติมน้ำตาลที่เวลา 16 ชั่วโมงของการหมัก



<u>รูปที่ 33</u> ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำตาลกลูโคส ในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 60 กรัมต่อลิตร



<u>รูปที่ 34</u> ค่า Yp/s , Yx/s , Yp/x ในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 60 กรัมต่อลิตร

<u>ตารางที่ 27</u> ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเติมแคลเซียมคาร์บอเนตทั้งหมดตั้งแต่ต้น เติมน้ำเป็นระยะๆ

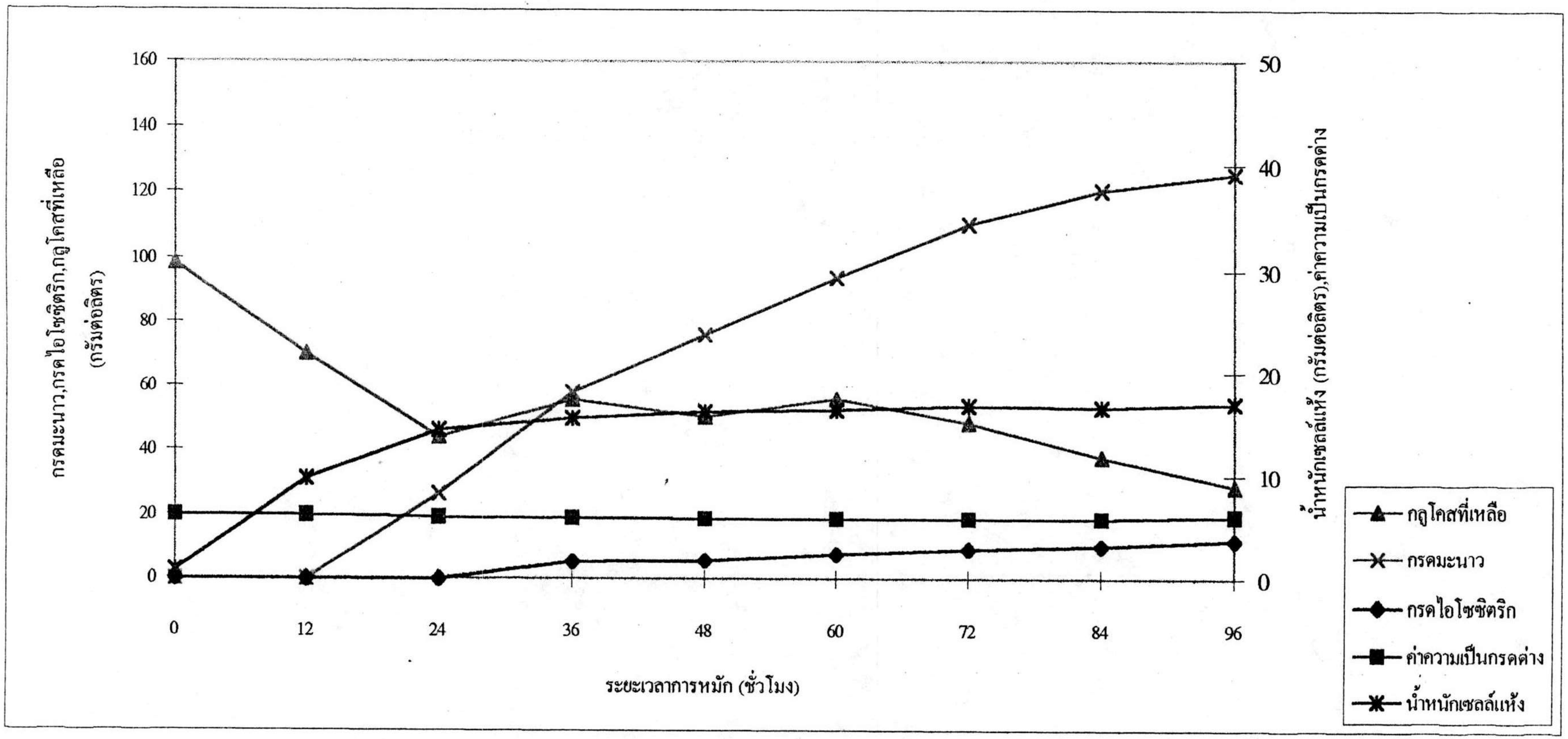
ระยะเวลาการหมัก(ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ* (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	0	6.26	0.83	98.69	0.00	0.00	-	0.000	0.000	-
12	0	6.24	9.75	70.13	0.00	0.00	-	0.000	0.312	0.000
24	0	6.04	14.45	44.15	26.61	-	-	0.423	0.216	1.954
36	0	6.00	15.61	55.80	58.18	5.44	9.78	0.574	0.160	3.598
48	1+	5.93	16.27	50.51	76.15	5.62	11.73	0.608	0.123	4.932
60	3+	5.92	16.39	56.14	94.18	7.68	12.26	0.642	0.106	6.053
72	3+	5.94	16.86	48.52	110.67	9.37	11.79	0.639	0.093	6.852
84	4+	5.94	16.63	37.91	120.65	10.26	11.76	0.663	0.087	7.636
96	5+	6.12	17.04	28.82	125.55	12.22	10.27	0.657	0.085	7.745

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,110 มิลลิลิตร

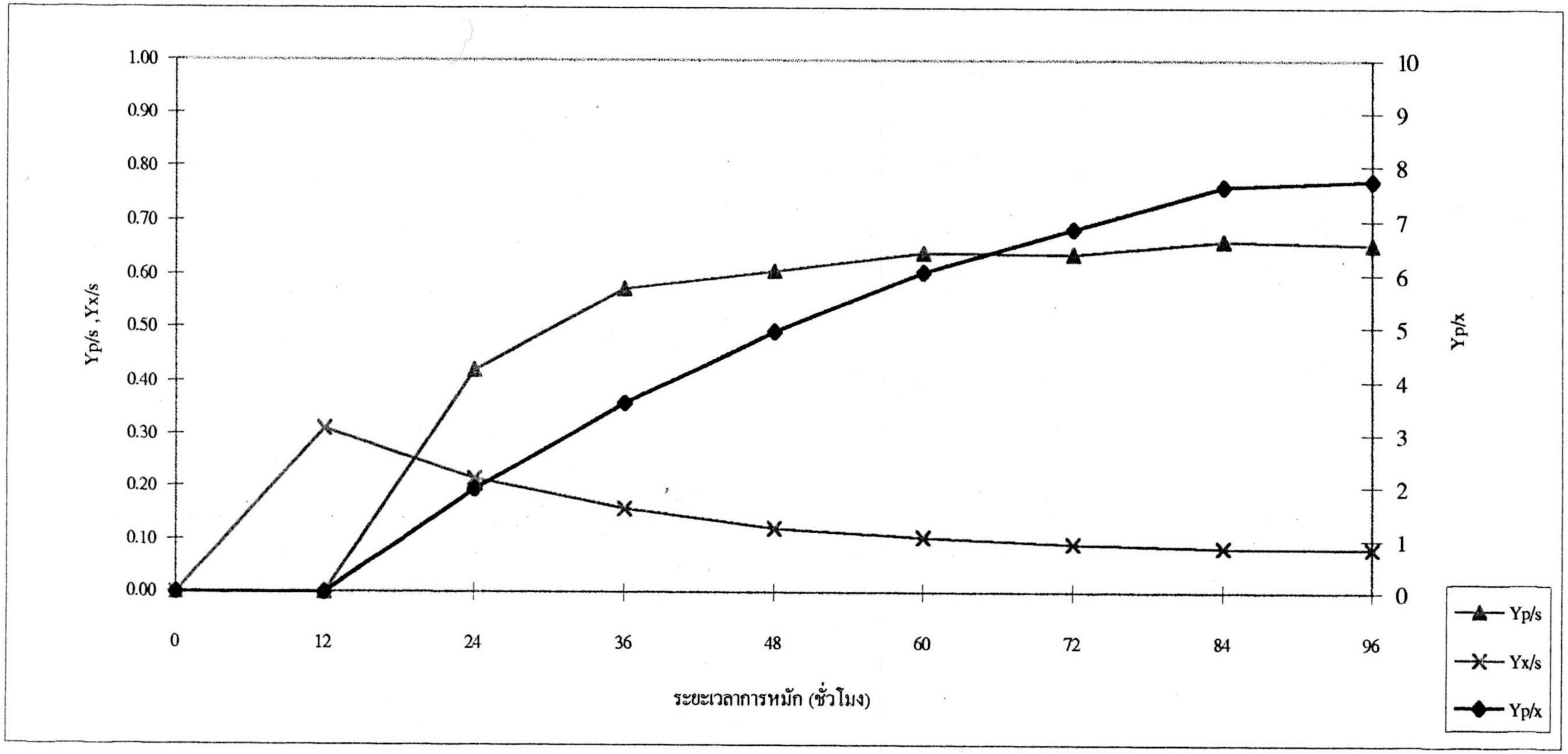
คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 390.46 กรัม

$Y_{p/s}$(ทั้งหมดในถังหมัก) ประมาณ 0.574

<u>หมายเหตุ</u> เริ่มเติมน้ำตาลที่เวลา 21 ชั่วโมงของการหมัก



รูปที่ 35 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำตาลกลูโคส ในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเติมแคลเซียมคาร์บอเนตทั้งหมดตั้งแต่ต้น เติมน้ำเป็นระยะ ๆ ควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร



<u>รูปที่ 36</u> ค่า Yp/s , Yx/s , Yp/x ในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเติมแคลเซียมคาร์บอเนตทั้งหมดตั้งแต่ต้น เติมน้ำเป็นระยะๆควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร

3.15 ผลการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักด้วยแคลเซียมออกไซด์

การทดลองผลิตกรดมะนาวในภาวะต่างๆที่ผ่านมา ได้ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ซึ่งมักพบปัญหาความหนืดของน้ำหมักอยู่เสมอในการทดลองระดับถังหมัก ถึงแม้ว่าการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในถังหมักร่วมกับการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะช่วยลดปัญหาความหนืดลงได้ (ดังผลการทดลองที่ 3.13) ก็ตาม แต่การแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นค่อนข้างยุ่งยากและเสียเวลา ซึ่งอาจไม่เหมาะสมในการผลิตระดับถังหมักขนาดใหญ่ๆ การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ในระดับถังหมักนั้น นอกจากแคลเซียมคาร์บอเนตแล้ว ยังมีรายงานการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างด้วยด่างแก่ เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น ประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ได้รายงานการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในการผลิตกรดมะนาวโดย Candida oleophila C-73 พบว่าการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ให้ผลค่อนข้างดี ในการทดลองนี้จะใช้แคลเซียมออกไซด์เกรดทางการค้าเป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง เนื่องจากแคลเซียมออกไซด์มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าแคลเซียมคาร์บอเนต จึงน่าจะช่วยลดความหนืดของน้ำหมักลงได้

เลี้ยงเชื้อCandida oleophila NN-39ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก2.12) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว แต่ใช้ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.0 ลิตร ใช้ภาวะการเติมและควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเช่นเดียวกับในการทดลองที่ 3.13.1 และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.50 ตลอดการทดลองด้วยแคลเซียมออกไซด์ (การเลือกควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.50 เนื่องจากเหตุผล 2 ประการ คือ ประการแรก ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์อยู่ในช่วงประมาณ 4.50-6.50 ประการที่สอง ในการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างด้วยการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตนั้น พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักจะเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 5.00-6.00 เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้น จึงเลือกค่า 5.50 ซึ่งเป็นค่ากลางๆ) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ได้ข้อมูลดังตารางที่ 28 (ครั้งที่ 1) และ 29 (ครั้งที่ 2) และรูปที่ 37 , 38 (ครั้งที่ 1) และ 39 , 40 (ครั้งที่ 2) พบว่าการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างด้วยแคลเซียมออกไซด์สามารถลดความหนืดของน้ำหมักลงอย่างเห็นได้ชัด น้ำหมักเริ่มหนืดหลังจากชั่วโมงที่ 72 ได้ปริมาณกรดมะนาว 129.99 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 464.06 กรัม สำหรับการหมักครั้งที่ 1 และปริมาณกรดมะนาว 128.04 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 454.54 กรัม สำหรับการหมักครั้งที่ 2

ตารางที่ 28 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.50 ด้วยแคลเซียมออกไซด์ (ครั้งที่ 1)

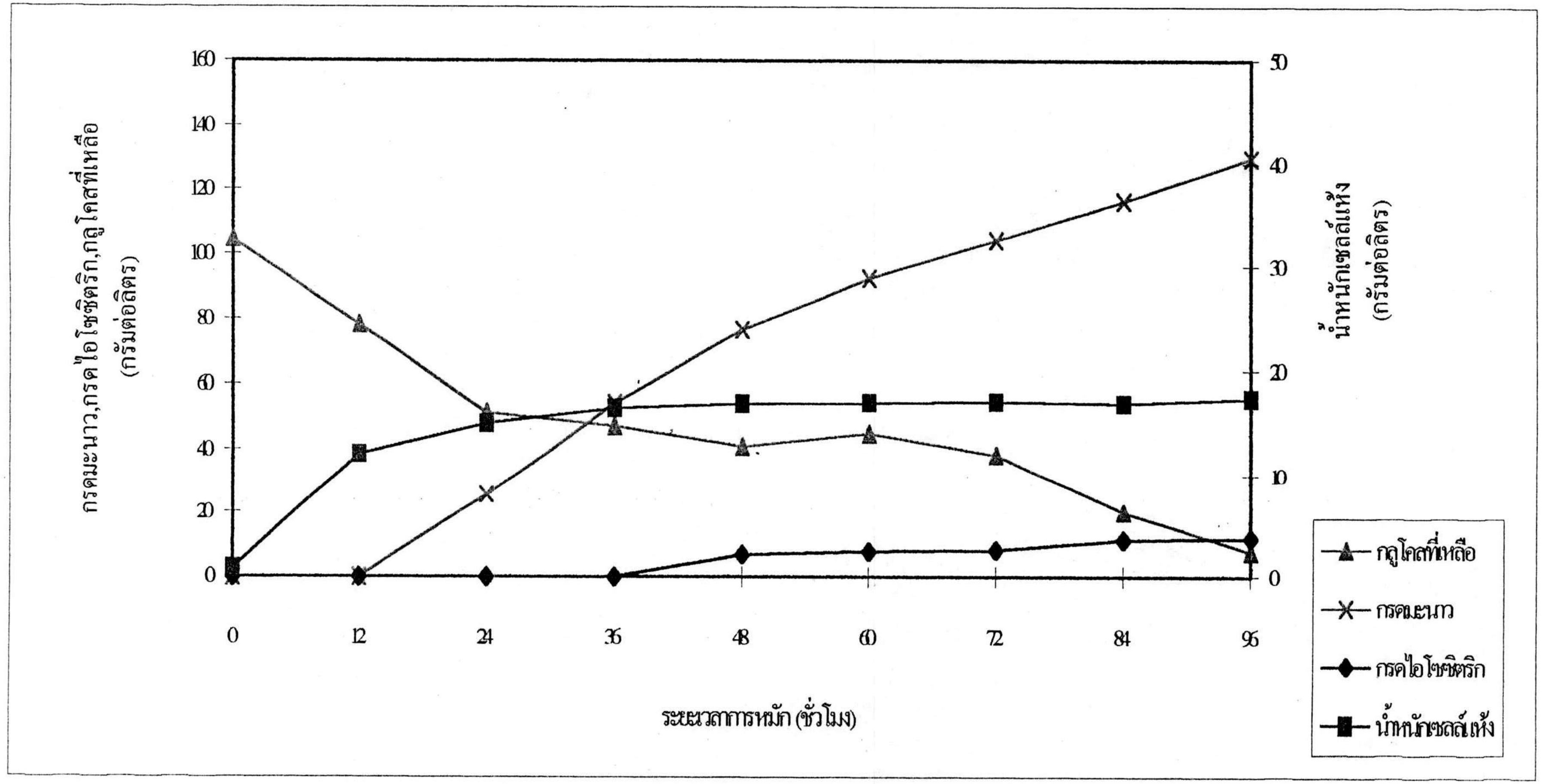
ระยะเวลาการหมัก(ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ* (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	0	0.86	104.68	0.00	0.00	-	0.000	0.000	-
12	0	12.15	78.24	0.00	0.00	-	0.000	0.452	0.000
24	0	15.05	51.40	25.87	-	-	0.424	0.233	1.823
36	0	16.50	47.38	54.35	-	-	0.602	0.173	3.475
48	0	16.90	41.44	76.69	6.99	10.97	0.633	0.132	4.781
60	0	17.05	45.29	92.53	7.93	11.67	0.663	0.116	5.715
72	0	17.15	38.88	104.27	8.43	12.37	0.604	0.094	6.401
84	2+	17.02	20.16	116.60	11.38	10.25	0.583	0.081	7.215
96	3+	17.45	7.69	129.99	12.01	10.82	0.612	0.078	7.835

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,570 มิลลิลิตร

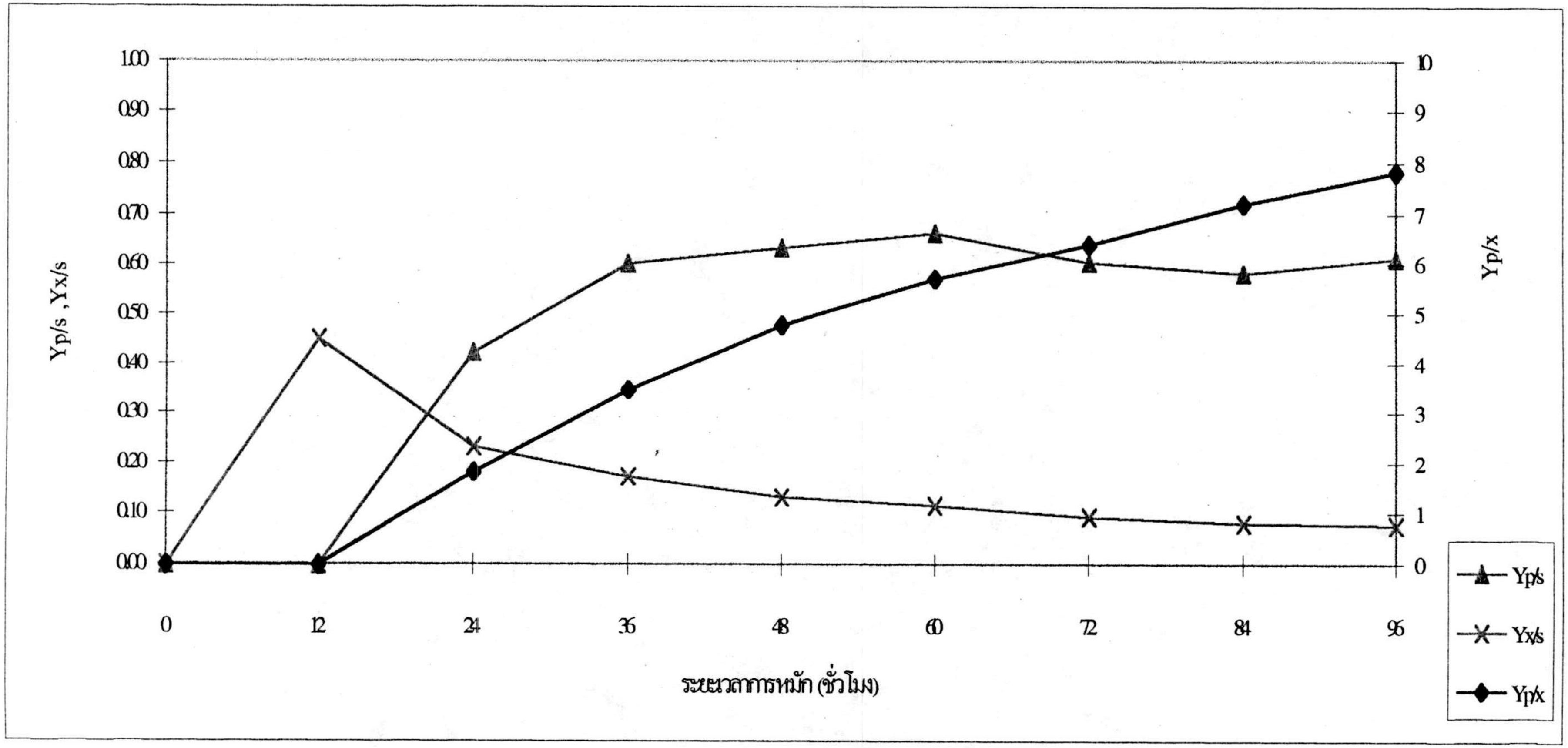
คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 464.06 กรัม

$Y_{p/s}$(ทั้งหมดในถังหมัก) ประมาณ 0.628

หมายเหตุ * เริ่มเติมน้ำตาลที่เวลา 22 ชั่วโมงของการหมัก



<u>รูปที่ 37</u> ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.50 ด้วยแคลเซียมออกไซด์ (ครั้งที่ 1)



<u>รูปที่ 38</u> ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.50 ด้วยแคลเซียมออกไซด์ (ครั้งที่ 1)

ตารางที่ 29 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.50 ด้วยแคลเซียมออกไซด์ (ครั้งที่ 2)

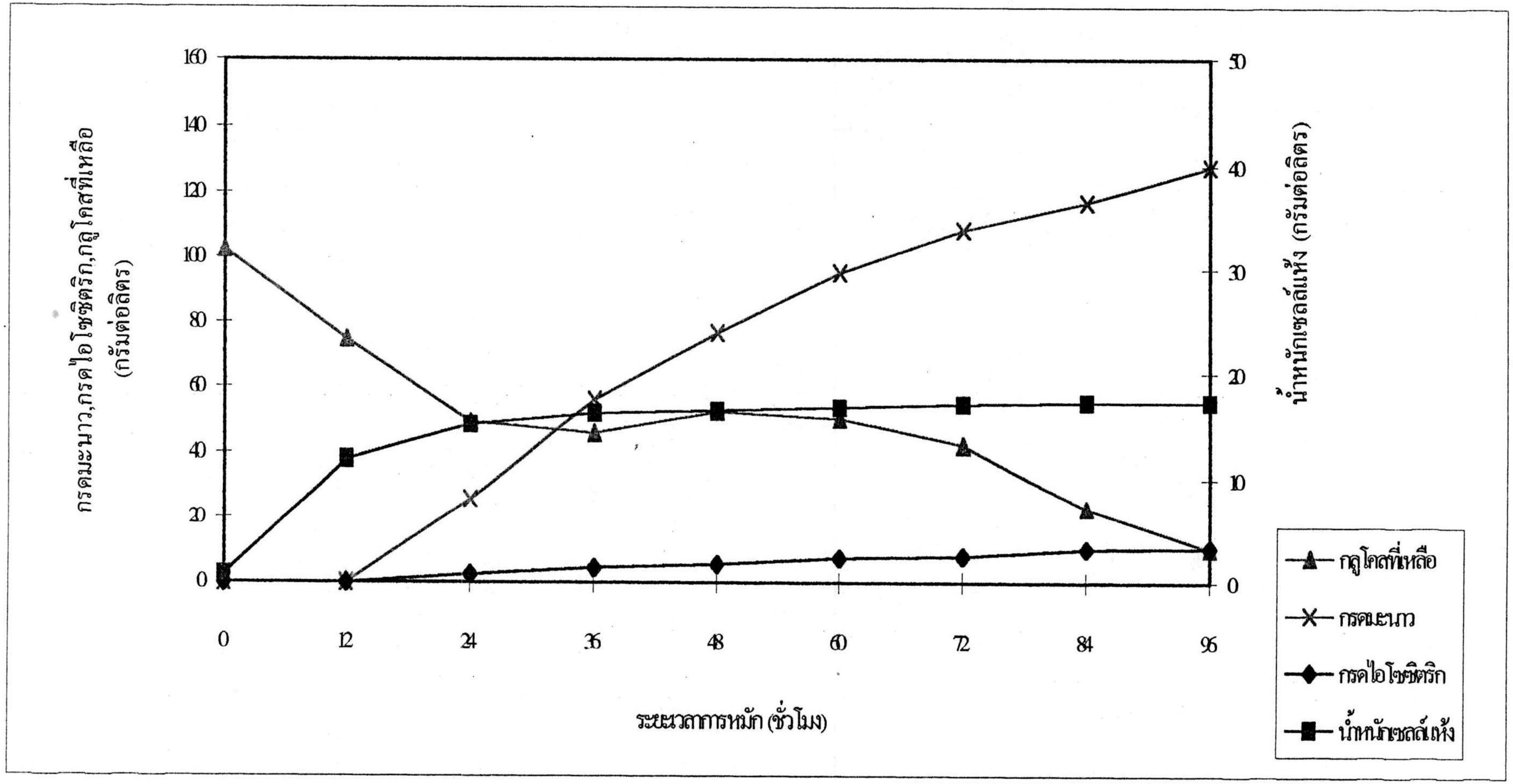
ระยะเวลาการหมัก(ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ* (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	Yp/s	Yx/s	Yp/x
0	0	0.83	102.35	0.00	0.00	-	0.000	0.000	-
12	0	11.87	75.07	0.00	0.00	-	0.000	0.405	0.000
24	0	15.13	49.32	25.96	2.39	10.86	0.406	0.223	1.815
36	0	16.21	45.76	56.23	4.57	12.30	0.592	0.162	3.656
48	0	16.48	52.38	76.87	5.77	13.32	0.610	0.124	4.912
60	0	16.79	50.24	95.22	7.52	12.66	0.635	0.106	5.966
72	1+	17.08	42.39	108.45	8.17	13.27	0.611	0.091	6.674
84	3+	17.26	23.07	117.24	10.49	11.18	0.595	0.083	7.136
96	4+	17.30	10.32	128.04	10.81	11.84	0.611	0.079	7.774

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,550 มิลลิลิตร

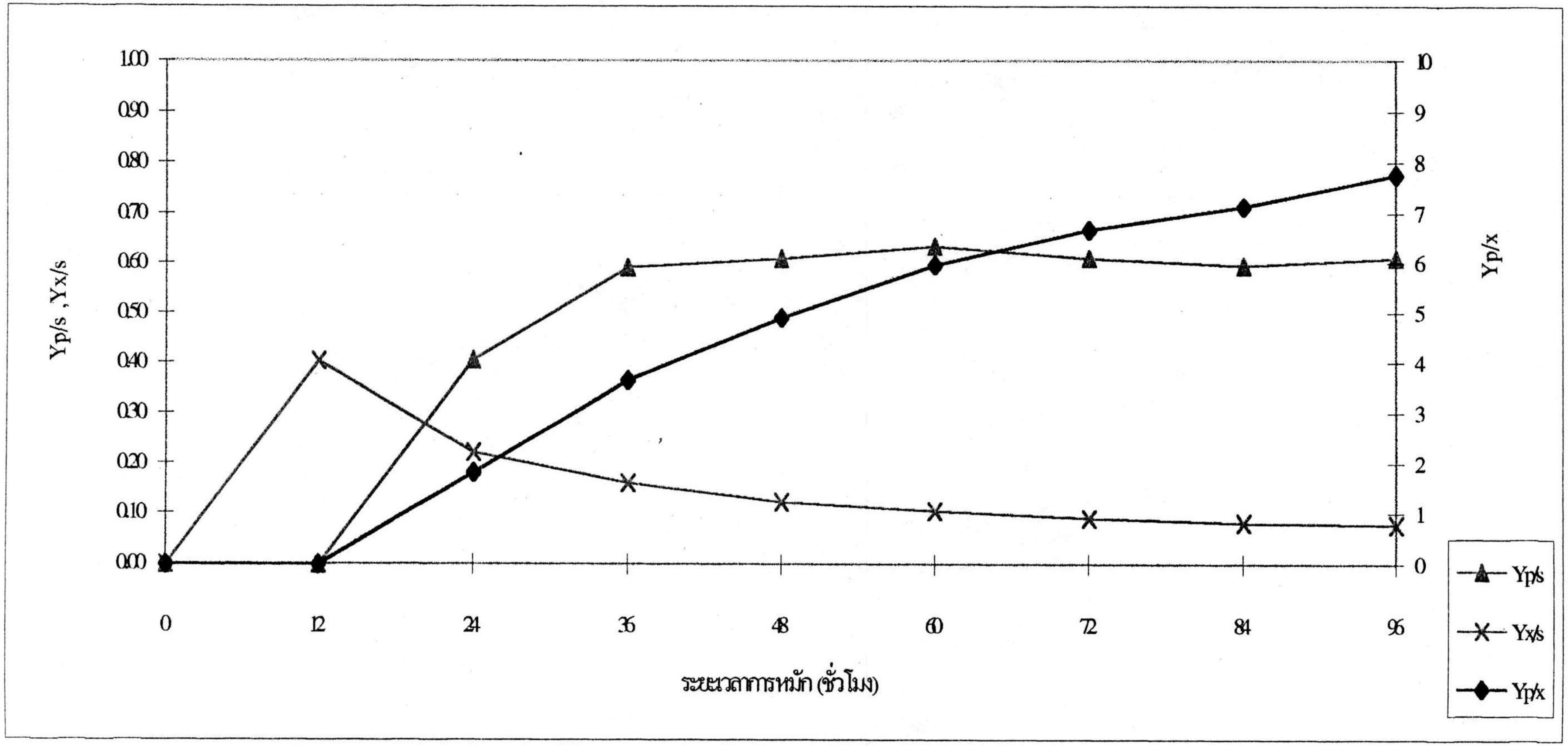
คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 454.54 กรัม

$Y_{p/s}$(ทั้งหมดในถังหมัก) ประมาณ 0.620

หมายเหตุ * เริ่มเติมน้ำตาลที่เวลา 21 ชั่วโมงของการหมัก



<u>รูปที่ 39</u> ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.50 ด้วยแคลเซียมออกไซด์ (ครั้งที่ 2)



<u>รูปที่ 40</u> ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ <u>Candida</u> <u>oleophila</u> NN-39 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.50 ด้วยแคลเซียมออกไซด์ (ครั้งที่ 2)