บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในภาวะของ ประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537)

ประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ได้รายงานภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมใน 1 ลิตรประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีน้ำตาลกลูโคส 220 กรัม แอมโมเนียมคลอไรด์ 2.0 กรัม โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม แมกนีเซียม เฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัม แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.2 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัม แคลเซียมคาร์บอเนต 120 กรัม ทำการหมักในภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที พบว่าที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง เชื้อผลิตกรดมะนาวได้ 149.09 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 378.63 กรัม ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 19.49 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการทดลองเบื้องต้นนี้จะทดลองผลิตกรดมะนาวภายใต้ภาวะเดียวกันกับ ประเสริฐ หาญเมืองใจ เพื่อใช้เป็นภาวะอ้างอิงให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นและเปรียบเทียบกับผลการผลิตในระดับขยายส่วน ดังนั้นจึงเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ YM ที่อายุ 15 ชั่วโมง และนำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวโดยใช้ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทำการหมักในภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที แต่ปรับปรุงเล็กน้อยคือใช้สารสกัดจากยีสต์ที่ผลิตโดยสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ (IBGE) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และแคลเซียมคาร์บอเนตที่เป็นเกรดทางการค้า (comercial grade)ขณะที่ อาหารเลี้ยงเชื้อของประเสริฐ หาญเมืองใจ ใช้อาหารที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางห้องปฏิบัติการ (lab grade) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง วัดค่า

ความเป็นกรด-ด่าง วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง กรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก

จากผลการทดลองตามตารางที่ 3-1รูปที่ 3-1, 3-2, 3-3 พบว่า ในระหว่างชั่วโมงที่ 0 ถึง 96 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 19.14 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของประเสริฐ (2537) และน้ำหมักเริ่มมีความหนืดขึ้นเรื่อย ๆ โดยเริ่มหนืดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 และจากนั้นจะหนืดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในระหว่างการหมักเชื้อจะเริ่มผลิตกรดมะนาวหลังจาก 12 ชั่วโมง และปริมาณกรดมะนาวจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนได้ประมาณ 117.54 กรัมต่อลิตร คิดปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดในน้ำหมักที่เหลือประมาณ 323 กรัม การเพิ่มขึ้นของกรดมะนาวนี้สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลง พบว่าที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักนั้นเหลือน้ำตาลกลูโคส 18.38 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.57 สำหรับอัตราส่วนระหว่างกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริกนั้นจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อระยะการหมักนานขึ้น จากรูปที่ 3-3 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 84 ของการหมัก ($Y_{p/s}$) ซึ่งเป็นเวลาเดียวกันกับที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดเช่นกัน ($Y_{p/x}$) สำหรับเวลาที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ได้สูงสุดคือที่ 12 ชั่วโมงของการหมัก ($Y_{x/s}$)

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้ต่ำกว่าการทดลองของประเสริฐ (2537) อย่างเห็นได้ชัด อาจเป็นเนื่องมาจากน้ำหมักมีความหนืดมากจึงเป็นอุปสรรคต่อการกวนและการถ่ายเทออกซิเจนในระดับถังหมักนั้นเอง นอกจากปัญหาของความหนืดจะส่งผลให้การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ลดลงแล้ว พบว่ายังเป็นปัญหาต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตในขั้นตอนก่อนการนำผลผลิตจากถังหมักไปทำการตกผลึกกรดมะนาวให้บริสุทธิ์อีกด้วย ดังนั้นภาวะของการผลิตกรดมะนาวนี้จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการขยายส่วนต่อไป

3.2 ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาว ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรเมื่อมีการควบคุมค่าความเป็นกรด -ด่างโดยการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

จากผลการทดลองที่ 3.1 พบว่าน้ำหมักมีความหนืดมาก และได้กรดมะนาวในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งสาเหตุหนึ่งของปัญหาความหนืดอาจเกิดมาจากแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใส่ไปทั้งหมดตั้งแต่ต้นในการผลิตกรดมะนาว ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้แบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตโดยเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3-1 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s Yx/s Yp/x และ Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

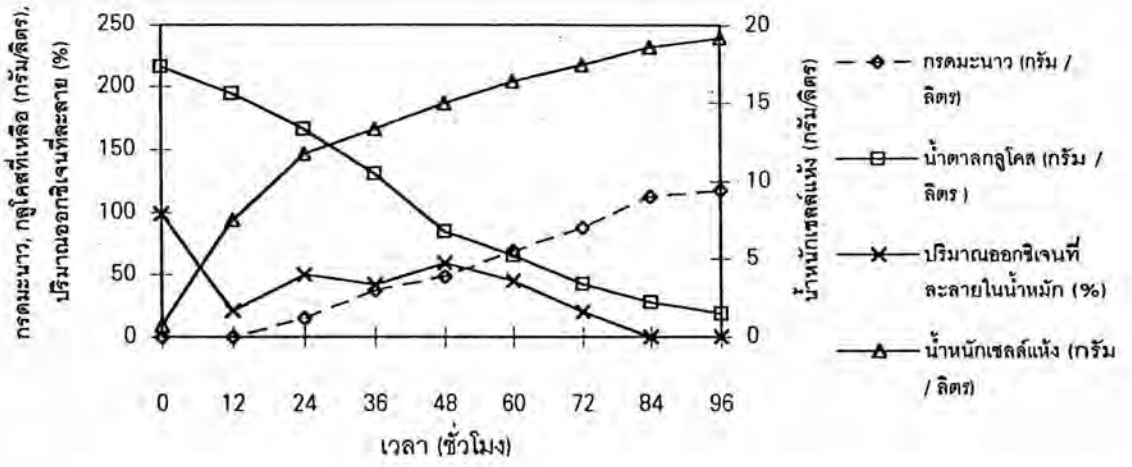
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัม/ลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย(%)	Yp/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	6.07	0.73	0.00	0.00	216.00	0.00	99	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.88	7.50	0.00	0.00	194.40	0.00	21	0.000	0.313	0.000	0.000	0.307	0.000
24	5.64	11.75	14.81	-	166.38	-	50	0.298	0.222	1.343	0.000	0.152	0.000
36	5.59	13.30	37.12	-	130.98	-	42	0.436	0.147	2.953	0.630	0.044	14.394
48	5.55	14.95	48.30	6.37	84.60	7.58	59	0.367	0.105	3.484	0.241	0.035	6.776
60	5.54	16.32	68.72	7.65	65.14	8.98	45	0.455	0.103	4.407	1.049	0.070	14.905
72	5.50	17.41	87.63	8.54	42.43	10.26	20	0.504	0.096	5.253	0.833	0.048	17.349
84	5.55	18.53	112.56	9.39	27.67	11.98	0	0.597	0.094	6.323	1.689	0.076	22.259
96	5.57	19.14	117.54	8.40	18.38	13.99	0	0.594	0.093	6.384	0.536	0.065	8.164

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 2,750 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 323.23 กรัม

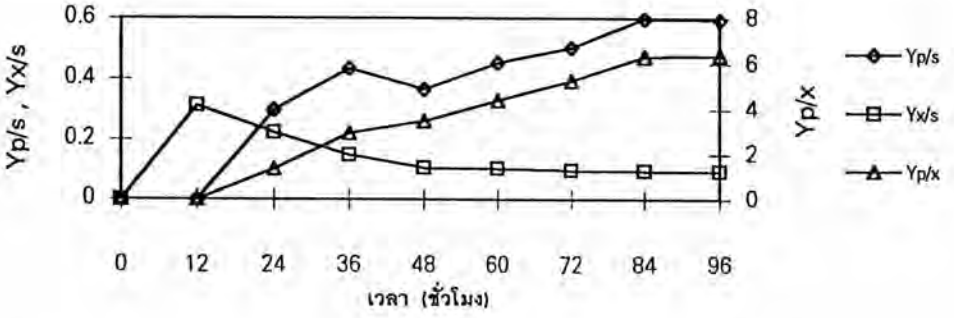
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณผลได้จากการวิเคราะห์ โดย HPLC

Yp/s Yx/s Yp/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

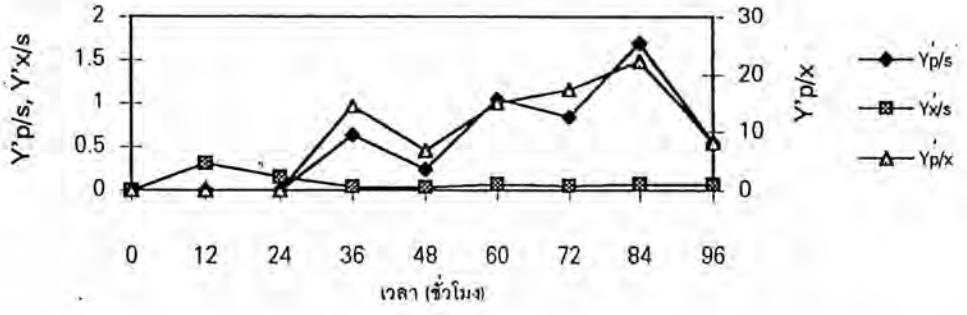
Y'p/s Y'x/s Y'p/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. ที่เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-1 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในภาวะเดียวกันกับประเสริฐ หาญเมืองใจ



รูปที่ 3-2 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในภาวะการหมักของประเสริฐ หาญเมืองใจ



รูปที่ 3-3 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในภาวะการหมักของประเสริฐ หาญเมืองใจ

Candida oleophila C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.4) ตามวิธีในข้อ 2.3.2.5 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้ไม่ต่ำกว่า 5.00 โดยแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็น 7 ครั้ง ครั้งแรก 45 กรัม ครั้งที่ 2-6 ครั้งละ 60 กรัม และครั้งสุดท้าย 75 กรัม เก็บตัวอย่าง ทุก 12 ชั่วโมง ได้ผลแสดงในตารางที่ 3-2รูปที่ 3-4,3-5,3-6จากการทดลองพบว่าการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีผลให้น้ำหมักมีความหนืดลดลงเล็กน้อย และเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีกว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตทั้งหมดตั้งแต่ต้น โดยปริมาณกรดมะนาวสูงสุดคือ 123.41 กรัมต่อลิตร ที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมง คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 378.86 กรัม ส่วนการเจริญของเชื้อจะดีกว่าเล็กน้อย โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 20.73 กรัมต่อลิตร จากรูปที่ 3-6 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 84 ของการหมัก (Y'p/s) และเวลาที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก(Y'p/x)สำหรับเวลาที่น้ำตาลกลูโคสสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก (Y'x/s)

แม้ว่าการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะทำให้น้ำหมักหนืดน้อยกว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตทั้งหมดตั้งแต่ต้น แต่ระดับความหนืดก็ยังอยู่ในขั้นเป็นอุปสรรคต่อการหมัก และการเก็บเกี่ยวผลผลิต ดังนั้นภาวะของการผลิตกรดมะนาวนี้จึงไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนต่อไป

3.3 ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวเมื่อมีการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการทดลองในระดับถังหมักที่ผ่านมา พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่เชื้อสร้างขึ้นนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก ๆ แต่หลังจากที่น้ำหมักมีความหนืดขึ้นมาก ๆ ความสามารถในการสร้างกรดมะนาวของเชื้อจะลดลงซึ่งสาเหตุหนึ่งของปัญหาความหนืดที่พบเกิดจากแคลเซียมคาร์บอเนต (ตามผลการทดลองที่ 3.2) และอีกสาเหตุหนึ่งอาจเกิดเนื่องจากเชื้อสร้างสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์ได้ (Phaff,Miller and Mrak,1978) ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมการสร้างสารโพลีแซคคาไรด์คือการที่อาหารมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง ๆ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก2.5) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.5 ของการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดมะนาว แต่ให้มีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.0 ลิตร ให้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในถังหมัก 100 กรัมต่อลิตร และควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาล

ตารางที่ 3-2 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s Yx/s Yp/x และ Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และมีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

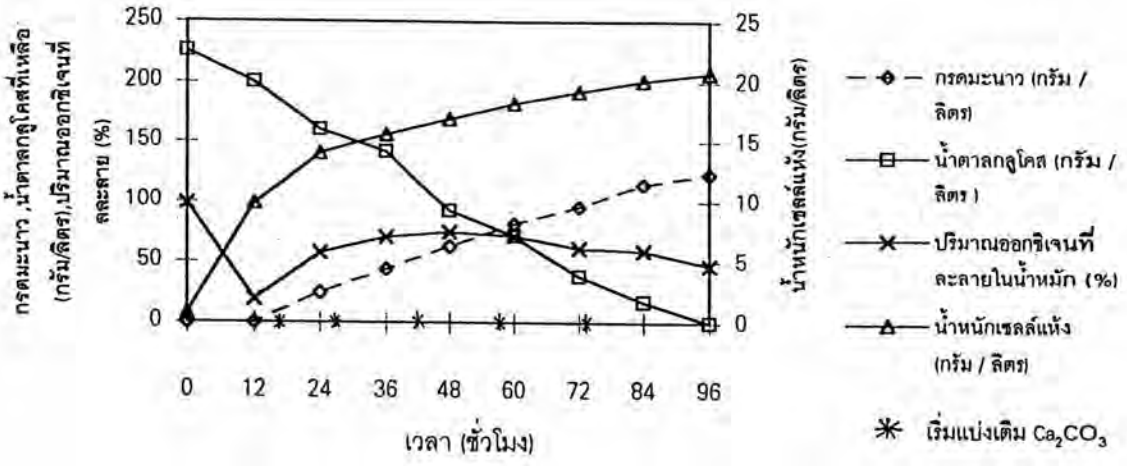
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัม/ลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย(%)	Yp/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	5.56	0.75	0.00	0.00	225.70	0.00	98	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.61	9.80	0.00	0.00	200.36	0.00	19	0.000	0.357	0.000	0.000	0.357	0.000
24	5.52	14.05	24.39	-	160.30	-	57	0.373	0.203	1.834	0.000	0.106	0.000
36	5.74	15.60	43.39	2.85	141.60	15.22	70	0.516	0.177	2.922	1.016	0.083	12.528
48	5.72	16.90	62.75	4.89	92.04	12.82	74	0.469	0.121	3.885	0.391	0.026	14.892
60	5.95	18.25	80.84	5.94	70.80	13.61	71	0.522	0.113	4.619	0.852	0.064	13.400
72	5.27	19.22	94.89	6.74	37.72	14.07	61	0.505	0.098	5.138	0.425	0.029	14.485
84	5.70	20.11	114.44	7.94	16.78	14.41	59	0.538	0.093	5.911	0.934	0.043	21.966
96	6.29	20.73	123.41	9.78	0.00	12.62	47	0.547	0.089	6.177	0.535	0.037	14.468

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,070 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 378.86 กรัม

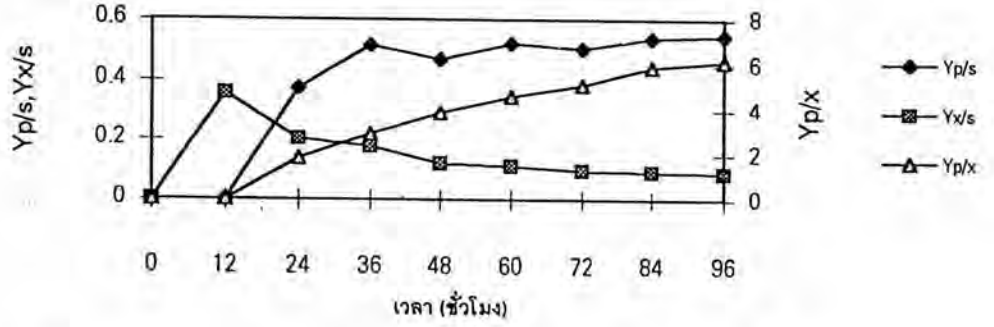
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณผลได้จากการวิเคราะห์ โดย HPLC

Yp/x Yx/s Yp/s คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

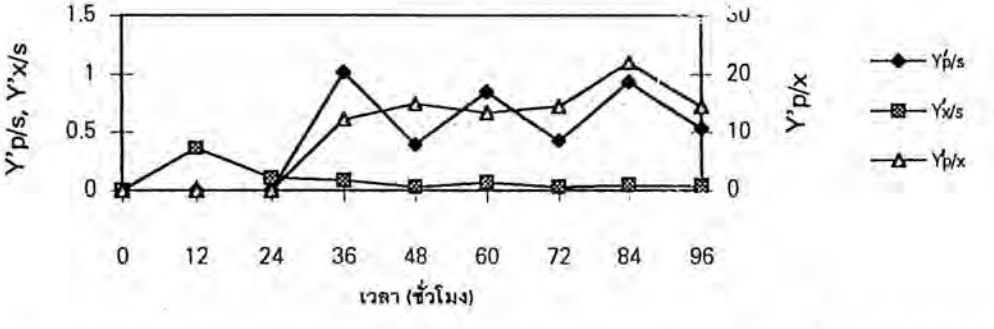
Y'p/x Y'x/sY'p/s คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ.ที่เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-4 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่าง โดยการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต



รูปที่ 3-5 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างโดยการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต



รูปที่ 3-6 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างโดยการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

กลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร ด้วยการเติมอย่างต่อเนื่องโดยใช้เพอริสตอลติคปั๊มจนกระทั่งมีน้ำตาลกลูโคสทั้งหมดที่เติมลงไปประมาณ 220 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตตามภาวะที่ได้ในการทดลองที่ 3.2 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 3-3 รูปที่ 3-7,3-8,3-9 พบว่าน้ำหมักมีความหนืดน้อยมาก โดยจะเริ่มหนืดเล็กน้อยที่ประมาณชั่วโมงที่ 96 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก ได้กรดมะนาวถึง 132.26 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังประมาณ 400 กรัม แต่น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ได้จะน้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อโดยเติมองค์ประกอบของอาหารทั้งหมดตั้งแต่ต้นตามผลการทดลองใน ข้อที่ 3.1 โดยได้ 18.21 กรัมต่อลิตร จากรูปที่ 3-9 พบว่าความสามารถที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 84 ของการหมัก ($Y_{p/s}'$) ซึ่งเป็นเวลาเดียวกันกับที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดเช่นกัน ($Y_{p/x}'$) สำหรับเวลาที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ได้สูงสุดคือที่ชั่วโมงที่ 12 ($Y_{x/s}'$)

3.4 ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวเมื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักด้วยแคลเซียมออกไซด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการทดลองผลิตกรดมะนาวในภาวะต่างๆ ได้ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างซึ่งมักพบปัญหาของความหนืดในน้ำหมักอยู่เสมอ ถึงแม้ว่าการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกับการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกูลโคสในถังหมักจะช่วยลดปัญหาความหนืดลงได้ (ดังในการทดลองที่ 3.3) ก็ตาม แต่การแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต และการทำให้น้ำตาลเข้มข้นก่อนนั้นค่อนข้างยุ่งยาก และ เสียเวลา ซึ่งจะไม่เหมาะสมในการผลิตในระดับถังหมักขนาดใหญ่ๆการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ในระดับถังหมัก นอกจากแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วยังมีรายงานการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยด่างแก่เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมออกไซด์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น ประเสริฐ(2537) ได้รายงานการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ แคลเซียมออกไซด์ ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 พบว่าการใช้แคลเซียมออกไซด์ให้ผลผลิตค่อนข้างดี อีกทั้งเชาวรีย์ เรืองวิไลทรัพย์ (2539) รายงานการใช้แคลเซียมออกไซด์ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ให้ผลผลิตดีเช่นเดียวกัน

ดังนั้นในการทดลองนี้จะใช้แคลเซียมออกไซม์เกรดทางการค้าเป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเนื่องจากแคลเซียมออกไซด์มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าแคลเซียมคาร์บอเนตจึงน่าจะช่วยลดความหนืดของน้ำหมักลงได้ ดังนั้นจึงเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหาร

ตารางที่ 3-3 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s Yx/s Yp/x และ Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แม้อมีการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในถังหมัก

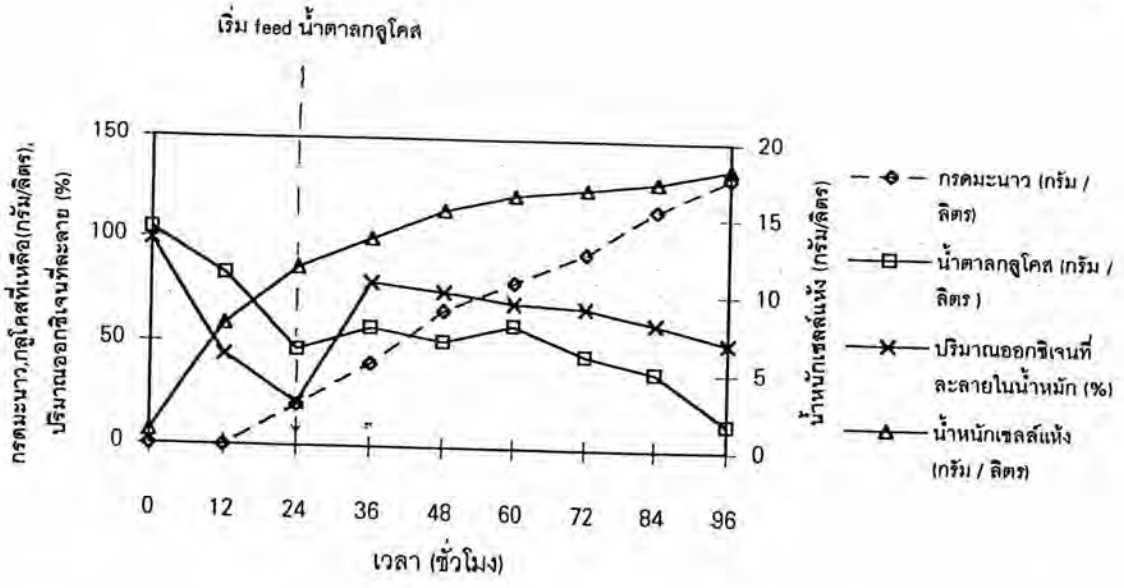
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัม/ลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)	Yp/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	6.16	0.87	0.00	0.00	104.40	0.00	99	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.72	7.85	0.00	-	82.88	-	44	0.000	0.605	0.000	0.000	0.324	0.000
24	6.54	11.45	20.03	2.93	46.80	6.85	21	0.508	0.268	1.868	0.000	0.083	0.000
36	5.74	13.37	40.02	3.22	57.60	12.43	79	0.573	0.179	3.166	0.657	0.063	10.411
48	6.10	15.25	66.27	6.75	51.20	9.82	75	0.657	0.143	4.564	0.846	0.064	13.963
60	5.46	16.30	80.04	8.42	59.40	9.51	70	0.615	0.118	5.140	0.471	0.036	13.114
72	5.83	16.76	94.36	12.31	45.00	7.66	68	0.576	0.097	5.896	0.425	0.014	31.130
84	5.35	17.28	115.85	15.08	37.41	7.68	61	0.634	0.089	7.000	1.167	0.028	41.326
96	5.90	18.21	132.26	18.30	12.78	7.23	52	0.638	0.083	7.566	0.655	0.037	17.645

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 2,975มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 400 กรัม

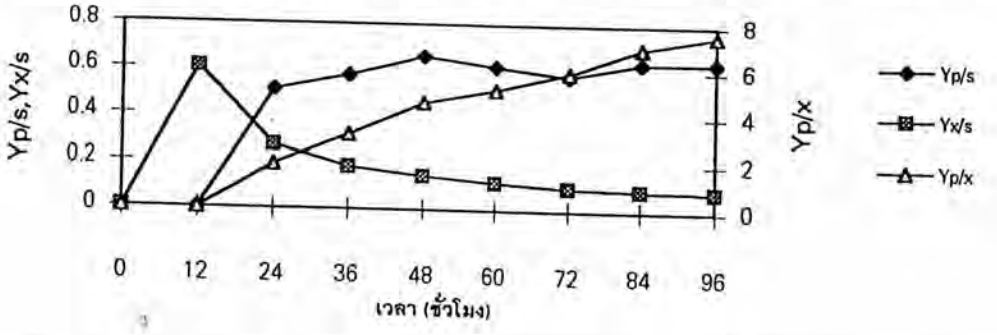
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณผลได้จากการวิเคราะห์ โดย HPLC

Yp/s Yx/s Yp/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

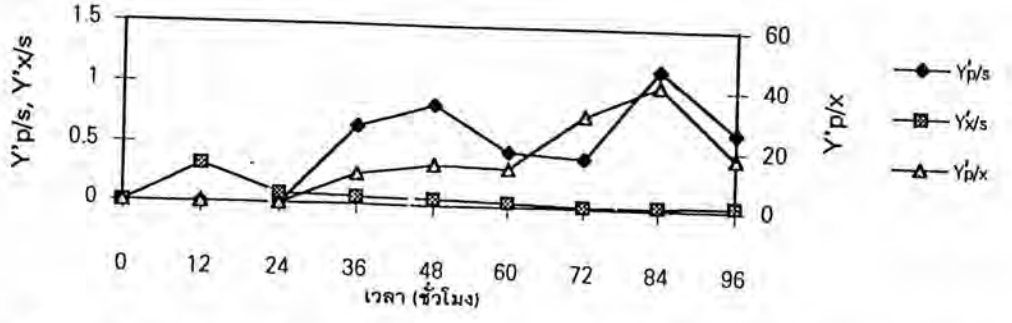
Y'p/s Y'x/s Y'p/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. ที่เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-7 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 3-8 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมความเข้มข้มของกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 3-9 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมความเข้มข้มของกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร.

สำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.6) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.5 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว ทำการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.00 ตลอดการทดลองด้วยแคลเซียมออกไซด์ (การเลือกควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.00 เนื่องมาจากค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์อยู่ในช่วงประมาณ 4.5-6.5)แต่เนื่องจากการควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างโดยระบบอัตโนมัติในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นไปได้ยากกว่าการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในระดับถังหมักที่มีขนาดใหญ่จึงทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้นั้นมีค่ามากกว่าที่ควบคุมไว้จริงเล็กน้อย ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ได้ข้อมูลดังตารางที่ 3-4 รูปที่ 3-10,3-11, 3-12 พบว่าน้ำหมักมีความหนืดน้อยมาก เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.3 คือโดยจะเริ่มหนืดเล็กน้อยที่ประมาณชั่วโมงที่ 96 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการหมักโดยได้กรดมะนาว 111.51 กรัมต่อลิตร แต่เนื่องจากการเติมแคลเซียมออกไซด์ทำให้น้ำหมักเจือจางลงจึงต้องพิจารณาจากปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถัง ซึ่งได้ประมาณ 379 กรัม ซึ่งนับว่าเป็นปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับผลการทดลองอื่นๆ แต่ถึงอย่างไรก็ยังต่ำกว่าการทดลองที่ 3.3 เล็กน้อย จากรูปที่ 3-12 พบว่าความสามารถที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 60 ของการหมัก ($Y_{p/s}$) และเวลาที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก ($Y_{p/x}$) สำหรับเวลาที่น้ำตาลกลูโคสสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ได้มากสุดคือที่ชั่วโมงที่ 12 ($Y_{x/s}$) ด้วยเหตุนี้การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยแคลเซียมออกไซด์ จึงเป็นภาวะที่สามารถนำไปใช้ในระดับขยายส่วนได้

3.5 ศึกษาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการทดลองของประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ได้ทำการวิจัยหาอายุที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวพบว่าที่อายุของเชื้อที่ 15 ชั่วโมงเป็นเวลาที่เหมาะสมซึ่งอยู่ในช่วงท้ายของการเจริญแบบทวีคูณ และ เริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบคงที่ โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 7 กรัมต่อลิตร แต่ถึงอย่างไรเมื่อพิจารณาถึงค่าอัตราการเจริญจำเพาะ พบว่าที่อายุของเชื้อที่ 15 ชั่วโมง ไม่ใช่เวลาที่ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คือได้ประมาณ 0.248 ชั่วโมง$^{-1}$ ดังนั้นจึงทำการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.2) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว ติดตามการเจริญของเชื้อทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง โดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-5 และรูปที่ 3-13 พบว่าเชื้อจะอยู่ในระยะพักตัว (lag phase) เป็นช่วงเวลาสั้น ๆ และเริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญเพิ่มปริมาณขึ้นอย่าง

ตารางที่ 3-4 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s Yx/s Yp/x และ Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อมีการควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างด้วย แคลเซียมออกไซด์ แทนแคลเซียมคาร์บอเนต

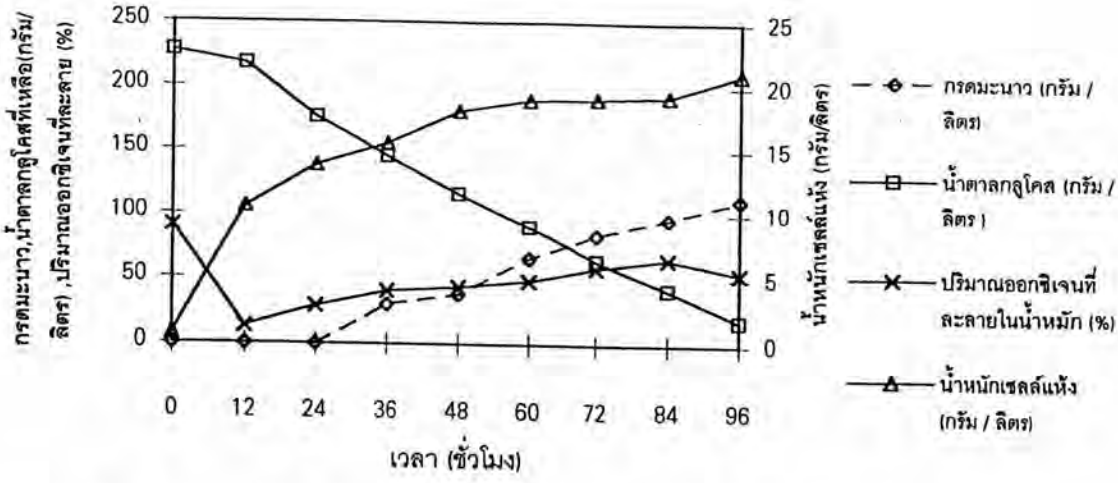
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัม/ลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย(%)	Yp/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	5.51	0.88	0.00	0.00	227.00	0.00	90	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.52	10.55	0.00	0.00	217.35	0.00	13	0.000	1.015	0.000	0.000	1.015	0.000
24	5.42	13.75	-	-	175.95	-	28	0.000	0.254	0.000	0.000	0.077	0.000
36	5.47	15.50	29.57	4.20	144.57	7.04	40	0.360	0.178	2.000	0.000	0.056	0.000
48	5.45	18.05	37.70	4.31	115.57	8.74	43	0.338	0.155	2.179	0.280	0.088	3.188
60	5.48	18.95	65.48	7.06	89.70	9.27	48	0.476	0.133	3.597	1.074	0.035	30.866
72	5.49	19.05	83.02	8.75	63.48	9.48	58	0.507	0.112	4.536	0.669	0.004	175.400
84	5.49	19.25	95.85	9.90	41.40	9.68	65	0.516	0.099	5.180	0.581	0.009	64.150
96	5.49	20.97	111.51	12.42	17.62	8.97	54	0.532	0.097	5.514	0.659	0.072	9.105

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,350 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 379 กรัม

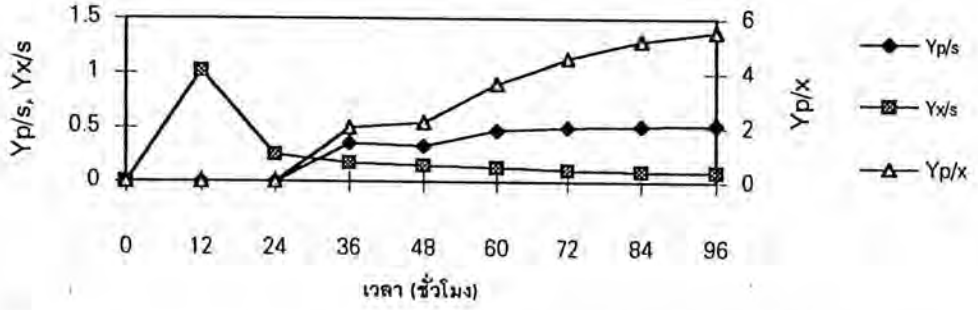
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณผลได้จากการวิเคราะห์ โดย HPLC

Yp/s Yx/s Yp/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

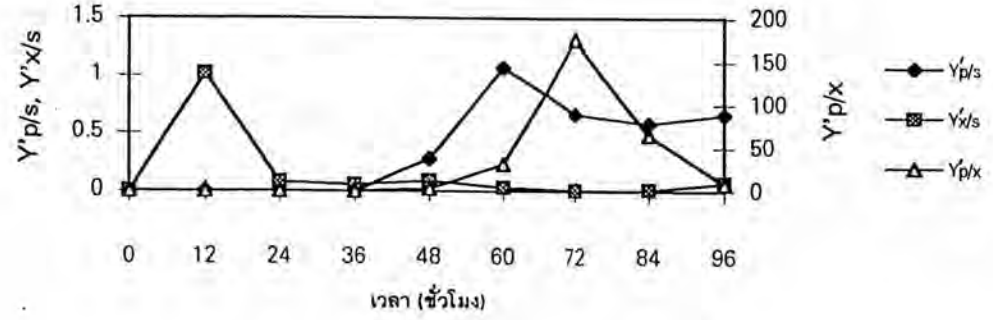
Y'p/s Y'x/s Y'p/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. ที่เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-10 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยแคลเซียมออกไซด์แทนแคลเซียมคาร์บอเนต



รูปที่ 3-11 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ด้วยแคลเซียมออกไซด์แทนแคลเซียมคาร์บอเนต



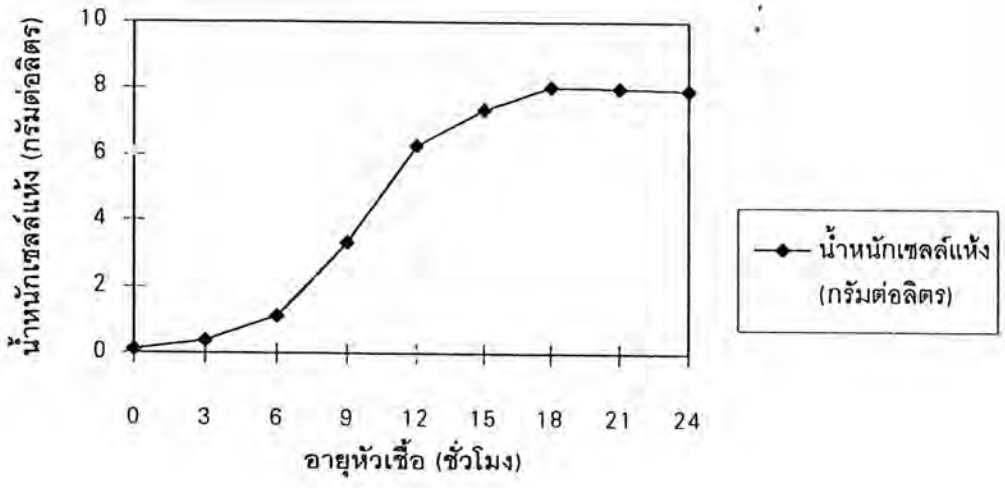
รูปที่ 3-12 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ด้วยแคลเซียมออกไซด์แทนแคลเซียมคาร์บอเนต

ตารางที่ 3-5 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *Candida oleoohila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ในระดับขวดเขย่า ที่ช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ : ชั่วโมง$^{-1}$)
0	0.13	- *
3	0.38	0.325
6	1.11	0.326
9	3.33	0.333
12	6.27	0.204
15	7.37	0.054
18	8.03	0.028
21	8.02	-
24	7.95	-

หมายเหตุ (- *) ไม่สามารถหาค่าได้ เนื่องจากเป็นค่าอ้างอิง

(-)ไม่สามารถทำการคำนวนได้เนื่องจาก เซลล์เริ่มไม่มีการเจริญ



รูปที่ 3-13 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

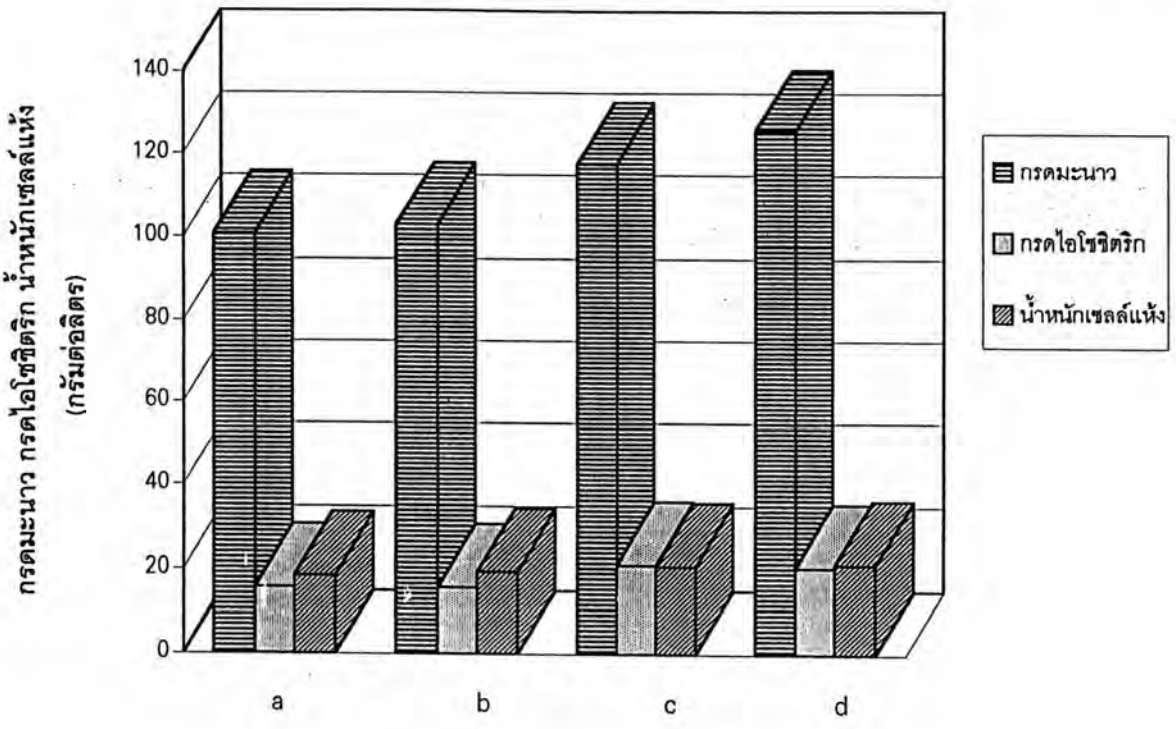
รวดเร็วจนเมื่อถึงชั่วโมงที่ 15 เชื้อก็เข้าสู่ช่วงท้ายของการเจริญแบบทวีคูณและเริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) ซึ่งรูปแบบการเจริญในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อนี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของประเสริฐ (2537) และเมื่อมาพิจารณาถึงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะพบว่าที่ ชั่วโมงที่ 9 ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด คือประมาณ 0.333 ชั่วโมง$^{-1}$ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 3.33 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้อายุหัวเชื้อที่เวลา 9 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเป็นเวลาของหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไป

36 ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เมื่อให้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นต่างกันประมาณ 2 เท่าในระดับขวดเขย่า

จากผลการทดลองที่ 3.5 ได้ศึกษาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสำหรับผลิตกรดมะนาว พบว่าที่ชั่วโมงที่ 9 เป็นอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมเนื่องจากให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คือประมาณ 0.333 ชั่วโมง$^{-1}$ แต่ทว่าได้ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นเพียง 3.33 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การทดลองของประเสริฐ (2537) ได้ใช้ชั่วโมงที่ 15 เป็นเวลาที่เหมาะสมของหัวเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาว ซึ่งให้น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 7.0 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อมาพิจารณาค่าอัตราการเจริญจำเพาะนั้นพบว่าไม่ใช้เวลาที่ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คือได้ประมาณ 0.248 ชั่วโมง $^{-1}$ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดมะนาวโดยใช้หัวเชื้อทีเวลาต่างกันคือ ที่เวลา 9 ชั่วโมง และที่ เวลา 12 ชั่วโมง (ซึ่งที่เวลานี้ให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าที่เวลา 9 ชั่วโมง ประมาณ 2 เท่า) โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก1.2) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว นำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.7) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.4 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว ทำการเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 96 และ 120 ของการหมัก ได้ข้อมูลแสดงในตารางที่ 3-6 รูปที่ 3-14 จากผลการทดลองพบว่าการใช้เวลาของหัวเชื้อที่ต่างกัน คือที่ 9 ชั่วโมงและ 12 ชั่วโมง โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งต่างกันประมาณ 2 เท่าคือ 3.33 กรัมต่อลิตร และ 6.27 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว พบว่าในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือได้ 100.73 กรัมต่อลิตร และ 102.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเวลาหมักไปถึง ชั่วโมงที่ 120 การใช้หัวเชื้อที่เวลา 9 ชั่วโมง เชื้อจะสามารถผลิต

ตารางที่ 3-6 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ที่มีการใช้อายุของหัวเชื้อที่ 9 ชั่วโมงและ 12 ชั่วโมง ในระดับขวดเขย่า

เวลา (ชั่วโมง)	อายุของหัวเชื้อ (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก
96	9	6.29	18.54	25.90	100.73	15.73	6.42
96	12	5.45	19.42	24.36	102.92	15.72	6.55
120	9	5.64	20.83	0	117.52	21.06	5.74
120	12	5.54	21.22	0	125.65	20.44	5.96



หมายเหตุ

a = เวลาของการหมักที่ 96 ชั่วโมง เมื่อใช้อายุของหัวเชื้อที่ 9 ชั่วโมง

b = เวลาของการหมักที่ 96 ชั่วโมง เมื่อใช้อายุของหัวเชื้อที่ 12 ชั่วโมง

c = เวลาของการหมักที่ 120 ชั่วโมง เมื่อใช้อายุของหัวเชื้อที่ 9 ชั่วโมง

d = เวลาของการหมักที่ 120 ชั่วโมง เมื่อใช้อายุของหัวเชื้อที่ 12 ชั่วโมง

รูปที่ 3-14 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ มีการใช้อายุของหัวเชื้อที่ 9 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง ในระดับขวดเขย่า

กรดมะนาวได้ต่ำกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการใช้หัวเชื้อที่เวลา 12 ชั่วโมง คือได้ 117.52 และ 125.65 กรัมต่อลิตร ส่วนการเจริญของเชื้อพบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ใกล้เคียงกันทั้งในชั่วโมงที่ 96 และ 120 ดังนั้นจากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการใช้หัวเชื้อ ที่เวลา 9 ชั่วโมง ไม่ได้ส่งผลให้การเจริญและความสามารถในการผลิตกรดมะนาวต่ำลงไป อีกทั้งยังช่วยลดเวลาการผลิตกรดมะนาวได้อีกด้วย

3.7 ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เมื่อมีการถ่ายโอนหัวเชื้อเป็นจำนวน 9 ครั้ง

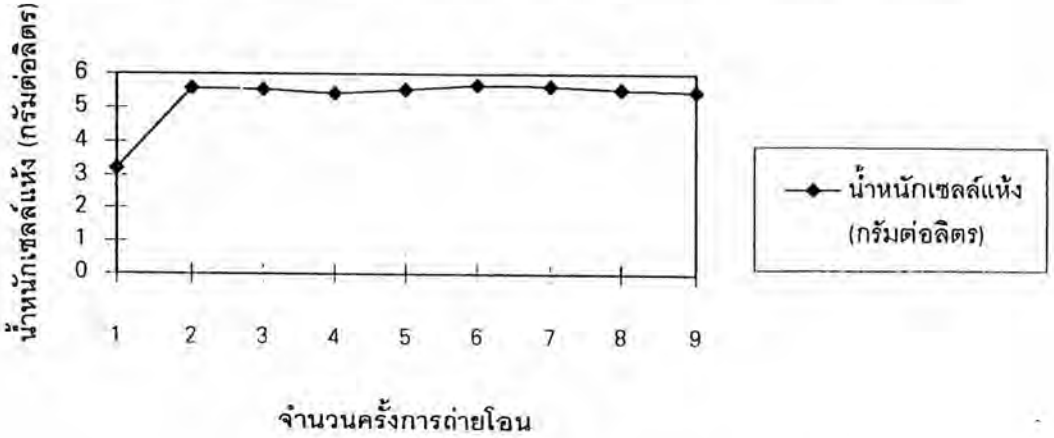
เนื่องจากการผลิตกรดมะนาวในระดับที่ใหญ่ จำเป็นต้องมีการเตรียมหัวเชื้อหลายขั้นตอน และมีการถ่ายเชื้อลงในถังหมักที่มีขนาดต่าง ๆ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากขึ้นก่อนทำการถ่ายเชื้อลงในถังหมักที่ต้องการผลิต ซึ่งในการเตรียมหัวเชื้อที่มีหลายขั้นตอนอาจส่งผลให้กิจกรรมของเซลล์ลดต่ำลงได้และเนื่องจากสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต้องพิจารณาประสิทธิภาพของเชื้อคือต้องมีคุณสมบัติที่คงที่ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.2)ในระดับขวดเขย่า โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.05 จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบวงกลมด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส นาน เป็นเวลา 9 ชั่วโมง (ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เชื้อมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด) จากนั้นถ่ายโอนเชื้อลงสู่อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้ออีกครั้งเป็นครั้งที่ 2 โดยให้ความเข้นข้นของเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.05 เช่นกัน ทำการทดลองเช่นเดิมตามภาวะดังข้างต้น โดยจะทำการถ่ายโอนเช่นนี้เป็นจำนวน 8 ครั้ง ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 3-7 รูปที่ 3-15 จากการทดลองพบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้หลังจากทำการถ่ายโอนเชื้อเป็นจำนวน 9 ครั้ง มีค่าใกล้เคียงกัน คือจะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นค่าเฉลี่ยประมาณ 5.55 กรัมต่อลิตร (คิดจากการถ่ายโอนครั้ง 2- 8) ดังนั้นแสดงว่าการถ่ายโอนหัวเชื้อหลายขั้นตอนเพื่อจะใช้ในระดับการผลิตกรดมะนาวที่มีขนาดใหญ่ขึ้นไม่ได้ส่งปัญหาให้กิจกรรมของเซลล์ลดต่ำลงไป

ตารางที่ 3-7 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ เมื่อมีการถ่ายโอนหัวเชื้อ เป็นจำนวน 9 ครั้ง

จำนวนครั้งการถ่ายโอนเชื้อ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	3.20
2	5.57
3	5.55
4	5.42
5	5.55
6	5.66
7	5.64
8	5.56
9	5.49

หมายเหตุ ครั้งที่ 1 เป็นน้ำหนักเซลล์ของการถ่ายโอนหัวเชื้อตั้งต้นจาก ยีสต์ที่มีการเจริญในอาหาร แข็งลาดเอียง

ครั้งที่ 2-9 เป็นน้ำหนักเซลล์ที่ได้จากการถ่ายโอนหัวเชื้อที่มีอายุ 9 ชั่วโมง



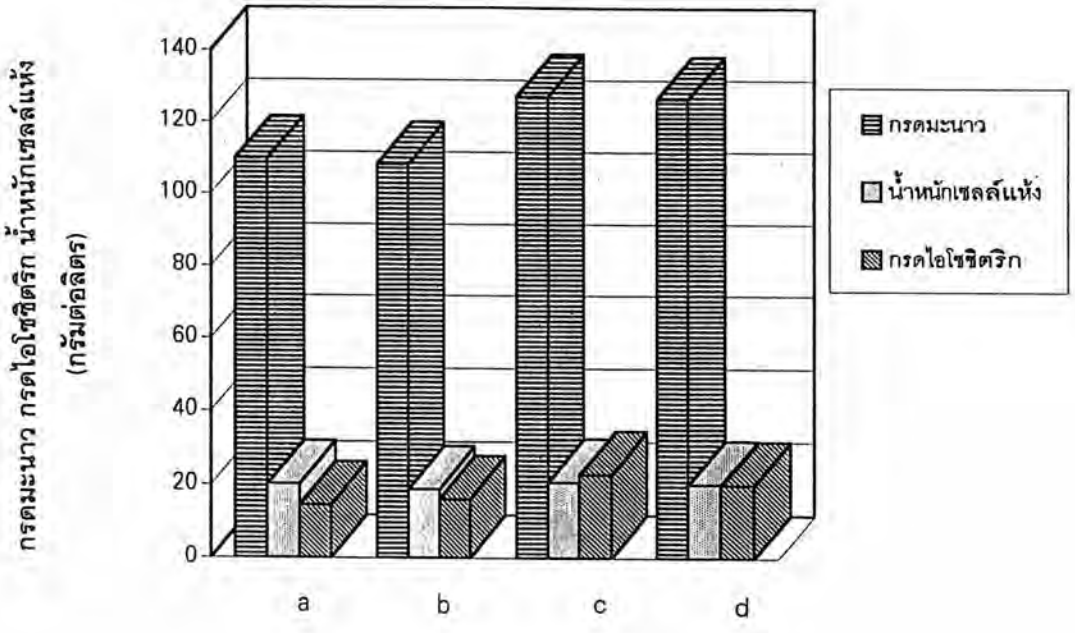
รูปที่ 3-15 รูปแบบแสดงการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ เมื่อมีการถ่ายโอนเชื้อเป็นจำนวน 9 ครั้ง

3.8 ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางการค้าในระดับขวดเขย่า

จากการทดลองของประเสริฐ (2537) ได้ทำการวิจัยหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในระดับขวดเขย่าซึ่งส่งผลให้เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณสูง แต่สูตรอาหารที่ ประเสริฐ ใช้นั้นมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งสั่งซื้อจากต่างประเทศ และมีราคาแพงจึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเพราะจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงมาก จากการรายงานของเชาวรีย์ เรืองวิไลทรัพย์ (2539) พบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ทั้งของเกรดทางห้องปฏิบัติการ (DIFCO) และยีสต์ที่ทางสถาบันเทคโนโลยีทางชีวภาพและวิศวกรรมพันธุ์ศาสตร์ (IBGE) เป็นผู้ทำการผลิตขึ้นมาใช้เอง โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ และอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวนั้นให้ผลการเจริญและการผลิตกรดมะนาวอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน อีกทั้งยังศึกษาหาชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนตเกรดทางการค้าที่ผลิตในประเทศไทยที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวมาแล้วพบว่า แคลเซียมคาร์บอเนตชนิด OMEGA (เกรดทางการค้า) สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีใกล้เคียงเช่นเดียวกับการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตของ FLUKA (เกรดทางห้องปฏิบัติการ)แต่จากการวิจัยที่ผ่านมายังไม่เคยมีการศึกษาผลของการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟต ซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่เป็นเกรดทางการค้าเทียบกับเกรดทางห้องปฏิบัติการมาก่อน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ*Candida oleophila* C-73 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีองค์ประกอบของอาหารที่เป็นเกรดทางการค้า เทียบกับ เกรดทางห้องปฏิบัติการ (ภาคผนวก ก 2.2) ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 96 และ 120 ชั่วโมง ซึ่งแสดงผลดังในตารางที่ 3-8 รูปที่ 3-16 จะเห็นได้ว่าในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักการใช้อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางค้าจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่ำกว่าการใช้อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่เป็นเกรดทางห้องปฏิบัติการคือ 18.78 กรัมต่อลิตร และ 20.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อใช้เวลาการหมักไปถึง 120 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ใกล้เคียงกันโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 20.11 และ 20.66 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกรดมะนาวที่เชื้อสามารถผลิตได้นั้น พบว่าใกล้เคียงกันทั้งในชั่วโมงการหมักที่ 96 และ 120 ดังนั้นในการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อไปสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วน

ตารางที่ 3-8 เปรียบเทียบปริมาณและผลผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สูตรอาหารมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางการค้า เทียบกับเกรดทางห้องปฏิบัติการ ในระดับขวดเขย่า

เวลา (ชั่วโมง)	เกรดองค์ประกอบสูตรอาหารในน้ำหมัก	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อ ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก
96	เกรดทางห้องปฏิบัติการ	6.04	20.22	23.75	109.81	14.46	7.59
96	เกรดทางการค้า	6.03	18.78	21.00	108.25	16.04	6.75
120	เกรดทางห้องปฏิบัติการ	5.23	20.66	0	127.30	22.81	5.58
120	เกรดทางการค้า	5.32	20.11	0	126.49	20.05	6.31



หมายเหตุ

a = เวลาของการหมักที่ 96 ชั่วโมง เมื่อใช้องค์ประกอบสูตรอาหารที่เป็นเกรดทางห้องปฏิบัติการ

b = เวลาของการหมักที่ 96 ชั่วโมง เมื่อใช้องค์ประกอบสูตรอาหารที่เป็นเกรดทางการค้า

c = เวลาของการหมักที่ 120 ชั่วโมง เมื่อใช้องค์ประกอบสูตรอาหารที่เป็นเกรดทางห้องปฏิบัติการ

d = เวลาของการหมักที่ 120 ชั่วโมง เมื่อใช้องค์ประกอบสูตรอาหารที่เป็นเกรดทางการค้า

รูปที่ 3-16 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มี องค์ประกอบสูตรอาหารเป็นเกรดทางการค้า เทียบกับเกรดทางห้องปฏิบัติการ ในระดับขวดเขย่า

เราจะใช้อาหารที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางการค้า เนื่องจากมีราคาถูกและส่งผลให้ต้นทุนการผลิตนั้นลดต่ำลงได้

3.9 ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เมื่อเลี้ยงในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่ได้ปรับปรุงขึ้นใหม่ ในระดับขวดเขย่า

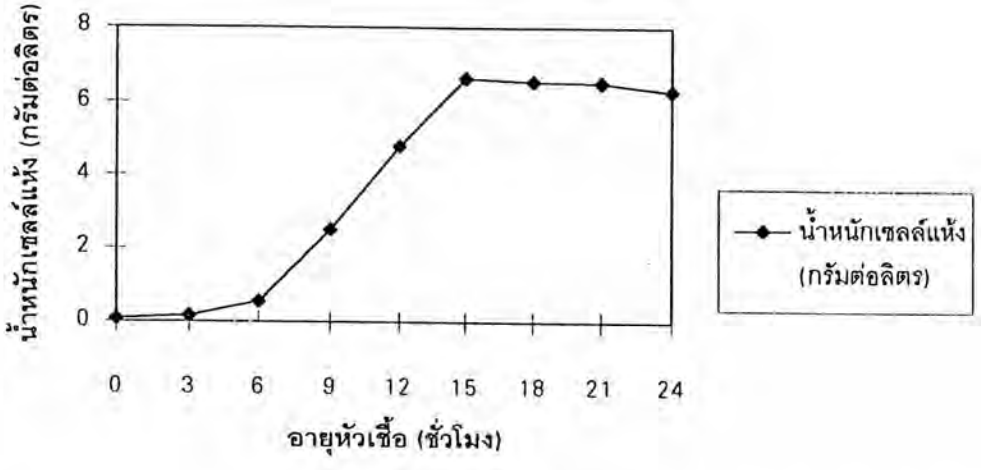
จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ *Candida oleophila* C-73 สามารถเจริญและสามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีเช่นกันเมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่เป็นเกรดทางการค้า ดังนั้นจึงมีแนวคิดว่าอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวน่าจะปรับปรุงให้เป็นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อได้ แทนการใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม (ตามภาคผนวก ก1.2) เพราะจะทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตกรดมะนาวได้อีกทางหนึ่งเมื่อทำการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้นเนื่องจากองค์ประกอบในสูตรอาหารที่ใช้อยู่ก่อนนั้นส่วนใหญ่จำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ และมีราคาแพง ดังนั้นจึงทำการปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวโดยให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากันกับสูตรอาหารเตรียมหัวเชื้อที่ใช้อยู่เดิม จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (Nitrogen analyser) จึงได้ว่าจะต้องใช้ แอมโมเนียมคลอไรด์ 2 กรัมต่อลิตร และ สารสกัดจากยีสต์ 5.60 กรัมต่อลิตร ซึ่งองค์ประกอบของอาหารดังกล่าวจะมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากันกับสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ได้ปรับปรุงขึ้นใหม่ (ภาคผนวก ก 1.4) โดยติดตามการเจริญของเชื้อ ทุก ๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการทดลองแสดงดังในตารางที่ 3-9 รูปที่ 3-17 พบว่ารูปแบบการเจริญของเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ได้รับการปรับปรุงขึ้นใหม่นั้นสอดคล้องกับการทดลองที่ 3.5 โดยที่ชั่วโมงที่ 9 ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด แต่พบว่าน้ำหนักเซลล์ที่ได้จะน้อยกว่า จึงอาจเป็นไปได้ว่าในสูตรอาหารเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นใหม่นี้ไม่มีองค์ประกอบของสารสกัดจากมอลต์ และ เปปโตน ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ช่วยส่งเสริมในการเจริญของเชื้อยีสต์นั้นเอง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงทำการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เมื่อใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ได้รับการปรับปรุงขึ้นใหม่จากอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว

ตารางที่ 3-9 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ : ชั่วโมง$^{-1}$)
0	0.10	- *
3	0.17	0.172
6	0.56	0.356
9	2.4	0.445
12	4.89	0.227
15	6.84	0.108
18	6.56	-
21	6.54	-
24	6.29	-

หมายเหตุ (-*) หมายถึงไม่สามารถคำนวนได้ เนื่องจากเป็นค่าอ้างอิง

(-) หมายถึงไม่สามารถคำนวนได้ เนื่องจากเซลล์เริ่มไม่มีการเจริญเติบโต



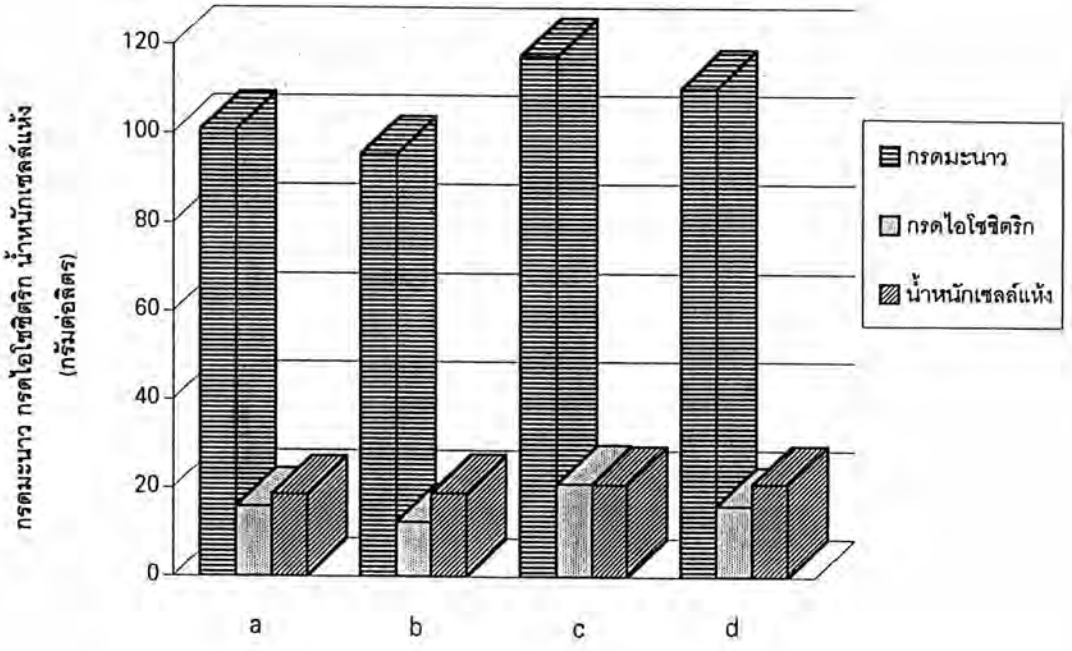
รูปที่ 3-17 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว ในระดับขวดเขย่า

3.10 ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เมื่อใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเป็นสูตรอาหารที่ได้รับการปรับปรุงขึ้นใหม่ เทียบกับสูตรอาหารเตรียมหัวเชื้อเดิม ในระดับขวดเขย่า

จากการทดลองที่ 3.9 ได้ทำการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ได้ปรับปรุงขึ้นใหม่ แทนสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิมจากอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีและในชั่วโมงที่ 9 ยังเป็นเวลาที่ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเช่นเดียวกับการเจริญของเชื้อในอาหารเตรียมหัวเชื้อเดิมอีกด้วย แต่เนื่องจากน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นใหม่นั้นมีค่าประมาณ 2.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิมซึ่งได้ประมาณ 3.3 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพของหัวเชื้อโดยใช้อาหารสำหรับเตียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นใหม่เทียบกับอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิมจึงทำการเลี้ยง *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก. 1.4) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1 ของการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดมะนาว นำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.7) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.4 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างเมื่อใช้เวลาในการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3-10 รูปที่ 3-18 จะเห็นได้ว่าในชั่วโมงที่ 96 และ 120 การเจริญของเชื้อนั้นไม่แตกต่างกันโดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 18 กรัมต่อลิตร และ 21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดมะนาวนั้นพบว่าในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก การใช้อาหารเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นใหม่จะให้ปริมาณกรดมะนาวต่ำกว่าการใช้อาหารเตรียมหัวเชื้อเดิม ประมาณ 5 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้เวลาในการหมักต่อไปถึง 120 ชั่วโมง พบว่าเชื้อจะสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้น แต่การใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตรเดิมก็ยังให้ปริมาณกรดมะนาวสูงกว่าประมาณ 7 กรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในปริมาณที่ไม่มากนัก อีกทั้งการใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นใหม่ยังมีราคาถูกกว่าเมื่อทำการหมักในระดับที่ใหญ่ขึ้น ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทำการขยายส่วนการผลิตโดยเลือกใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นใหม่แทนสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม

ตารางที่ 3-10 เปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิมและอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงใหม่

เวลา (ชั่วโมง)	สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อ ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก
96	สูตรเดิม	6.29	18.54	25.90	100.73	15.73	6.42
96	สูตรปรับปรุง	6.11	18.88	22.46	95.21	12.26	7.76
120	สูตรเดิม	5.64	20.83	0	117.52	21.06	5.74
120	สูตรปรับปรุง	5.80	21.04	1.32	110.30	16.08	6.86



หมายเหตุ

a = เวลาของการหมักที่ 96 ชั่วโมง เมื่อมีการใช้สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเป็นสูตรเดิม

b = เวลาของการหมักที่ 96 ชั่วโมง เมื่อมีการใช้สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเป็นสูตรที่ปรับปรุง

c = เวลาของการหมักที่ 120 ชั่วโมง เมื่อมีการใช้สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเป็นสูตรเดิม

d = เวลาของการหมักที่120ชั่วโมงเมื่อมีการใช้สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเป็นสูตรที่ปรับปรุง

รูปที่3-18 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิมกับ อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงใหม่

3.11 การศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร หลังจากที่ได้ภาวะการผลิตที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่า

จากการทดลองที่ผ่านมาได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในระดับขวดเขย่า คือใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเป็นสูตรอาหารที่ได้รับการปรับปรุงจากสูตรอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ตามภาคผนวก ก 1.4) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว โดยใช้อายุหัวเชื้อที่ 9 ชั่วโมง และอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางการค้า (ตามภาคผนวก ก2.7) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ตามภาคผนวก ก 1.4) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว โดยใช้อายุของหัวเชื้อที่ 9 ชั่วโมง นำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.8) ที่ใช้แคลเซียมออกไซด์เป็นตัวควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างแทนการใช้แคลเซียมคาร์บอเนต เนื่องจากสูตรอาหารดังกล่าวสามารถลดปัญหาของความหนืดได้เมื่อทำการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร (ดังการทดลองที่ 3.4) ทำการเลี้ยงตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.5 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวและควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยการเติมแบบอัตโนมัติไม่ให้มีค่าต่ำกว่า 5.0 ตลอดการทดลอง (การเลือกควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 5.0 เนื่องจากค่าความเป็นกรด - ด่างที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์อยู่ในช่วงประมาณ 4.5 -6.5) แต่เนื่องจากการควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างโดยระบบอัตโนมัติในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรเป็นไปได้ยากกว่าการควบคุมในระดับถังหมักขนาด 30 และ 300 ลิตร จึงทำให้ค่าการควบคุมที่ได้นั้นมีค่ามากกว่าการควบคุมจริงเล็กน้อย ทำการควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 3-11 รูปที่ 3-19,3-203-21พบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในระหว่างชั่วโมงที่ 0-72 หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อจะค่อนข้างคงที่จนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 21.18 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการหมักเชื้อจะเริ่มผลิตกรดมะนาวหลังจาก 12 ชั่วโมง และปริมาณกรดมะนาวจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนได้ประมาณ 94.91 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง เนื่องจากการเติมแคลเซียมออกไซด์ทำให้น้ำหมักเจือจางลงมากจึงต้องพิจารณาปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมัก ซึ่งจะได้ประมาณ 310.83 กรัม จะสังเกตได้ว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้นั้นค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับในการทดลองที่ 3.4 ที่ใช้แคลเซียมออกไซด์เป็นตัวควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเช่นเดียวกันแต่เนื่องจากในการทดลองที่ 3.4 นั้นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจะเป็นสูตรอาหารเดิม

ตารางที่ 3-11 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s Yx/s Yp/x และ Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อทำการหมักในภาวะเดียวกับการผลิตในระดับขวดเขย่าซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมตามการทดลองที่ 3.10

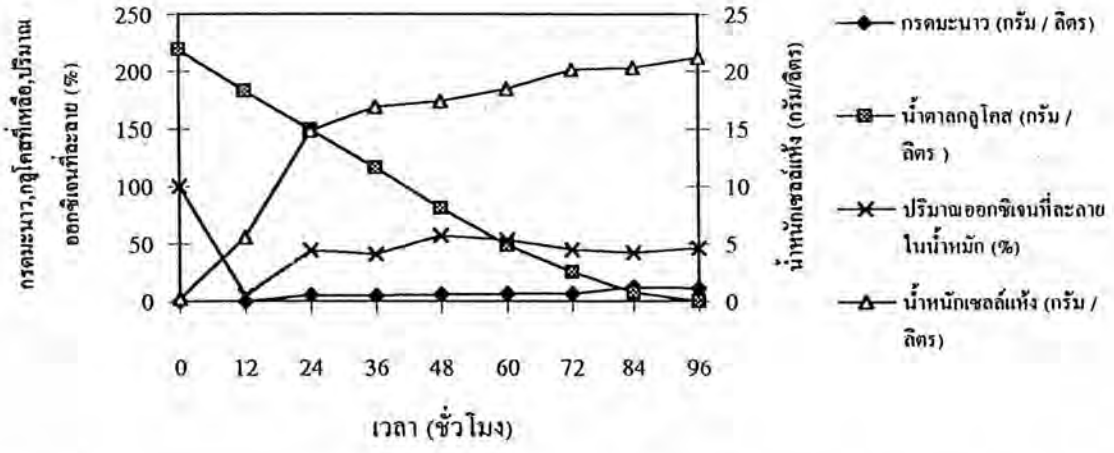
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัม/ลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)	Yp/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	5.54	0.24	0.00	0.00	219.29	0.00	100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.58	5.56	0.00	0.00	183.04	0.00	5	0.000	0.146	0.000	0.000	0.147	0.000
24	5.45	14.8	21.51	5.72	149.60	3.76	44	0.308	0.208	1.470	0.000	0.276	0.000
36	5.44	16.88	42.10	5.28	116.16	7.93	41	0.408	0.161	2.530	0.616	0.062	9.899
48	5.44	17.40	57.79	6.13	80.96	9.42	57	0.417	0.124	3.360	0.445	0.015	30.154
60	5.45	18.44	71.24	6.91	48.40	10.30	53	0.416	0.106	3.910	0.414	0.032	12.942
72	5.49	20.16	75.48	6.84	25.30	11.35	45	0.389	0.103	3.780	0.184	0.074	2.465
84	5.52	20.28	89.60	12.26	7.70	7.31	42	0.425	0.095	4.470	0.802	0.007	117.660
96	5.56	21.18	94.91	11.38	0	8.34	46	0.433	0.098	4.600	0.690	0.116	5.900

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,275 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 310.83 กรัม

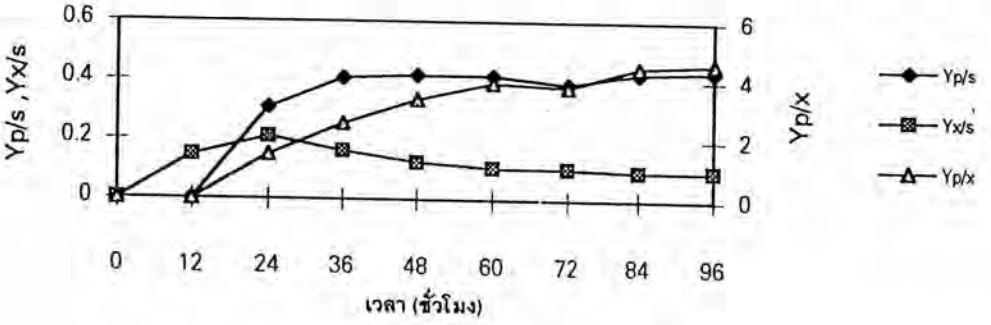
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณผลได้จากการวิเคราะห์ โดย HPLC

Yp/s Yx/s Yp/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

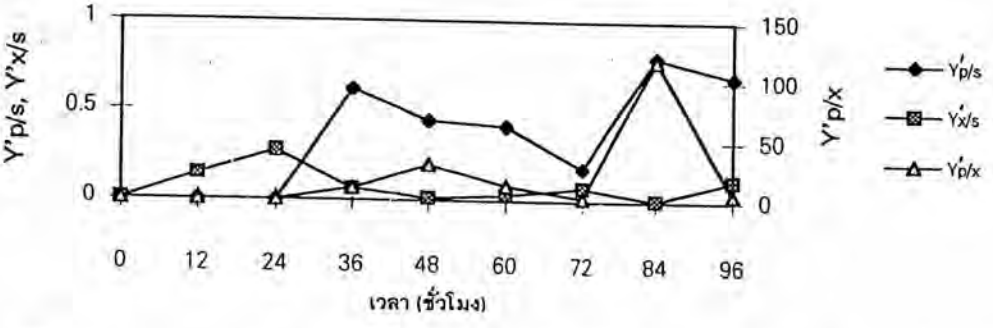
Y'p/s Y'x/s Y'p/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. ที่เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-19 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อทำการหมักในภาวะเดียวกันกับการทดลองที่ 3.10



รูปที่ 3-20 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อทำการหมักในภาวะเดียวกันกับการทดลองที่ 3.10



รูปที่ 3-21 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อทำการหมักในภาวะเดียวกันกับการทดลองที่ 3.10

และอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางห้องปฏิบัติการ โดยในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักเชื้อจะผลิตกรดมะนาวได้ 111.50 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดในถังหมักได้ 379 กรัม จากรูปที่ 3-21 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 84 ของการหมัก ($Y_{p/s}$) ซึ่งเป็นเวลาเดียวกันกับที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดเช่นกัน ($Y_{p/x}$)สำหรับเวลาที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ($Y_{x/s}$) นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะการหมักในการทดลองนี้ยังส่งผลให้น้ำหมักมีความหนืดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อทำการหมักนานขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงใหม่นั้นเป็นสูตรอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ จึงส่งผลให้กิจกรรมของเซลล์ที่มีต่อการผลิตกรดมะนาวลดต่ำลง และ สภาพน้ำหมักที่มีความหนืดข้น ถึงแม้ว่าในการทดลองในระดับขวดเขย่าของการทดลองที่ 3.10 จะไม่ได้ให้ผลที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนทั้งทางด้านปริมาณกรดมะนาวที่ได้และความหนืดที่เกิดขึ้น แต่เมื่อมีการขยายส่วนขึ้นพบว่าจะมีความแตกต่างทางด้านเทคนิคการให้อากาศ การกวน การทำให้น้ำหมักปลอดเชื้อ และชนิดของวัสดุที่ใช้ จึงส่งผลให้เห็นความแตกต่างระหว่างความสามารถในการผลิตในระดับขวดเขย่า กับ ระดับถังหมักได้อย่างชัดเจน ดังนั้นแสดงว่าอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเป็นสูตรอาหารที่ได้รับการปรับปรุงจากสูตรอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการเตรียมหัวเชื้อในระดับการขยายส่วนการผลิต ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวโดยใช้ภาวะการหมักเดิมแต่เปลี่ยนอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อนั้นเป็นสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อชนิดเดิม

3.12 ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวเมื่อเปลี่ยนอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจากอาหารเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงใหม่ เป็นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม ในการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* C - 73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ในการทดลองนี้ทำการเปลี่ยนอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจากที่ได้ปรับปรุงใหม่แล้วมาเป็นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C - 73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.2) โดยใช้อายุของหัวเชื้อที่ 9 ชั่วโมง ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.8) ซึ่งสูตรอาหารมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางการค้าทั้งสิ้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.5 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่าง

ไม่ให้ต่ำกว่า 5.0 ตลอดการทดลองด้วยแคลเซียมออกไซด์โดยการเติมแบบอัตโนมัติ เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 3-12รูปที่3-22,3-23,3-24พบว่าในชั่วโมงที่ 0-96 เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 22.18 กรัมต่อลิตรและน้ำหมักมีความหนืดน้อยมาก โดยจะเริ่มหนืดเล็กน้อยประมาณชั่วโมงที่ 96 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก และได้กรดมะนาวถึง 108.97 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดในถังประมาณ 359.60 กรัม จากรูปที่ 3-24 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 84 ของการหมัก ($Y_{p/s}$) ส่วนเวลาที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 48 ($Y_{p/x}$) สำหรับเวลาที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ได้สูงสุดคือที่ 24 ชั่วโมงของการหมัก ($Y_{x/s}$)

จากผลที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่า สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ถึงแม้ว่าความสามารถในการผลิตกรดมะนาวจะไม่ได้เท่ากับในภาวะการในการทดลองที่ 3.4 ซึ่งใช้แคลเซียมออกไซด์เป็นตัวควบคุมค่าความเป็น กรด - ด่างเช่นเดียวกัน แต่ก็ไม่มากนัก อีกทั้งการใช้อายุของหัวเชื้อในการทดลองนี้ใช้เวลาที่ 9 ชั่วโมงเป็นอายุหัวเชื้อที่เหมาะสม ในขณะที่ในการทดลองที่ 3.4 ใช้อายุของหัวเชื้อที่ 15 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ลดระยะเวลาของการหมักลงได้ สำหรับอาหารที่ใช้ผลิตกรดมะนาวในภาวะการหมักนี้มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางการค้า ในขณะที่การทดลองที่ 3.4ใช้อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางห้องปฏิบัติการ ดังนั้นในการศึกษาการขยายส่วนการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตรต่อไป จึงเลือกใช้ภาวะการหมักดังข้างต้นเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต

3.13 การหาอายุของหัวเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร สำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร โดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73

การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตรนั้นจำเป็นต้องทำการเตรียมหัวเชื้อ 2 ขั้นตอนคือ การใช้หัวเชื้อในขวดเขย่ารูปชมพู่ เป็นการเตรียมหัวเชื้อ ขั้นตอนที่ 1 โดยจะใช้อายุของหัวเชื้อที่เวลา 9 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด และใช้ ถังหมักขนาด 5 ลิตร สำหรับการเตรียมหัวเชื้อขั้นตอนที่ 2 ดังนั้นในการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร ต้องหาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเลี้ยงยีสต์ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.2) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2 ติดตามการเจริญ

ตารางที่ 3-12 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด - ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s , Yx/s ,Y p/x และ และ Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเปลี่ยนอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจากอาหารเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงใหม่เป็นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม

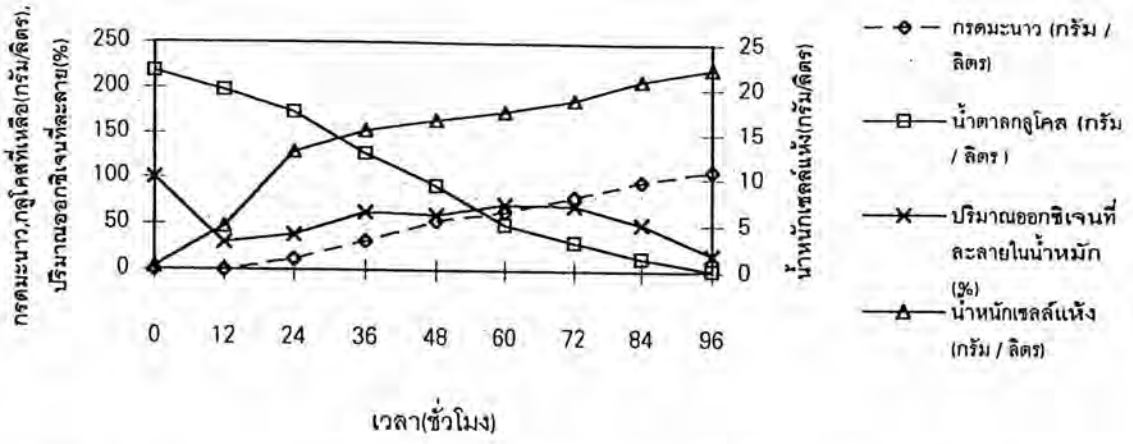
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัม/ลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)	Yp/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	5.76	0.35	0.00	0.00	218.24	0.00	100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.49	4.72	0.00	0.00	197.12	0.00	30	0.000	0.216	0.000	0.000	0.207	0.000
24	5.35	12.88	12.08	-	172.48	-	38	0.264	0.274	0.964	0.000	0.331	0.000
36	5.41	15.24	31.45	-	126.72	-	63	0.343	0.163	2.112	0.423	0.051	8.207
48	5.44	16.44	53.95	5.64	91.52	9.56	60	0.425	0.127	3.350	0.639	0.034	18.750
60	5.49	17.44	63.45	7.15	49.28	8.87	72	0.375	0.101	3.710	0.225	0.024	9.500
72	5.49	18.76	80.39	7.49	30.80	10.73	70	0.428	0.098	4.360	0.916	0.071	12.830
84	5.48	20.92	97.14	10.16	13.64	9.56	51	0.475	0.100	4.720	0.976	0.026	7.750
96	5.55	22.18	108.97	13.62	1.32	8.00	18	0.502	0.100	4.990	0.960	0.102	9.380

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,300 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 359.6 กรัม

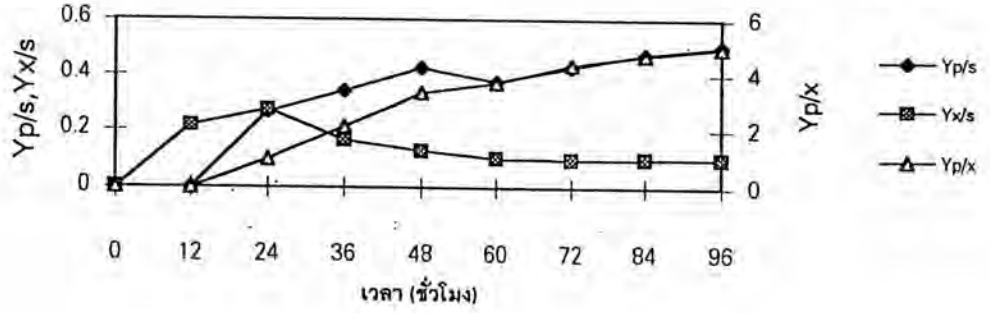
หมายเหตุ (-)หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณผลได้จากการวิเคราะห์โดย HPLC

Yp/s , Yx/s ,Y p/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

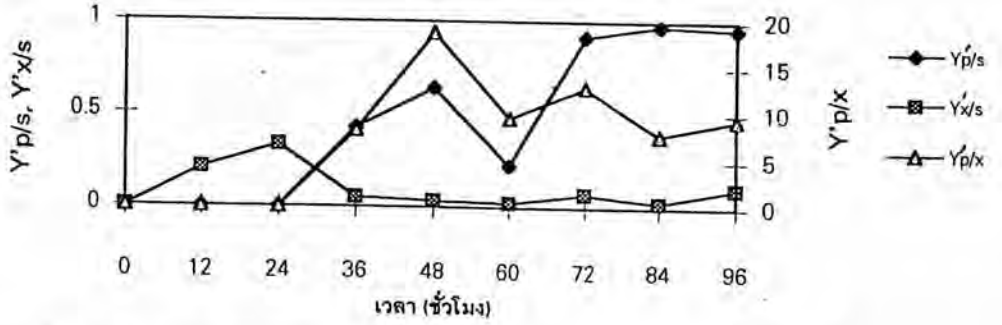
Y'p/s , Y'x/s ,Y'p/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. ที่เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-22 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเปลี่ยนอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจากที่ปรับปรุงเป็นอาหารสำหรับเตรียมหัว เชื้อเดิม



รูปที่ 3-23 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเปลี่ยนอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจากที่ปรับปรุงเป็นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม



รูปที่ 3-24 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเปลี่ยนอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจากที่ปรับปรุงเป็นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม

ของเชื้อทุก ๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 18 ชั่วโมง โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-13 รูปที่ 3-25 พบว่า รูปแบบการเจริญของเชื้อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร สอดคล้องกับการเจริญของเชื้อในระดับขวดเขย่า และพบว่าที่ชั่วโมงที่ 4 นั้นได้ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คือประมาณ 0.448 ชั่วโมง $^{-1}$ ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 2.1 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร จะใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 4 ชั่วโมง ของการเตรียมหัวเชื้อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป

3.14 การผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร ในภาวะการหมักเช่นเดียวกับ ถังหมักขนาด 5 ลิตร

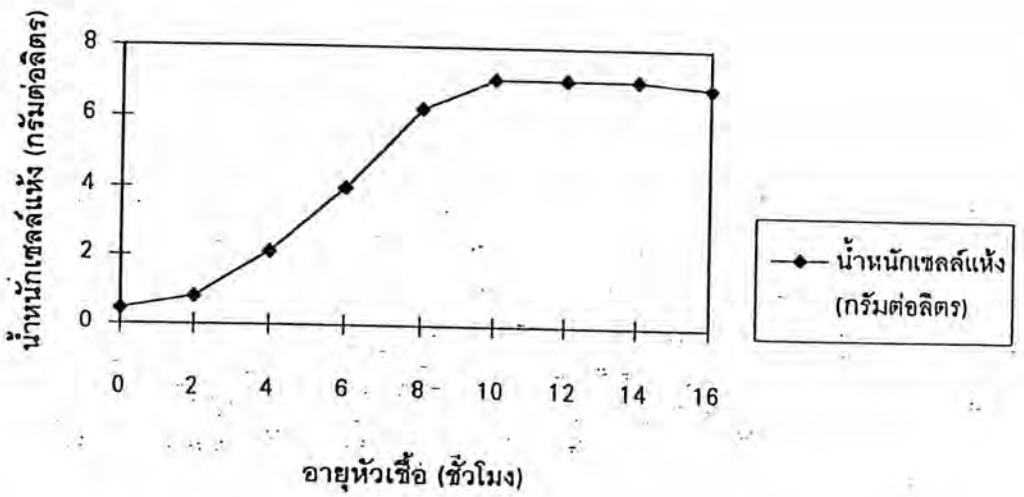
จากการทดลองการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ผ่านมาพบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร คือมีอัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.2) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว นำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.8) ทำการทดลองตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.5 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวใช้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่าง ไม่ให้ต่ำกว่า 5.00 ด้วยแคลเซียมออกไซด์โดยการเติมแบบอัตโนมัติ เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวเมื่อมีการขยายส่วนการผลิตและเทียบกับการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมงจนครบ 96 ชั่วโมงผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-14รูปที่ 3-26,3-27 และ3-28จากตารางที่ 3-14 รูปที่ 3-26,3-27 พบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในชั่วโมงที่ 0 - 96 จนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 18.01 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการหมักเชื้อจะเริ่มผลิตกรดมะนาวหลังจาก 12 ชั่วโมง และปริมาณกรดมะนาวจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนได้ประมาณ 123 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงการหมัก 96 ชั่วโมง คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดในถังได้ 2,932 กรัม การเพิ่มขึ้นของกรดมะนาวนี้สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป พบว่าที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักนั้นเหลือน้ำตาลกลูโคส 9.2 กรัมต่อลิตร สำหรับค่าอัตราส่วนระหว่างกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริกนั้นมีค่าสูงขึ้นเรื่อย ๆ เช่นกัน และจะเริ่มคงที่ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 84 นอกจากนี้น้ำหมักมีความหนืดน้อยมาก

ตารางที่ 3-13น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ : ชั่วโมง$^{-1}$)
0	0.46	-**
2	0.80	0.269
4	2.10	0.448
6	4.00	0.311
8	6.25	0.219
10	7.12	0.130
12	7.12	-
14	7.11	-
16	6.94	-
18	6.88	-

หมายเหตุ -** ไม่สามารถหาค่าได้เนื่องจากเป็นค่าอ้างอิง

\- ไม่สามารถหาค่าได้เนื่องจากเซลล์เริ่มไม่มีการเจริญเติบโต



รูปที่ 3-25 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 3-14 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด - ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s , Yx/s ,Y p/x และ Y'p/s , Y'x/s ,Y' p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อใช้ภาวะการหมักเช่นเดียวกันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร (ดังในการทดลองที่ 3.12)

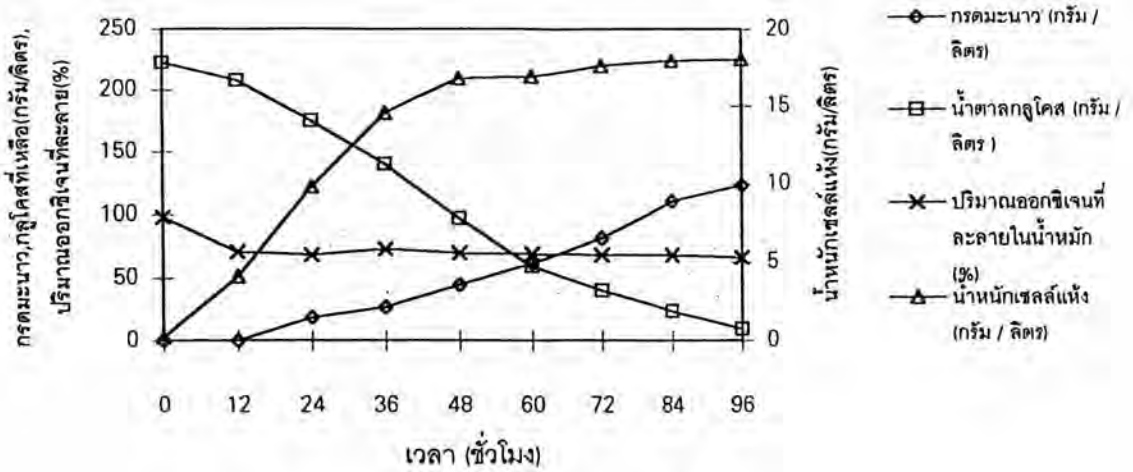
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด - ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรั /ลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)	Y p/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	4.79	0.21	0.00	0.00	222.70	0.00	98	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.17	4.08	0.00	0.00	207.50	0.00	71	0.000	0.254	0.000	0.000	0.254	0.000
24	5.01	9.72	18.34	-	174.90	-	68	0.317	0.198	1.880	0.000	0.173	0.000
36	5.05	14.56	26.70	-	139.80	-	73	0.322	0.173	1.830	0.238	0.138	1.727
48	5.06	16.76	44.53	7.24	96.50	6.15	70	0.352	0.131	2.660	0.412	0.051	8.105
60	5.04	16.8	61.77	9.46	59.30	6.94	69	0.378	0.103	3.620	0.463	0.003	143.600
72	5.01	17.61	81.26	8.60	39.70	8.58	68	0.444	0.095	4.610	0.994	0.037	26.698
84	5.02	17.92	110.60	12.80	23.40	9.70	68	0.555	0.088	6.170	1.800	0.019	64.645
96	5.01	18.01	123.00	11.40	9.20	9.60	66	0.576	0.083	6.750	0.873	0.006	137.770

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 24 ลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 2,952 กรัม

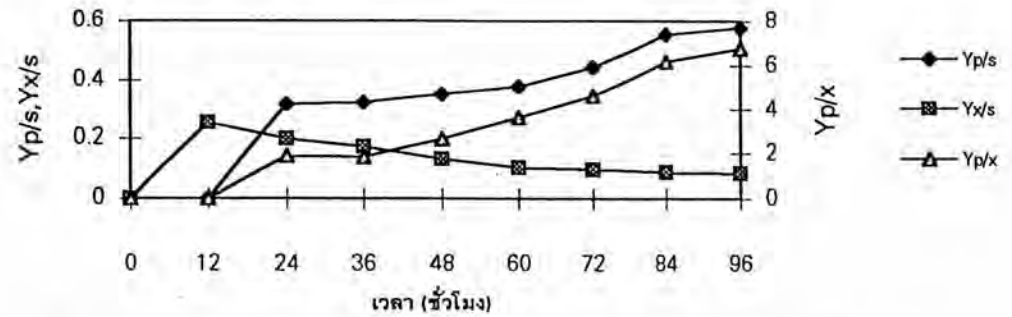
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถ คำนวณผลได้จากการวิเคราะห์โดย HPLC

Yp/s , Yx/s ,Y p/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

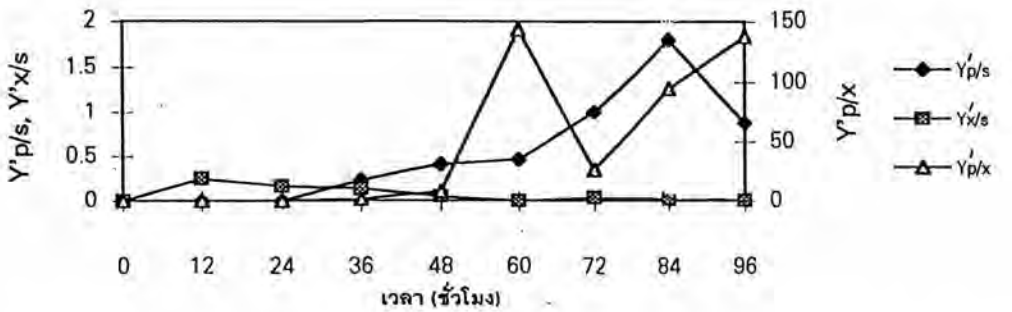
Y'p/s , Y'x/s ,Y' p/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-26 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อใช้ภาวะการหมักเช่นเดียวกันกับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร (ดังการทดลอง ที่ 3.12)



รูปที่ 3-27 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อใช้ภาวะการหมักเช่นเดียวกันกับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร (ดังการทดลองที่ 3.12)



รูปที่ 3-28 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อใช้ภาวะการหมักเช่นเดียวกันกับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร (ดังการทดลองที่ 3.12)

โดยจะเริ่มหนืดที่เวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงสุดท้ายของการหมัก จากรูปที่ 3-28 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 84 ของการหมัก ($Y'_{p/s}$) และเวลาที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงคือชั่วโมงที่ 60 ของการหมัก ($Y'_{p/x}$) สำหรับเวลาที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ได้สูงสุดคือ ที่ 12 ชั่วโมงของการหมัก ($Y'_{x/s}$)

จากผลการทดลองเมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตกรดมะนาวกับการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามผลการทดลองที่ 3.12 พบว่า ความสามารถในการเจริญของเชื้อ ในถังหมักขนาด 5 ลิตรจะสูงกว่า โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 22.18 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาหมักที่ 96 ชั่วโมง ในขณะที่การเจริญของเชื้อในระดับถังหมัก 30 ลิตรเท่ากับ 18.01 กรัมต่อลิตร แต่ถึงอย่างไรพบว่าความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของการผลิตในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร จะให้ปริมาณกรดมะนาว 123 กรัมต่อลิตร โดยที่การผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มีปริมาณกรดมะนาว 108.97 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักไป 96 ชั่วโมง จากการเปรียบเทียบดังข้างต้นจะเห็นได้ว่า การนำภาวะการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มาใช้ในการผลิตในการขยายส่วนการผลิตในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร เป็นภาวะการผลิตที่เหมาะสม เนื่องจากภาวะดังกล่าวไม่ได้ทำให้ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวต่ำลงไปเมื่อมีการขยายส่วนการผลิต แต่เมื่อเรามาพิจารณาถึงอัตราการกวนที่ใช้คือ 600 รอบต่อนาที ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนจบการทดลองนั้นจะเป็นสภาพการหมักที่รุนแรงมากสำหรับการผลิตในระดับที่มีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งอาจทำให้เกิดความเสียหายกับถังหมักได้ จึงต้องมีการปรับปรุงภาวะการผลิตให้เหมาะสมสำหรับการผลิตเมื่อมีการขยายส่วนและต้องทำการศึกษาเกณฑ์ที่เหมาะสมเมื่อทำการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น

3.15 การผลิตกรดมะนาวเมื่อกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนให้คงที่ ในถังหมักขนาด 30 ลิตร

จากการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วน คือถังหมักขนาด 30 ลิตร โดยใช้ภาวะการผลิตเหมือนกับถังหมักขนาด 5 ลิตร จากผลการทดลองที่ 3.14 พบว่าภาวะดังกล่าวสามารถทำให้การผลิตกรดมะนาวเป็นไปด้วยดีและไม่มีปัญหาของความหนืดซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของการขยายส่วนการผลิต แต่ภาวะที่ใช้นั้นต้องใช้ความเร็วรอบการกวนที่ 600 รอบต่อนาที ตั้งแต่ เริ่มต้นการทดลองจนจบการทดลอง ซึ่งพบว่าเป็นภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง และอาจส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อถังหมักได้เมื่อนำภาวะนี้ไปทำการขยายส่วนการผลิตให้ใหญ่ขึ้น ดังนั้นจึงทำการปรับปรุงภาวะ

การผลิตให้เหมาะสมสำหรับการขยายส่วน และศึกษาเกณฑ์ที่เหมาะสมเมื่อมีการขยายส่วนการผลิต เนื่องจากเมื่อทำการขยายส่วนขึ้นมาพบว่ามีความแตกต่างในด้านต่าง ๆได้แก่ เทคนิคการให้อากาศ การกวน การทำให้อาหารปลอดเชื้อ และการเตรียมหัวเชื้อเป็นต้น สำหรับการพิจารณาการขยายส่วนนั้นจะมีเกณฑ์ที่นิยมใช้กำหนดให้คงที่ในการขยายส่วนของเครื่องหมักแบบถังกวน ได้แก่ ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (Pg/V) ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน (K_La) ค่าความเร็วรอบปลายใบพัด (πnDi) ค่าเรโนลนัมเบอร์ (N_{Re}) และ เวลาที่ใช้ในการกวน สำหรับการผลิตกรดมะนาวนั้นยังไม่มีข้อมูลที่กำหนดเกณฑ์ในการขยายส่วน ดังนั้นในการทดลองนี้จะทำการศึกษาโดยพิจารณาเกณฑ์การขยายส่วนดังนี้

1 ค่าเรโนลนัมเบอร์ (N_{Re})

2 ค่าความเร็วรอบปลายใบพัด (πnDi)

3 ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (Pg / V)

4 ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน ($K_L a$)

3.15.1 การผลิตกรดมะนาวเมื่อกำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์ (N_{Re}) ของถังหมักขนาด 30 ลิตรเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร

การทดลองนี้ทำการศึกษาเมื่อกำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์ของถังหมักขนาด 30 ลิตร และ 5ลิตรมีค่าเท่ากันเป็นเกณฑ์สำหรับการขยายส่วนการผลิตกรดมะนาวซึ่งการกำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์มีค่าเท่ากันจะทำการคำนวนให้อยู่ในรูปของอัตราการกวนโดยที่อัตราการกวนที่ใช้ประมาณ 300 รอบต่อนาที (ตามภาคผนวก ฯ 2.4) ดังนั้นจึงเลี้ยง *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.8) ตามวิธีของการเลี้ยงในข้อ 2.3.2.6 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว โดยใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.15.1 รูปที่ 3-29 , 3-30 พบว่าเชื้อจะมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในชั่วโมงที่ 0-48 และจะเริ่มคงที่ ในชั่วโมงที่ 60 ซึ่งการเจริญของเซลล์นั้นช้ามาก ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 17.85 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเซลล์นั้นต่ำและเริ่มผลิตช้า โดยเชื้อจะเริ่มผลิตกรดมะนาวที่ชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก และได้ปริมาณกรดมะนาวที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมงเพียง 75.5 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดในถังหมักประมาณ 1,661 กรัม รวมทั้งเซลล์มีการใช้น้ำตาลช้ามากเนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลือ

ตารางที่ 3-15.1 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด - ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s , Yx/s ,Y p/x และ Y'p/s , Y'x/s ,Y' p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 30 ลิตร กำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์ของถังหมักขนาด 30 ลิตรและ 5 ลิตรมีค่าเท่ากัน

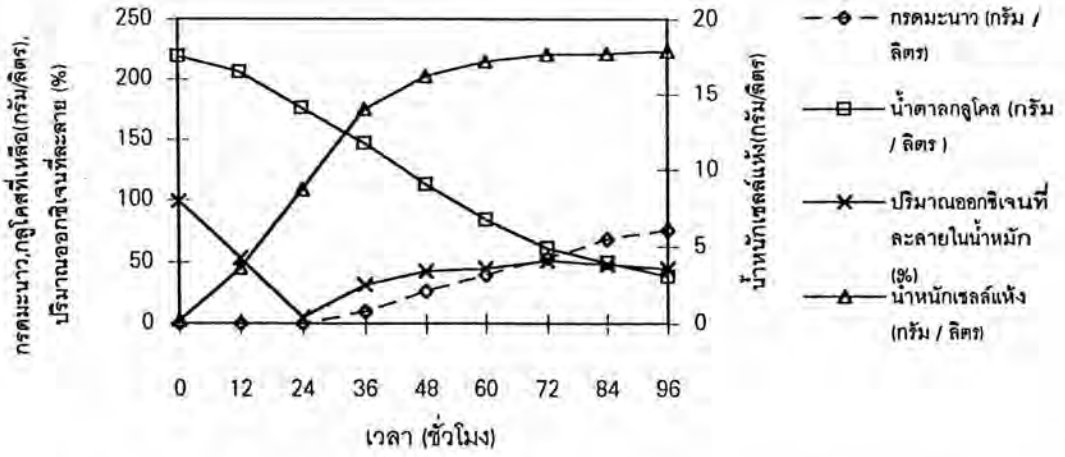
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรั /ลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)	Y p/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	4.50	0.22	0.00	0.00	219.00	0.00	99	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.00	3.65	0.00	0.00	206.00	0.00	53	0.000	0.264	0.000	0.000	0.264	0.000
24	5.02	8.70	-	-	176.00	-	5	0.000	0.197	0.000	0.000	0.168	0.000
36	5.04	14.00	10.00	-	146.00	-	32	0.139	0.191	0.726	0.000	0.182	0.000
48	5.05	16.20	26.70	-	112.60	-	43	0.251	0.150	1.671	0.486	0.064	7.591
60	5.05	17.20	39.90	-	84.00	-	45	0.296	0.126	2.350	0.462	0.035	13.200
72	5.00	17.65	53.40	9.00	61.25	5.39	51	0.339	0.110	3.064	0.593	0.026	30.000
84	5.02	17.70	68.20	10.76	49.78	6.34	48	0.403	0.103	3.902	1.290	0.000	296.000
96	5.01	17.85	75.00	10.80	38.53	6.99	45	0.418	0.098	4.282	0.648	0.013	48.660

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 22 ลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 1,661 กรัม

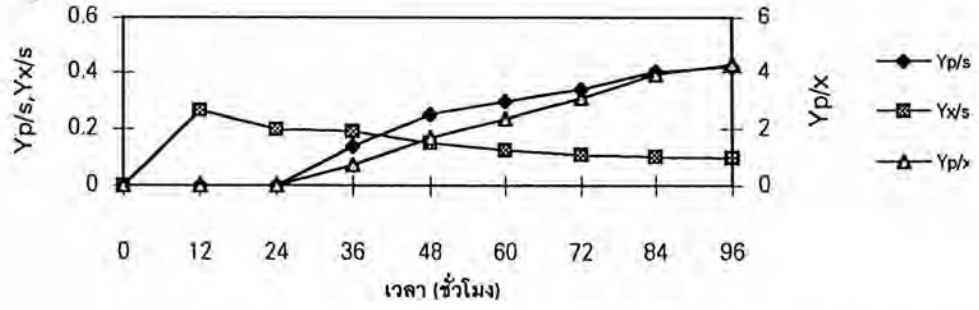
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถ คำนวณผลได้จากการวิเคราะห์โดย HPLC

Yp/s , Yx/s ,Y p/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

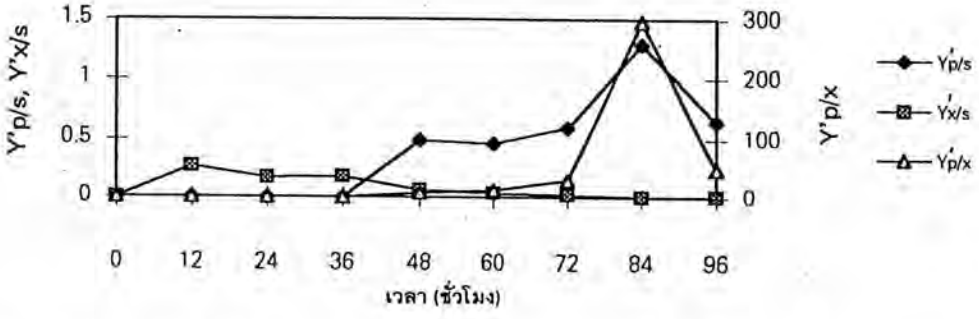
Y'p/s , Y'x/s ,Y' p/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-29 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อกำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์ของถังหมักขนาด 30 ลิตรเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 3-30 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อกำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์ของถังหมักขนาด 30 ลิตรเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 3-31 ค่า Y'p/sY'x/sY'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila*C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อกำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์ของถังหมักขนาด 30 ลิตรเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร

อยู่มากเมื่อสิ้นสุดการหมักโดยเหลืออยู่ 38.53 กรัมต่อลิตร จากรูปที่ 3-31 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 84 ของการหมัก ($Y_{p/s}$) ซึ่งเป็นเวลาเดียวกันกับที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดเช่นกัน($Y_{p/x}$)สำหรับเวลาที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ได้สูงสุดคือ ที่ 12 ชั่วโมงของการหมัก ($Y_{x/s}$) เมื่อมาพิจารณาปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหมักพบว่าปริมาณออกซิเจนมีค่าต่ำสุดเป็น 5 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวที่เวลาการหมัก 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์กำลังเจริญเติบโต และเริ่มผลิตกรดมะนาวซึ่งปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีค่าต่ำเนื่องมาจากความเร็วรอบการกวนไม่เหมาะสมคือต่ำเกินไปจึงมีผลต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักที่ไม่พอเพียงต่อความต้องการของเชื้อ ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีค่าต่ำดังกล่าวอาจจะต่ำกว่าค่าวิกฤตของเชื้อ เนื่องจากในการผลิตกรดมะนาวในภาวะที่เหมาะสมของถังหมักขนาด 5 ลิตร จะมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักที่มีค่าต่ำสุดมีค่าถึงประมาณ 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว ซึ่งเป็นผลมาจากในภาวะของการผลิตในถังหมักระดับ 5 ลิตรนั้นได้ใช้ความเร็วรอบของการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที เป็นตัวกำหนดค่า 100 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว จึงมีผลให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักนั้นพอเพียงต่อความต้องการของเชื้อ ดังนั้นการที่ปริมาณออกซิเจนที่เหลือต่ำดังกล่าว จึงเป็นผลมาจากการใช้ความเร็วรอบของการกวนที่ไม่เหมาะสมคือต่ำเกินไปในการกำหนดค่า 100 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวนั้นเอง ซึ่งได้ไปส่งผลให้การเจริญและการผลิตกรดมะนาวลดต่ำลงอีกทั้งการผลิตกรดมะนาวในภาวะดังข้างต้นยังทำให้น้ำหมักมีปัญหาของความหนืดอีกด้วย

เมื่อกำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์ ของถังหมักขนาด 30 ลิตร และ 5 ลิตรมีค่าเท่ากัน ไม่สามารถทำให้การเจริญและการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร ดีใกล้เคียงกับถังหมักขนาด5ลิตรได้เราจึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการขยายส่วนการผลิตที่ใหญ่ขึ้นได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเปลี่ยนเกณฑ์ในการขยายส่วน โดยจะกำหนดให้ค่าความเร็วรอบปลายใบพัดของถังหมักขนาด 30 ลิตรและ 5 ลิตรมีค่าคงที่ เป็นเกณฑ์ในการขยายส่วนต่อไป

3.15.2 การผลิตกรดมะนาวเมื่อกำหนดให้ค่าความเร็วรอบของปลายใบพัด (πnDi) ของถังหมักขนาด 30 ลิตรและถังหมักขนาด 5 ลิตรมีค่าเท่ากัน

จากการทดลองที่ผ่านมาได้กำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์ ของถังหมักขนาด 30 ลิตร และ 5 ลิตร มีค่าเท่ากันเป็นเกณฑ์ในการขยายส่วน พบว่าเกณฑ์ดังกล่าวไม่สามารถทำให้การเจริญและ

การผลิตกรดมะนาวของถังหมักขนาด 30 ลิตร ดีใกล้เคียงกับถังหมักขนาด 5 ลิตร จึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเปลี่ยนเกณฑ์ในการขยายส่วน โดยจะกำหนดให้ค่าความเร็วรอบของปลายใบพัดของถังหมักขนาด 30 ลิตรและ 5 ลิตรมีค่าเท่ากัน เนื่องจากเครื่องหมักแบบกวนที่มีการผสมดีจะเกิดแรงเฉือนขึ้นภายใน ซึ่งแรงเฉือนนั้นจะเกิดที่บริเวณปลายของใบพัด ดังนั้นในการศึกษาเกณฑ์การขยายส่วนโดยการกำหนดค่าความเร็วรอบปลายใบพัด (πnDi)จึงเป็นส่วนที่สำคัญซึ่งการกำหนดให้ค่าความเร็วรอบปลายใบพัดของถังหมักขนาด 5 ลิตร เท่ากันกับถังหมักขนาด 30 ลิตร จะทำให้อยู่ในรูปของอัตราการกวน (ตามภาคผนวก ฉ 2.3) พบว่าต้องใช้อัตราการกวนที่ประมาณ 400 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 30 ลิตร จะทำให้มีค่าความเร็วรอบของปลายใบพัดเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร ดังนั้นจึงเลี้ยงเชื้อในข้อ 2.3.2.6 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว โดยใช้อัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาทีเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-15.2 รูปที่ 3-32 , 3-33 พบว่าความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 นั้นดีกว่าการผลิตกรดมะนาว โดยกำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์คงที่เล็กน้อย แต่ประสิทธิภาพของเซลล์ก็ยังต่ำกว่าการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยปริมาณกรดมะนาวที่ระยะการหมักที่ 96 ชั่วโมงได้เพียง 90.26 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดในถังหมักเท่ากับ 2,075.98 กรัม ส่วนความสามารถในการใช้น้ำตาลก็ยังช้าอยู่ คือเหลือน้ำตาลกลูโคส 24.2 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก จากรูปที่ 3-34 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก ($Y'_{p/s}$) เวลาที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 84 ของการหมัก ($Y'_{p/x}$) สำหรับเวลาที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ได้สูงสุดคือที่ 12 ชั่วโมงของการหมัก ($Y'_{x/s}$) นอกจากนี้เมื่อมาพิจารณาปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักพบว่าที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ปริมาณออกซิเจนละลายต่ำสุดที่ 24 % ซึ่งต่ำกว่าค่าวิกฤตของเชื้อ โดยค่าวิกฤตของเชื้อจะมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักอยู่ที่ 30 % (จากผลการทดลองในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร) แต่ถึงอย่างไรก็ยังมากกว่าการกำหนดเกณฑ์โดยให้ค่าเรโนลนัมเบอร์คงที่ ซึ่งมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายต่ำสุดในน้ำหมักเพียง 5 % และจากผลการทดลองที่ได้ดังกล่าวอาจเกิดจากการใช้อัตราการกวนที่ไม่เหมาะสมคือต่ำเกินไปจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ การเจริญและการผลิตกรดมะนาวต่ำลงได้ อีกทั้งการหมักในภาวะการผลิตกรดมะนาวนี้ยังเกิดปัญหาของความหนืดด้วย

เมื่อกำหนดให้ค่าความเร็วรอบของปลายใบพัดของถังหมักขนาด 30 ลิตร เท่ากับถังหมักขนาด 5 ลิตร ยังไม่สามารถทำให้การเจริญและการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร

ตารางที่ 3-15.2 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด - ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s , Yx/s ,Y p/x และ Y'p/s , Y'x/s ,Y' p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 30 ลิตร กำหนดให้ค่าความเร็วรอบปลายใบพัดของถังหมักขนาด 30 ลิตร และ 5 ลิตรมีค่าเท่ากัน

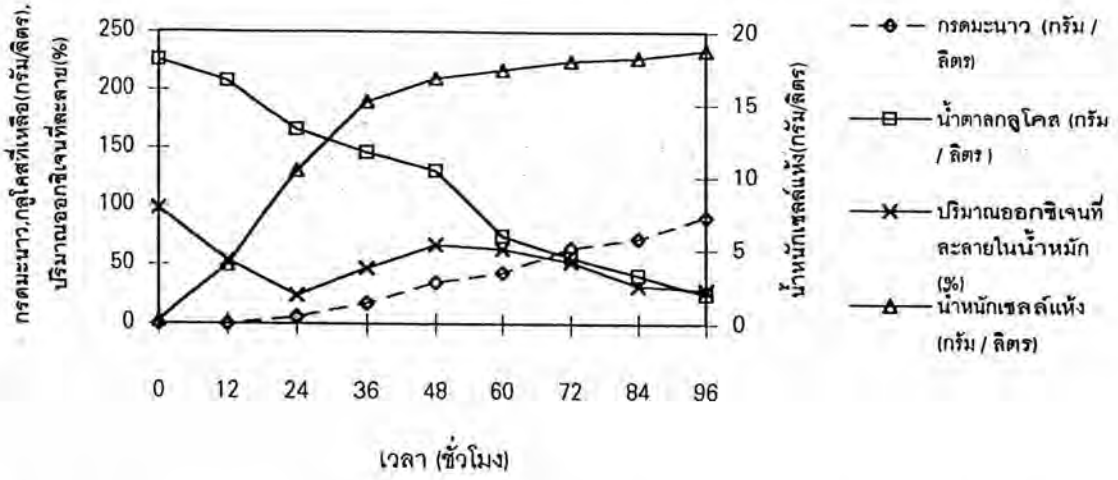
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรั /ลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)	Y p/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	4.67	0.23	0.00	0.00	225.30	0.00	98	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.03	3.96	0.00	0.00	207.60	0.00	54	0.000	0.210	0.000	0.000	0.210	0.000
24	5.01	10.44	5.90	-	165.60	-	24	0.098	0.171	0.577	0.000	0.154	0.000
36	5.01	15.16	17.44	-	146.20	-	47	0.220	0.188	1.168	0.595	0.243	2.445
48	5.01	16.84	35.0	-	130.20	-	67	0.309	0.174	2.107	1.098	0.105	10.452
60	5.01	17.40	42.73	6.75	74.00	6.75	63	0.292	0.113	2.488	0.138	0.009	13.804
72	5.01	18.01	64.18	8.13	56.20	8.13	52	0.379	0.105	3.609	1.205	0.034	35.164
84	5.02	18.22	72.45	8.46	40.50	8.46	32	0.391	0.097	4.027	0.527	0.013	39.381
96	5.01	18.75	90.26	9.70	24.20	9.70	28	0.448	0.092	4.873	1.093	0.033	33.604

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 23 ลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 2,075.98 กรัม

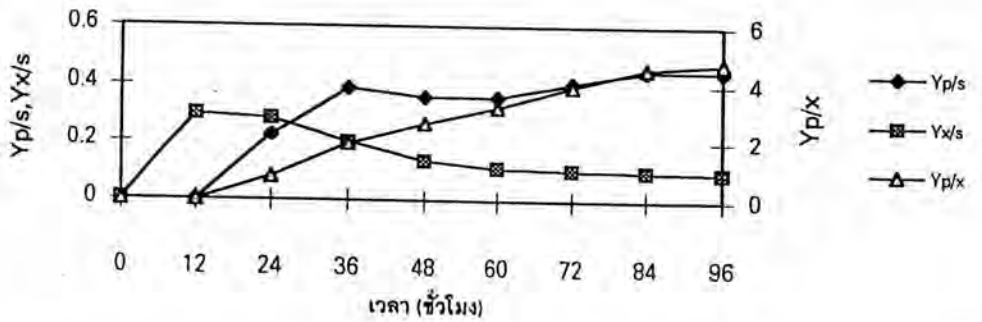
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถ คำนวณผลได้จากการวิเคราะห์โดย HPLC

Yp/s , Yx/s ,Y p/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

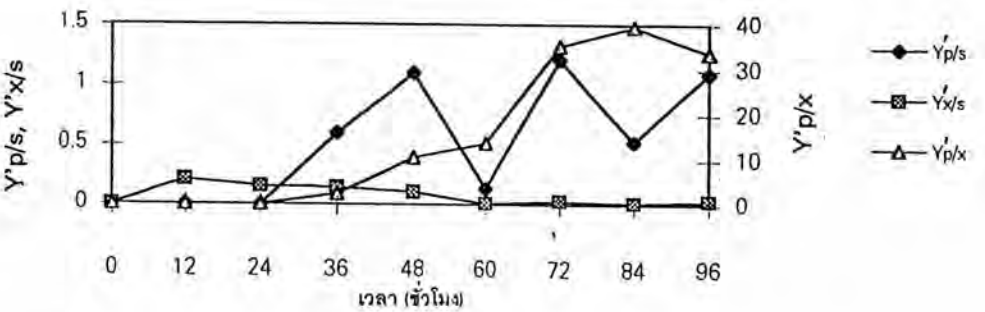
Y'p/s , Y'x/s ,Y' p/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-32 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อกำหนดให้ค่าความเร็วรอบปลายใบกวนของถังหมักขนาด 30 ลิตรเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 3-33 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อกำหนดให้ค่าความเร็วรอบปลายใบกวนของถังหมักขนาด30ลิตรเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 3-34 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อกำหนดให้ค่าความเร็วรอบปลายใบกวนของถังหมักขนาด30ลิตรเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ดีใกล้เคียงกับถังหมักขนาด 5 ลิตรได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเปลี่ยนเกณฑ์ในการขยายส่วน โดยจะกำหนดให้ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (Pg / V) ของถังหมักขนาด 30 ลิตร และถังหมักขนาด 5 ลิตร มีค่าเท่ากันเป็นเกณฑ์ในการขยายส่วนต่อไป

3.15.3 การผลิตกรดมะนาวเมื่อกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรของน้ำหมัก (Pg/V)ของถังหมักขนาด 30 ลิตรและ 5 ลิตรมีค่าเท่ากัน

การทดลองนี้ทำการศึกษาความสามารถในการเจริญ และการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เมื่อกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรของน้ำหมัก (Pg / V) ของถังหมักขนาด 30 ลิตรและถังหมักขนาด 5 ลิตรมีค่าเท่ากัน ซึ่งการกำหนดให้ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรของน้ำหมักมีค่าเท่ากัน จะทำการคำนวนให้อยู่ในรูปของการกวน จากการคำนวนพบว่าจะต้องใช้อัตราการกวนประมาณ 500 รอบต่อนาที (ตามภาคผนวก ฉ 2.1) ซึ่งจะทำให้อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักของถังหมักขนาด 30 ลิตร มีค่าเท่ากันกับในถังหมักขนาด 5 ลิตร ดังนั้น จึงเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.5) ตามวิธีการเลี้ยงในข้อ 2.3.2.6 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว ใช้อัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ทำการเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-15.3 รูปที่ 3-35,3-36 3-37จากผลการทดลองพบว่าความสามารถ ในการเจริญและการผลิตกรดมะนาว ของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 นั้นดีกว่าการผลิตกรดมะนาวโดยการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนที่ผ่านมาทั้ง 2 เกณฑ์ คือได้ปริมาณกรดมะนาวที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมง ได้ 100.65 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดในถังหมักเท่ากับ 2,314.95 กรัม แต่ถึงอย่างไรก็ยังน้อยกว่าการผลิตกรดมะนาวโดยใช้ภาวะการหมักเหมือนกับถังหมักขนาด 5 ลิตร จากรูปที่ 3-37 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ($Y_{p/s}$) ซึ่งเป็นเวลาเดียวกันกับที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดเช่นกัน($Y_{p/x}$) สำหรับเวลาที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ได้สูงสุดคือ ที่ 12 ชั่วโมงของการหมัก ($Y_{x/s}$) นอกจากนี้เมื่อมาพิจารณาปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักพบว่าค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีค่าไม่ต่ำกว่าค่าวิกฤตของเชื้อ คือต่ำกว่า 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่

ตารางที่ 3-15.3 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด - ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s , Yx/s ,Y p/x และ Y'p/s , Y'x/s ,Y' p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 30 ลิตร กำหนดให้ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรของน้ำหมักของถังหมักขนาด 30 ลิตรและ 5 ลิตรมีค่าเท่ากัน

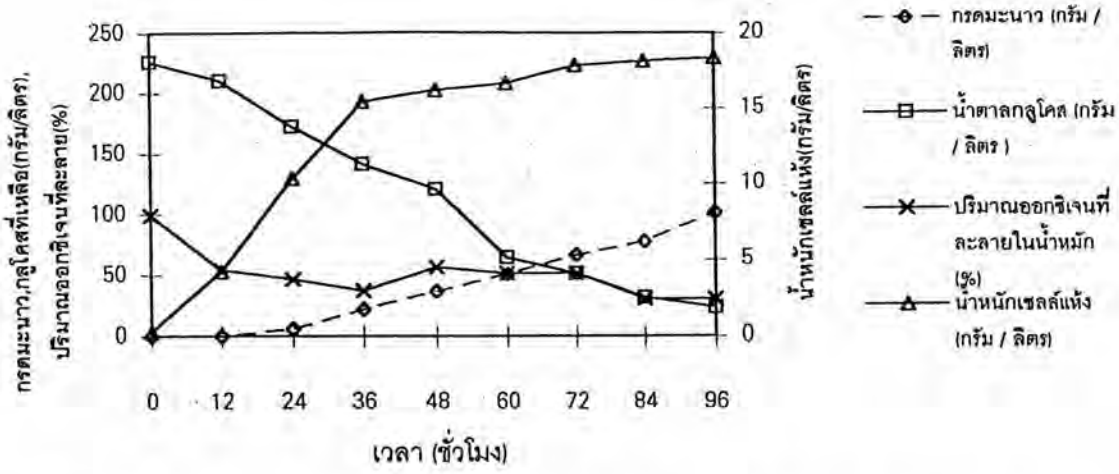
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรั /ลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)	Y p/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	4.71	0.24	0.00	0.00	225.60	0.00	99	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.03	4.20	0.00	0.00	21.00	0.00	54	0.000	0.256	0.000	0.000	0.256	0.000
24	5.04	10.32	5.64	-	172.20	-	46	0.106	0.189	0.558	0.000	0.162	0.000
36	5.02	15.40	21.33	-	141.20	-	37	0.253	0.179	1.404	0.506	0.164	3.080
48	5.02	16.16	36.46	5.87	102.40	-	56	0.296	0.129	2.286	0.727	0.037	19.908
60	5.01	16.64	50.21	6.75	64.00	7.47	51	0.311	0.102	3.056	0.242	0.009	28.645
72	5.01	17.80	65.96	7.98	50.90	8.26	51	0.377	0.101	3.750	1.021	0.089	13.578
84	5.01	18.12	77.96	8.47	30.80	9.13	30	0.397	0.092	4.318	0.565	0.016	35.531
96	5.03	18.34	100.65	11.28	22.90	9.79	30	0.496	0.089	5.552	2.952	0.028	106.000

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 23 ลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 2,314.95 กรัม

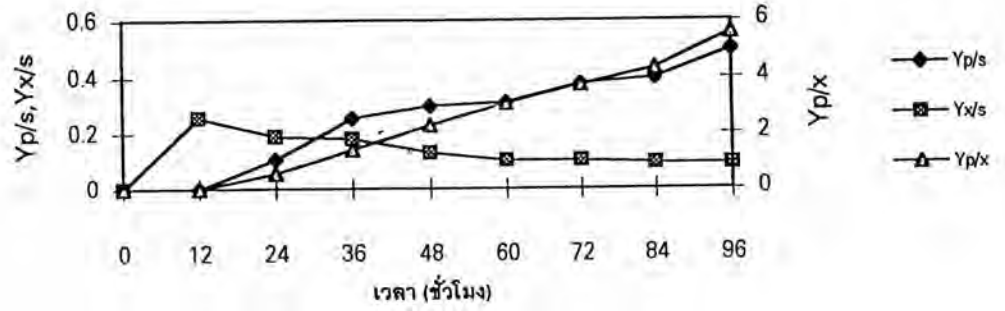
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถ คำนวณผลได้จากการวิเคราะห์โดย HPLC

Yp/s , Yx/s ,Y p/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

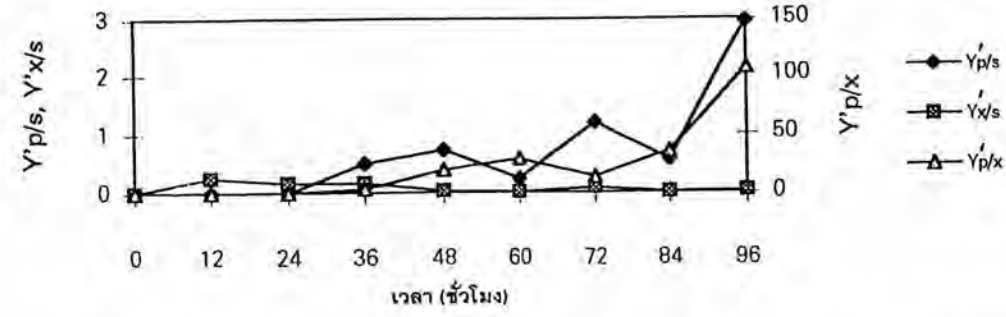
Y'p/s , Y'x/s ,Y' p/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-35 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อกำหนดให้ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักของถังหมักขนาด 30 ลิตรเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 3-36 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อกำหนดให้ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรของน้ำหมักของถังหมักขนาด30ลิตรเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร



รูปที่ 3-37 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อกำหนดให้ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรของน้ำหมักของถังหมักขนาด30ลิตรเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ทำให้ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของภาวะการผลิตนี้ดีกว่าภาวะที่ทำการกำหนดเกณฑ์ให้คงที่ดังที่ผ่านมา นอกจากนี้ยังไม่มีปัญหาเรื่องความหนืดเกิดขึ้นระหว่างการหมักอีกด้วย

จากผลการทดลองการผลิตกรดมะนาวโดยกำหนดให้ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักของถังหมักขนาด 30 ลิตรมีค่าเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้นพบว่า ทำให้ความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 นั้นดีกว่าการกำหนดเกณฑ์การผลิตที่ผ่านมาทั้ง 2 เกณฑ์ แต่ถึงอย่างไรปริมาณกรดมะนาวที่ได้ก็ยังต่ำกว่าการผลิตกรดมะนาวโดยใช้ภาวะการหมักเหมือนกับ 5 ลิตร แสดงว่าเกณฑ์ที่กำหนดในการขยายส่วนการผลิตดังภาวะข้างต้นยังไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาดใหญ่ต่อไป ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงทำการศึกษาเกณฑ์การขยายส่วนใหม่ โดยจะกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน (K_La) ของถังหมักขนาด 30 ลิตรเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.15.4 การผลิตกรดมะนาวเมื่อกำหนดให้สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (K_La) ของถังหมักขนาด 30 ลิตรและถังหมักขนาด 5 ลิตร มีค่าเท่ากัน

การกำหนดค่า สัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน (K_La) ในถังหมักขนาด 30 ลิตรให้มีค่าเท่ากันกับ ถังหมักขนาด 5 ลิตร จำเป็นต้องหาค่า Parameter constant คือ α และ β ดังนั้นในการหาค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน (K_La) และ Parameter constant (α และ β) สามารถหาได้โดยวิธี Dynamic measurement (หาทั้งในระดับ 5 ลิตรและ 30 ลิตร) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.3.2 5 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ใช้อัตราการกวนเริ่มต้นที่ 400 รอบต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการหมักจนไปถึงชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่เชื้อใช้ปริมาณออกซิเจนมากที่สุด ปิดการให้อากาศ บันทึกปริมาณออกซิเจนที่ละลายโดยใช้หัววัดออกซิเจน (dissolved oxygen probe) จากนั้นทำการปรับภาวะการหมักโดยให้อัตราการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที และ 600 รอบต่อนาที และทำการปิดเปิดอากาศ พร้อมบันทึกปริมาณออกซิเจนที่ละลาย จากนั้นปรับอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ทำตามวิธีดังข้างต้น โดยใช้อัตราการกวนเป็น 400, 500 และ 600 ตามลำดับ จากนั้นนำค่าออกซิเจนที่บันทึกได้ไปคำนวนค่า สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนที่ภาวะต่าง ๆ จากภาคผนวก ช ในตารางที่ 1, 2,3 และรูปที่ 1, 2,3 เป็นค่าบันทึกออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักหลัง

การปิดและเปิดอากาศ ของถังหมักขนาด 5 ลิตร และ ตารางที่ 10, 11; 12 รูปที่ 4,5,6 เป็นค่าบันทึกออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักหลังการปิดและเปิดอากาศของถังหมักขนาด 30 ลิตร จากสมการที่ 18 ภาคผนวก ช ทำการคำนวนค่า ($C_{Lf} - C_{L0}$) / ($t_f - t_0$) และ $\int C_L\, dt$ (พื้นที่ใต้กราฟหลังจากเริ่มพ่นอากาศ) คำนวนได้ดังตารางที่ 4,5,6 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และตารางที่ 13,14,15 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร จากนั้นทำการเขียนกราฟระหว่าง ค่า ($C_{Lf} - C_{L0}$) / ($t_f - t_0$) ให้เป็นแกนตั้ง และ ค่า $\int C_L\, dt$ ให้เป็นแกนนอน จะได้ความชัน = $- K_La$ / ($t_f - t_0$) ตามสมการที่ 18 ในภาคผนวก ช ดังนั้นทำให้ได้ค่า K_La และ ln K_La ของถังหมักขนาด 5 ลิตรที่อัตราการกวนต่าง ๆ ตามตารางที่ 7 และ ของถังหมักขนาด 30 ลิตร ที่อัตราการกวนต่าง ๆ ตามตารางที่ 16 จากนั้นหาค่า α โดยเขียนกราฟ ระหว่าง ln K_La ให้เป็นแกนตั้ง และ lnNi (ค่าอัตราการกวนที่ความเร็วรอบต่าง ๆ) เป็นแกนนอน ตามตารางที่ 8 และ 17 ซึ่งได้เท่ากับ 3.87 และ 0.70 ของถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 30 ลิตรตามลำดับ ส่วนค่า β ทำการเขียนกราฟระหว่าง ln K_La เป็นแกนตั้ง และ ln V_s (ค่าอัตราการให้อากาศ) เป็นแกนนอน ตามตารางที่ 9 และ 18 ได้ค่าเท่ากับ 0.936 และ 0.043 ของถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 30 ลิตรตามลำดับ และจากสมการที่ 16 ทำการหาค่า K ของถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 30 ลิตร ทำให้ได้ค่า K ของถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 30 ลิตร เท่ากันและทำการคำนวณอัตราการกวนที่ใช้เมื่อกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนคงที่ได้เท่ากับ 1148 รอบต่อนาที (แสดงในภาคผนวก ช)

จากการหาค่า α และ β ในถังหมักขนาด 5 ลิตรและ 30 ลิตร และนำมาคำนวณหาค่าอัตราการกวนเพื่อใช้ในการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร พบว่าต้องใช้อัตราการกวนเท่ากับ 1148 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 30 ลิตร จึงจะทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนของถังหมักขนาด 5 ลิตร เท่ากับสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนในถังหมักขนาด 30 ลิตร แต่เนื่องจากอัตราการกวนที่ใช้ในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตรนั้นสูงเกินไป ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว อีกทั้งการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตรมีขีดจำกัดเกี่ยวกับความสามารถในการกวนสูงสุดได้เพียง 1000 รอบต่อนาที เราจึงไม่สามารถทำการผลิตกรดมะนาวเมื่อให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเป็นเกณฑ์ในการขยายส่วนได้ จากการทดลองโดยใช้เกณฑ์การขยายส่วนที่ผ่านมาพบว่า ไม่มีเกณฑ์ใดสามารถใช้กำหนดเป็นเกณฑ์ในการขยายส่วนการผลิตกรดมะนาวได้ แต่ที่ภาวะการหมักเหมือนการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร คือใช้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าภาวะอื่น ๆ ถึงอย่างไรการใช้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที ตลอดการทดลองก็ยังเป็นภาวะไม่เหมาะสมเพราะเนื่องจากเป็นภาวะการที่รุนแรง ซึ่งอาจ

เกิดความเสียหายต่อถังหมักได้เช่นกันเมื่อนำภาวะการหมักนี้ไปทำการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงทำการศึกษาโดยใช้ภาวะการหมักเหมือนกับถังหมักระดับ 5 ลิตร โดยจะพิจารณาเพิ่มเติมถึงปัจจัยร่วมอื่น ๆ ต่อไป

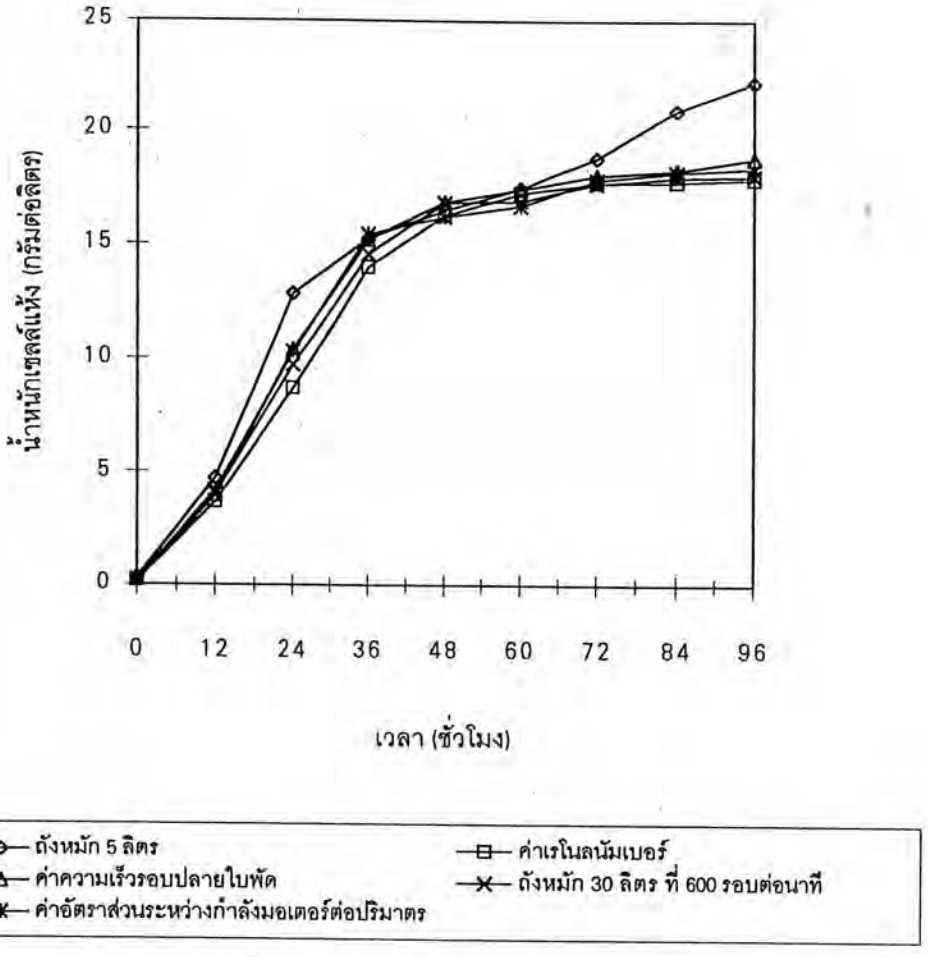
3.16 การเปรียบเทียบผลการทดลองเมื่อกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนในถังหมักขนาด 30 ลิตรให้คงที่

ทำการเปรียบเทียบ น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ปริมาณกรดมะนาว และค่าทางจลนพลศาสตร์ ของการหมัก ในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อกำหนดให้เกณฑ์การขยายส่วนต่าง ๆ คงที่ และ เมื่อทำการผลิตที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที กับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากตารางที่ 3.16.1 และรูปที่ 3-38 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งของการผลิตในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อมีการกำหนดให้เกณฑ์ค่าความเร็วรอบปลายใบพัด ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักเป็นค่าคงที่ และกำหนดให้ภาวะการหมักเหมือนการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้น จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่ำกว่าการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ส่วนการกำหนดเกณฑ์ให้ค่าเรโนลนัมเบอร์เป็นค่าคงที่นั้นจะให้น้ำหนักเซลล์ต่ำกว่าทุก ๆ ภาวะของการผลิต

ตารางที่ 3-16.1 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร กับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตกรดมะนาว โดยทำการผลิตที่มีการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนให้คงที่ และ ภาวะการหมักเหมือนการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)				
	เรโนลนัมเบอร์	ความเร็วรอบของปลายใบพัด	อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร	ทำการหมักในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อภาวะเหมือนถังหมักขนาด 5 ลิตร	การผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร
0	0.22	0.23	0.24	0.21	0.35
12	3.65	3.96	4.20	4.08	4.72
24	8.70	10.44	10.32	9.72	12.88
36	14.0	15.16	15.40	14.56	15.24
48	16.20	16.84	16.16	16.76	16.44
60	17.20	17.40	16.64	16.88	17.44
72	17.65	18.01	17.80	17.61	18.76
84	17.70	18.22	18.12	17.92	20.92
96	17.85	18.75	18.34	18.01	22.18

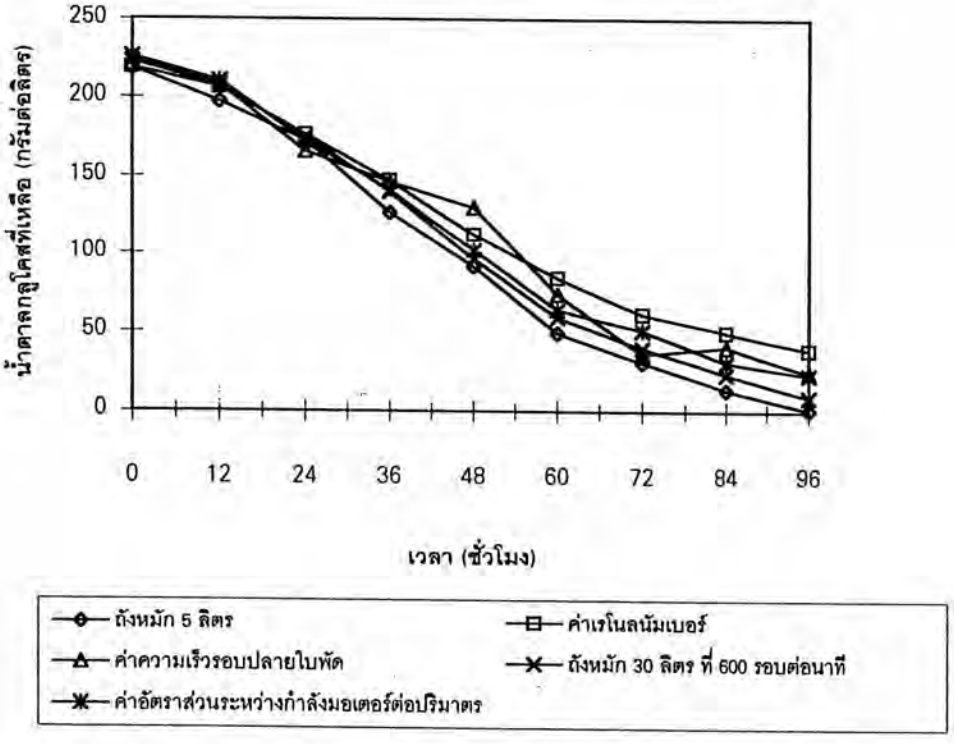


รูปที่ 3-38 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร กับ การผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตกรดมะนาว เมื่อมีการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วน และภาวะการผลิตเหมือนในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากตารางที่ 3-16.2 และรูปที่ 3-39 แสดงการเปรียบเทียบน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในถังหมัก พบว่า การหมักในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อมีการกำหนดให้เกณฑ์ ค่าความเร็วรอบปลายใบพัด ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก ค่าเรโนลนัมเบอร์ให้เป็นค่าคงที่ และกำหนดให้ภาวะการหมักเหมือนในถังหมักขนาด 5 ลิตร นั้น จะมีการใช้น้ำตาลกลูโคสช้ากว่าการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยที่การกำหนดให้เกณฑ์ค่าเรโนลนัมเบอร์เป็นค่าคงที่จะเป็นภาวะที่เชื้อมีการใช้น้ำตาลช้ากว่าทุก ๆ ภาวะ

ตารางที่ 3-16.2 การเปรียบเทียบน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร กับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตกรดมะนาว โดยทำการผลิตที่มีการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนให้คงที่ และ ภาวะการหมักเหมือนการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)				
	เรโนลนัมเบอร์	ความเร็วรอบของปลายใบพัด	อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร	ทำการหมักในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อภาวะเหมือนถังหมักขนาด 5 ลิตร	การผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร
0	219.00	225.30	225.60	222.70	218.24
12	206.00	207.60	210.00	207.50	197.12
24	176.00	165.60	172.20	174.90	172.48
36	146.90	146.20	141.20	131.80	126.72
48	112.60	130.20	102.40	96.50	91.52
60	84.00	74.00	64.00	59.30	49.28
72	61.25	36.20	50.90	39.70	30.80
84	49.78	40.50	30.80	23.40	13.64
96	38.53	24.20	22.90	9.20	1.32

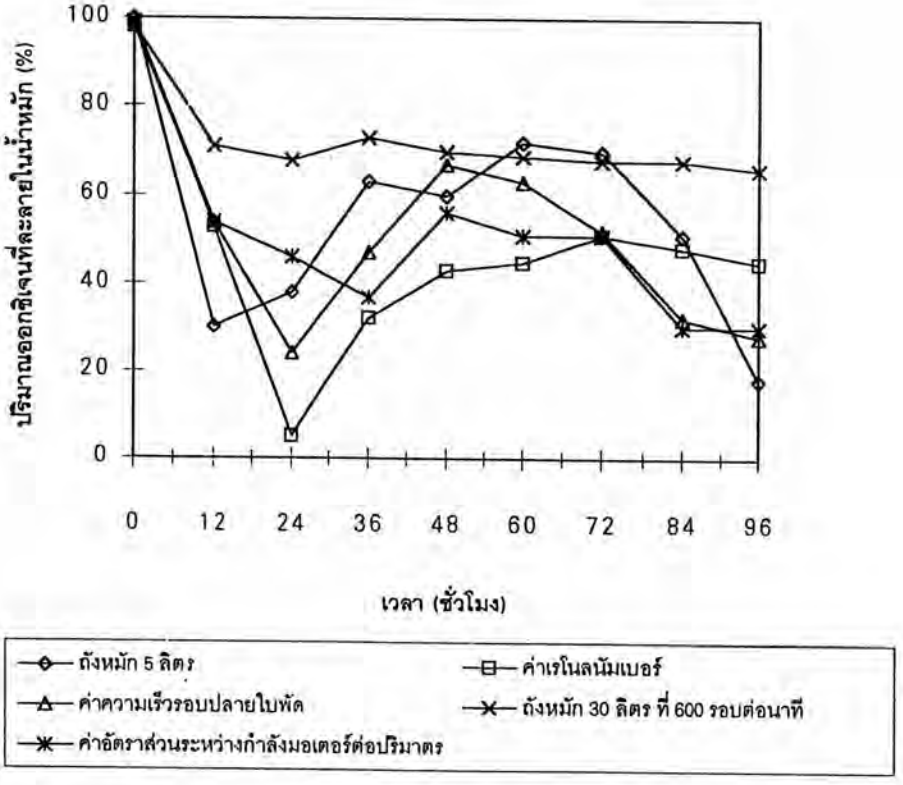


รูปที่ 3-39 การเปรียบเทียบน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร กับ การผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตรเพื่อผลิตกรดมะนาว เมื่อมีการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วน และภาวะการผลิตเหมือนในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากตารางที่ 3.16.3 และรูปที่ 3.40 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักพบว่าที่ภาวะต่าง ๆ ของการหมักปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่ การผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร จะลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 12 ซึ่งจะมีค่าเท่ากับ 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว และเมื่อกำหนดให้การหมักในถังหมักขนาด 30 ลิตรมีค่าเรโนลนัมเบอร์คงที่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 5 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวซึ่งต่ำกว่าทุก ๆ ภาวะของการหมัก และจากนั้นปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และจะลดลงในช่วงท้าย ๆ ของการหมักในทุก ๆ ภาวะของการหมักซึ่งเป็นผลมาจาก ช่วงระยะเวลาท้าย ของการหมักน้ำหมักเริ่ม ข้น และหนืด จึงส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักนั้นน้อยลงนั้นเอง

ตารางที่ 3-16.3 การเปรียบเทียบปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร กับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตกรดมะนาว โดยทำการผลิตที่มีการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนให้คงที่ และ ภาวะการหมักเหมือนการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)				
	เรโนลนัมเบอร์	ความเร็วรอบของปลายใบพัด	อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร	ทำการหมักในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อภาวะเหมือนถังหมักขนาด 5 ลิตร	การผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร
0	99	98	99	98	100
12	53	54	54	71	30
24	5	24	46	68	38
36	32	47	37	73	63
48	43	67	56	70	60
60	45	63	51	69	72
72	51	52	51	68	70
84	48	32	30	68	51
96	45	28	30	66	18

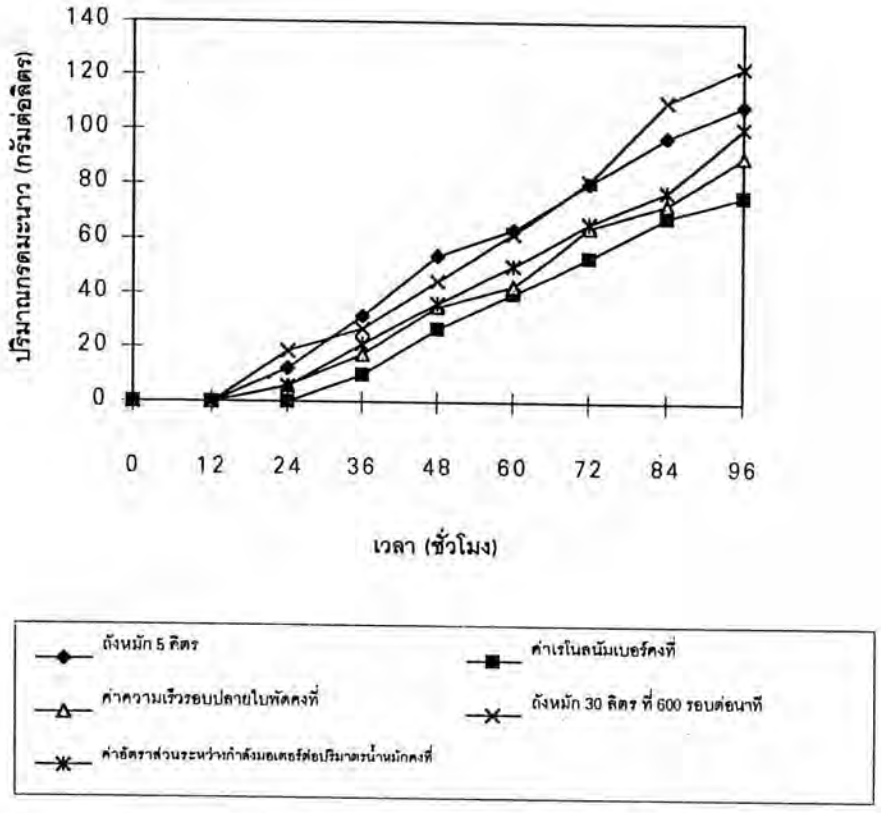


รูปที่ 3-40 การเปรียบเทียบปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร กับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตกรดมะนาว เมื่อมีการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วน และภาวะการผลิตเหมือนในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 3-16.4 และรูปที่ 3-41 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) พบว่าเมื่อกำหนดให้การหมักในถังหมักขนาด 30 ลิตร มีค่าเรโนลนัมเบอร์เป็นค่าคงที่ ปริมาณกรดมะนาวที่ได้นั้นต่ำกว่าทุก ๆ ภาวะการหมัก โดยได้เท่ากับ 75.5 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ส่วนการกำหนดให้ค่า ความเร็วรอบปลายใบพัด ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก และภาวะการหมักที่เหมือนกับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตรจะให้ปริมาณกรดมะนาวในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักเป็น 90.26 , 100.65 และ 123 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร จะให้ปริมาณกรดมะนาวเป็น 108.97 กรัมต่อลิตร จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าภาวะการหมักที่เหมือนกับการหมักของถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้ให้ปริมาณกรดมะนาวสูงที่สุด

ตารางที่ 3-16.4 การเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร กับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตรเพื่อผลิตกรดมะนาว โดยทำการผลิตที่มีการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนให้คงที่ และ ภาวะการหมักเหมือนการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)				
	เรโนลนัมเบอร์	ความเร็วรอบของปลายใบพัด	อัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร	ทำการหมักในถังหมักขนาด 30 ลิตรเมื่อภาวะเหมือนถังหมักขนาด 5 ลิตร	การผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24	0.00	5.90	5.64	18.34	12.08
36	10.00	17.44	21.33	26.70	31.45
48	26.70	35.00	36.46	44.53	53.95
60	39.90	42.73	50.21	61.77	63.45
72	53.40	64.18	65.96	81.26	80.39
84	68.20	72.45	77.33	110.60	97.14
96	75.50	90.26	100.65	123.00	108.97



รูปที่ 3-41 การเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร กับ การผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตกรดมะนาว เมื่อมีการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วน และภาวะการผลิตเหมือนในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการเปรียบเทียบทั้งหมดพบว่า เมื่อกำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์คงที่ ค่าความเร็วรอบของปลายใบพัดคงที่ และ ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักคงที่ จะให้ปริมาณกรดมะนาวในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักนั้นต่ำกว่าการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร ส่วนภาวะการหมักที่เหมือนในการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร จะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงกว่าภาวะการหมักอื่น ๆ สำหรับภาวะการหมักที่กำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์คงที่จะให้ปริมาณกรดมะนาวต่ำที่สุด เมื่อมาพิจารณาปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักพบว่า ภาวะการหมักที่กำหนดให้ค่า เรโนลนัมเบอร์คงที่ จะมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักต่ำสุดเป็น 5 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว ซึ่งต่ำกว่าทุกๆ ภาวะเช่นกัน จึงอาจเป็นเหตุให้ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวนั้นต่ำได้ เนื่องจากเมื่อมาพิจารณาการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดมะนาวจะมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ต่ำสุดถึง 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว และจากนั้นปริมาณออกซิเจนจะเพิ่มขึ้น การที่ภาวะการหมักที่กำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์เป็นค่าคงที่มีปริมาณออกซิเจนละลายได้ต่ำดังกล่าวเป็นผลมาจากการที่ใช้ความเร็วรอบของการกวนที่ไม่เหมาะสมคือใช้เพียง 300 รอบต่อนาทีในการกำหนด 100 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว ในขณะที่การผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตรใช้ความเร็วรอบถึง 600 รอบต่อนาทีนั้นเอง นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ต่ำสุดของการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวยังเป็นตัวบอกจุดวิกฤตของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักของเชื้อได้ ดังนั้นการที่ภาวะการหมักที่มีการกำหนดค่าเรโนลนัมเบอร์เป็นค่าคงที่ ได้ให้ค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักต่ำสุดเป็น 5 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว จึงเป็นค่าที่ต่ำกว่าจุดวิกฤตของเชื้อ ซึ่งทำให้ความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวต่ำดังกล่าวและเมื่อมาพิจารณาค่าทางจลนพลศาสตร์ในตารางที่ 3.16.5 พบว่าภาวะการหมักของถังหมักขนาด 30 ลิตรที่เหมือนกับถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้ค่าทางจลนพลศาสตร์ต่าง ๆ ในระดับที่ใกล้เคียงและมีบางค่าที่ค่อนข้างสูงกว่าการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ ค่าอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าเท่ากับ 0.0208 ชั่วโมง $^{-1}$ ซึ่งมีค่าเท่ากับการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร และเมื่อมาพิจารณาอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อไปสร้างเซลล์ (Yx/s) จะมีความสามารถในการสร้างเซลล์ได้ต่ำกว่าถังหมักขนาด 5 ลิตร คือมีค่า 0.83 (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลกลูโคส) แต่การใช้น้ำตาลเพื่อไปสร้างผลิตภัณฑ์ (Yp/s) จะให้ค่ามากกว่าการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ 0.576 (กรัมซิตริกต่อกรัมน้ำตาลกลูโคส) นอกจากนี้อัตราการผลิตกรดมะนาวนั้นก็มีค่ามากกว่าคือ 1.28 (กรัมซิตริกต่อลิตรต่อชั่วโมง) ซึ่งใน

ตารางที่ 3-16.5 การเปรียบเทียบค่าทางจลนพลศาสตร์ การผลิตกรดมะนาวโดย *Candida olephila* C-73 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร กับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อทำการผลิตที่กำหนดเกณฑ์การขยายส่วนต่าง ๆ ให้คงที่

ภาวะการหมักต่าง ๆ					
ค่าทางจลนพลศาสตร์	ค่า N_{Re} ใช้ความเร็วรอบ 300	ค่า π_{ndi} ใช้ความเร็วรอบ 400	ค่าPg /V ใช้ความเร็ว 500	ทำการหมักในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อภาวะเหมือนถังหมักขนาด 5 ลิตร	การหมักในถังหมัก 5 ลิตร
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) (hr^{-1})	0.0203	0.0208	0.0203	0.0208	0.0208
Biomass yield (Yx/s) (g cell /g glucose)	0.097	0.092	0.089	0.083	0.101
Product yield (Yp/s) (gCA/ g total glucose)	0.418	0.448	0.496	0.576	0.502
productivity (gCA / l / hr.)	0.786	0.940	1.048	1.28	1.135

หมายเหตุ สำหรับเกณฑ์การขยายส่วนการผลิตโดยกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนในถังหมักขนาด 30 ลิตรเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้นไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากผลของคำนวนความเร็วรอบการกวนนั้นสูงเกินไป

การเปรียบเทียบค่าทางจลนพลศาสตร์ที่เกิดขึ้นในการผลิตกรดมะนาวนั้นทำเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาพฤติกรรม และการเปลี่ยนแปลงของเชื้อขณะทำการหมักในภาวะต่าง ๆ

จากการเปรียบเทียบค่าต่าง ๆ เมื่อทำการผลิตกรดมะนาวโดยกำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์ ค่าความเร็วรอบของปลายใบพัดคงที่ ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักให้คงที่ รวมทั้งการกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนให้คงที่ ไม่สามารถกำหนดเป็นเกณฑ์ในการขยายส่วนได้เนื่องจากให้ปริมาณกรดมะนาวที่ค่อนข้างต่ำ อีกทั้งยังส่งผลของปัญหาความหนืดเกิดขึ้นระหว่างการหมักด้วย ส่วนการหมักภายใต้ภาวะที่เหมือนกับถังหมักขนาด 5 ลิตรในการผลิตในถังหมักขนาด 30 ลิตร ได้ให้ปริมาณกรดมะนาวที่ค่อนข้างสูงกว่าการหมักในภาวะอื่น ๆ รวมทั้งสูงกว่าการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตรด้วย ดังนั้นที่ภาวะนี้น่าจะเป็นภาวะที่เหมาะสมในการขยายส่วน แต่เมื่อมาพิจารณาถึงภาวะที่เราจะนำไปทำการขยายส่วนการผลิตเป็น 300 ลิตร พบว่าการใช้ความเร็วรอบการกวนถึง 600 รอบต่อนาทีตลอดการทดลองเหมือนการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 30 ลิตรนั้น เป็นภาวะที่ค่อนข้างรุนแรงมากซึ่งอาจจะส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อถังหมักได้ เนื่องจากในการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนนั้นเราจะต้องคำนึงให้ภาวะการผลิตเหมาะสมทั้งทางกายภาพ และทางชีวภาพ ดังนั้นด้วยเหตุนี้ในการทดลองต่อไปจะทำการศึกษาการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร โดยอาศัยภาวะเหมือนการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร และจะพิจารณาถึงปัจจัยอื่น ๆ ต่อไปเพื่อให้ได้ภาวะการผลิตกรดมะนาวที่เหมาะสมต่อการผลิตในระดับขยายส่วน

3.17 การผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* C-73 เมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เนื่องจากการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนต่าง ๆ ในการทดลองที่ 3.15 นั้นไม่สามารถใช้ กำหนดเป็นเกณฑ์ในการขยายส่วนการผลิตกรดมะนาวได้ แต่ที่ภาวะการหมักเหมือนการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามผลการทดลองที่ 3.14 คือใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าภาวะการผลิตอื่น ๆ แต่เนื่องจากภาวะการผลิตนี้เป็นสภาพการหมักที่ค่อนข้างรุนแรงดังนั้นจึงเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมเช่นกันเมื่อนำไปขยายส่วน ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงทำการพิจารณาปัจจัยในส่วนอื่น ๆ เพิ่มเติม เมื่อมาพิจารณาภาวะการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร จะเห็นได้ว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีความสำคัญ โดยเฉพาะในชั่วโมงที่ 12 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะลดลงต่ำสุดแล้วจึงเพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักในปริมาณที่ต่ำ

สุดนี้มีค่าเท่ากับ 30 % ที่ซึ่งปริมาณออกซิเจนนี้น่าจะเป็นค่าที่พอเพียงต่อความต้องการของเชื้อที่สำหรับใช้ในการผลิตกรดมะนาวแล้ว เนื่องจากเมื่อทำการเลี้ยงต่อไปปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะสูงขึ้นจนสิ้นสุดการหมัก ดังนั้นในการทดลองนี้จะทำการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวเมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการเลี้ยงไป 12 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.8) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.5 ของการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดมะนาว ในระดับ ถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อัตราการกวนเริ่มต้น 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยงไป 12 ชั่วโมง ทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักให้ได้ 30% โดยควบคุมอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนเป็นไปตามอัตโนมัติ ทำการเก็บตัวอย่าง ทุกๆ 12 ชั่วโมงจนถึง 96 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-17 รูปที่ 3-42-,3-43,3-44 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 18.00 กรัมต่อลิตร ที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมง ในระหว่างการหมักเชื้อจะผลิตกรดมะนาวหลังจาก 12 ชั่วโมง และปริมาณกรดมะนาวจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนได้ประมาณ 107.10 กรัมต่อลิตร ที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมง คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดในถังหมักเท่ากับ 358.78 กรัม ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกรดมะนาวนี้สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป พบว่าที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักนั้นเหลือน้ำตาลกลูโคส 2.60 กรัมต่อลิตร สำหรับอัตราส่วนระหว่างกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริกนั้นพบว่าจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ เช่นกัน จากรูปที่ 3-44 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ($Y_{p/s}$) ซึ่งเป็นเวลาเดียวกันกับที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดเช่นกัน($Y_{p/x}$)สำหรับเวลาที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ได้สูงสุดเคือ ที่ 24 ชั่วโมงของการหมัก ($Y_{x/s}$)

จากผลการทดลองเมื่อมาเปรียบเทียบกับการทดลองที่ 3.12 ที่ภาวะการผลิตเหมือนกันแต่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักพบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จะน้อยกว่าโดยน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากผลการทดลองที่3.12 จะเท่ากับ 22.18 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกรดมะนาวที่ได้นั้นพบว่าใกล้เคียงกันกับผลการทดลองที่ 3.12 ซึ่งได้กรดมะนาวเท่ากับ 108.97 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดในถังหมักเท่ากับ 359.60กรัมต่อลิตร แต่เนื่องจากการทดลองนี้ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง จึงเป็นเหตุทำให้หลังจากหมักไป 12 ชั่วโมง อัตราการกวนจะลดลงจาก 600 รอบต่อนาทีนั้น เหลือประมาณ 400 รอบต่อนาที ซึ่งทำให้สามารถลดพลังงานในการผลิตลงไปได้มาก

ตารางที่ 3-17 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s Yx/s Yp/x และ Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร กำหนดให้ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง

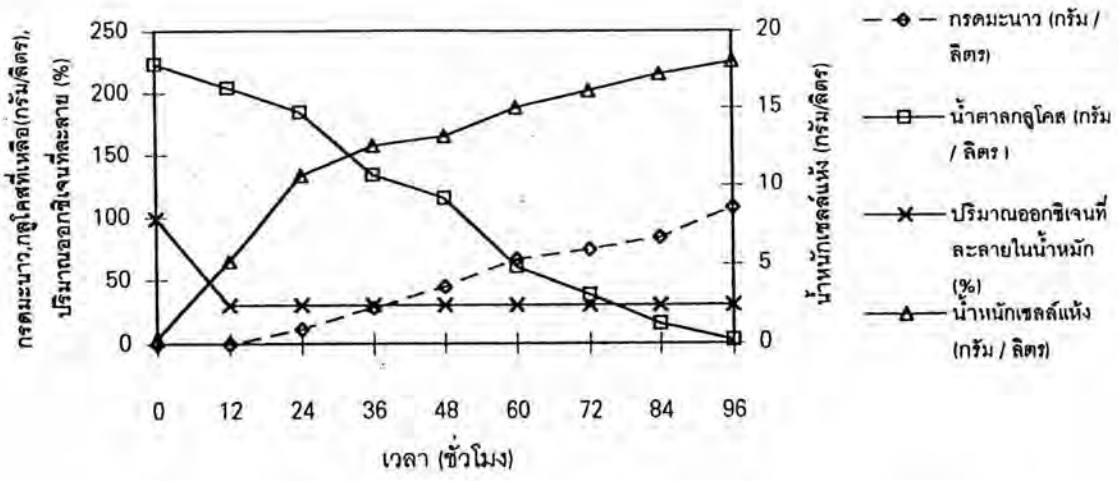
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรมะนาวต่อไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	Yp/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	4.85	0.31	0.00	0.00	0.00	99	223.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.23	5.20	0.00	0.00	0.00	30	204.00	0.000	0.257	0.000	0.000	0.257	0.000
24	5.68	10.64	11.17	-	-	30	184.00	0.286	0.265	1.081	0.000	0.272	0.000
36	5.15	12.56	28.13	6.27	4.48	30	133.60	0.315	0.137	2.296	0.337	0.038	8.833
48	5.12	13.20	44.56	7.85	5.76	30	114.80	0.412	0.119	3.456	0.874	0.034	25.672
60	5.14	15.00	66.20	10.00	6.62	30	60.20	0.406	0.090	4.506	0.396	0.033	12.022
72	5.13	16.10	74.10	11.13	6.65	30	37.80	0.400	0.085	4.692	0.353	0.049	7.182
84	5.15	17.20	83.50	12.12	6.89	30	15.10	0.402	0.081	4.940	0.414	0.048	8.545
96	5.01	18.00	107.10	15.50	6.90	30	2.60	0.486	0.080	6.054	1.888	0.064	29.500

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,350 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดประมาณ 358.78 กรัม

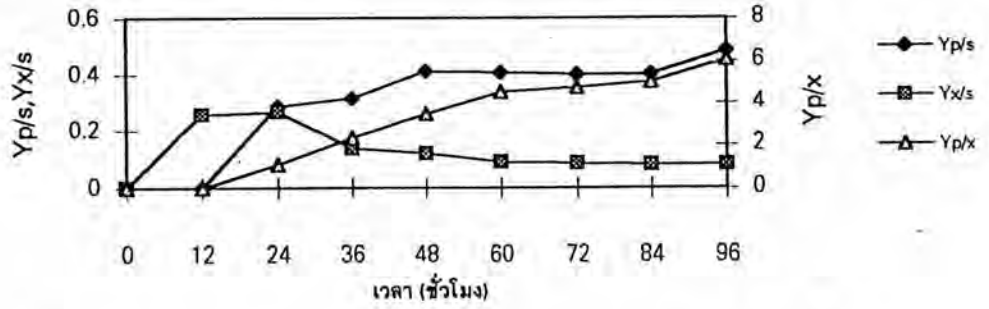
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณผลได้จากการวิเคราะห์ โดย HPLC

Yp/s Yx/s Yp/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

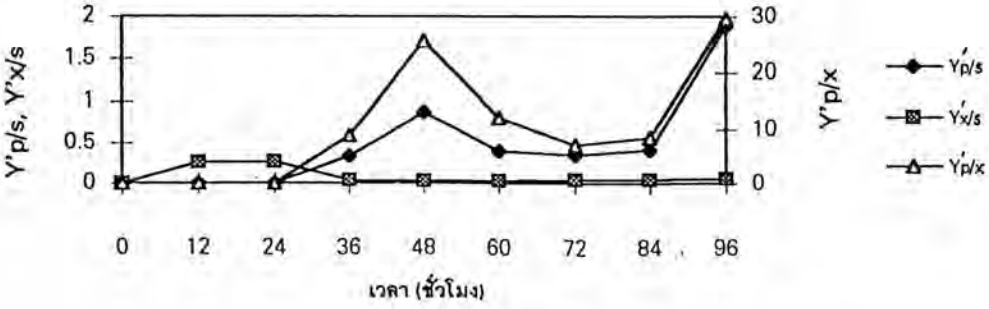
Y'p/s Y'x/s Y'p/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ.ที่เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-42 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง



รูปที่ 3-43 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง



รูปที่ 3-44 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง

และนอกจากนี้ภาวะดังกล่าวยังเป็นภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาดใหญ่ได้อีกด้วย เนื่องจากเป็นภาวะการหมักที่ไม่รุนแรงจึงไม่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อถังหมักขนาดใหญ่ได้

3.18 การผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* C-73 เมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 23 % และ 15 % ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากผลการทดลองที่ 3.17 พบว่าภาวะการผลิตกรดมะนาวที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง ทำให้ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 นั้นดีใกล้เคียงกับภาวะการหมักที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน นอกจากนี้ภาวะดังกล่าวยังสามารถลดพลังงานการผลิตกรดมะนาวได้มากอีกด้วย จากการทดลองที่ 3.15.4 ของการผลิตกรดมะนาวเมื่อกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนมีค่าเท่ากันจำเป็นต้องหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนโดยวิธี Dynamic measurement ดังในภาคผนวก ง รูปที่ 1, 2, 3 ซึ่งเป็นรูปแสดงการบันทึกปริมาณออกซิเจนที่ละลายเมื่อปิดและเปิดอากาศ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในชั่วโมงที่ 12 พบว่า หลังจากเราปิดอากาศรอให้อากาศลดลงมาถึงประมาณ 30 % เราจะรีบทำการเปิดอากาศเข้าไปทันที เนื่องจากที่ 30% เป็นค่าวิกฤตของเชื้อ ซึ่งถ้าเราปล่อยให้ต่ำกว่านี้อากาศอาจไม่พอเพียงต่อการเจริญของเชื้อและอาจส่งผลให้การหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนนั้นคลาดเคลื่อนไปได้ แต่พบว่าหลังจากที่เราเปิดอากาศเข้าไปแล้วเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักยังคงลดลงมาเรื่อย ๆ จนถึงค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักประมาณ 15 % แล้วจึงค่อย ๆ เพิ่มขึ้นไป ซึ่งปรากฏการณ์เช่นนี้จะเกิดเฉพาะการหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรเท่านั้น ณ. ปรากฏการณ์นี้เองในการทดลองต่อมาจึงทำการทดลองผลิตกรดมะนาวเมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15% ซึ่งเป็นค่าที่ลดลงต่ำสุดหลังจากทำการเปิดอากาศดังในการทดลองที่ 3.15.4 ของการหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนดัง ที่กล่าวมา และ ทำการทดลองผลิตกรดมะนาวเมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 23 % คือเป็นค่าระหว่าง 30% และ 15% ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ดังนั้นจึงทำการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก2.8) ตามวิธีการเลี้ยงในข้อ 2.3.2.5 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวโดยใช้ภาวะการหมักเหมือนกับการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือใช้ความเร็วรอบเริ่มต้น

600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยงไป 12 ชั่วโมงทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักให้ได้ 23 % และ 15 % โดยควบคุมอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศเป็นไปโดยอัตโนมัติ ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-18.1 ,3-18.2 รูปที่ 3-45,3-46,3-47,3-48,3-49,3-50จากผลการทดลองพบว่าการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักให้เป็น 23% และ 15 % นั้นจะให้ปริมาณกรดมะนาวค่อนข้างต่ำ โดยปริมาณกรดมะนาวที่ได้เมื่อภาวะการหมักมีการควบคุม ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15 % ได้ 62.54 กรัมต่อลิตร เมื่อระยะการหมักผ่านไป 96 ชั่วโมง คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดเท่ากับ 203.25 กรัม ส่วนภาวะการหมักมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 23 % ได้กรดมะนาวเท่ากับ 90.46 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดเท่ากับ 298.5 กรัม ซึ่งปริมาณกรดมะนาวที่ได้นั้นถึงจะมากกว่า ภาวะการหมักที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 15% แต่ถึงอย่าไรก็ยังน้อยกว่าภาวะที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30%นั้นเอง สำหรับการเจริญของเซลล์นั้นพบว่า ภาวะของการหมักที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 15 % การเจริญของเซลล์นั้นต่ำมาก โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 13.10 กรัมต่อลิตรที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมง และเหลือน้ำตาลกลูโคสถึง 34.5 กรัมต่อลิตร สำหรับอัตราส่วนระหว่างกรดมะนาวต่อ กรดไอโซซิตริกนั้นพบว่าสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อระยะการหมักนานขึ้น ทั้งในภาวะการหมักที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 15 % และ 23% จากรูปที่ 3-47 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 84 ของการหมัก (Y'p/s) และเวลาที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก('Yp/x) สำหรับเวลาที่น้ำตาลกลูโคสสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ได้สูงสุดคือเวลาที่ 12 ชั่วโมงของการหมัก (Y'x/s) ส่วนรูปที่ 3-50 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก (Y'p/s) เวลาที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก(Y'p/x) สำหรับเวลาที่น้ำตาลกลูโคสสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ได้สูงสุดคือเวลาที่ 24 ชั่วโมงของการหมัก (Y'x/s)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการผลิตกรดมะนาวที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15 % และ 23 % นั้นทำให้ความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวนั้นต่ำลงไป ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากปริมาณออกซิเจนที่เราทำการควบคุมตลอดการทดลองนั้นต่ำเกินไปกว่าค่าวิกฤตของเชื้อจึงทำให้เชื้อใช้อากาศสำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึมได้อย่างไม่เต็มที่ จึงทำให้กิจกรรมของเซลล์นั้นลดลงคือได้ส่งผลให้ความสามารถ

ตารางที่3- 18.1 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s Yx/s Yp/x และ Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร กำหนดให้ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมักเป็น 23% หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรมะนาวต่อไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	Yp/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	4.88	0.32	0.00	0.00	0.00	99	225.20	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.01	4.84	0.00	0.00	0.00	23	210.00	0.000	0.297	0.000	0.000	0.297	0.000
24	5.04	11.42	8.79	-	-	23	186.00	0.224	0.283	0.791	0.000	0.274	0.000
36	5.05	14.97	28.37	5.56	5.10	23	152.20	0.388	0.200	1.936	0.579	0.105	2.698
48	5.04	17.20	44.83	6.77	6.62	23	99.70	0.357	0.134	2.655	0.314	0.042	7.381
60	5.03	18.20	57.73	8.13	7.10	23	63.40	0.358	0.110	3.228	0.355	0.028	12.900
72	5.01	18.64	72.29	9.57	7.55	23	47.50	0.406	0.103	3.943	0.916	0.028	33.090
84	5.03	19.10	85.61	10.67	8.02	23	33.70	0.447	0.098	4.558	0.965	0.033	28.956
96	5.03	19.42	90.46	11.03	8.20	23	23.20	0.448	0.094	4.736	0.462	0.030	15.156

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,300 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดประมาณ 298.5 กรัม

หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวนผลได้จากการวิเคราะห์ โดย HPLC

Yp/s Yx/s Yp/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

Y'p/s Y'x/s Y'p/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. ที่เวลาการหมักนั้น (instantaneous)

ตารางที่ 3-18.2 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s Yx/s Yp/x และ และ Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร กำหนดให้ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมักเป็น 15% หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง

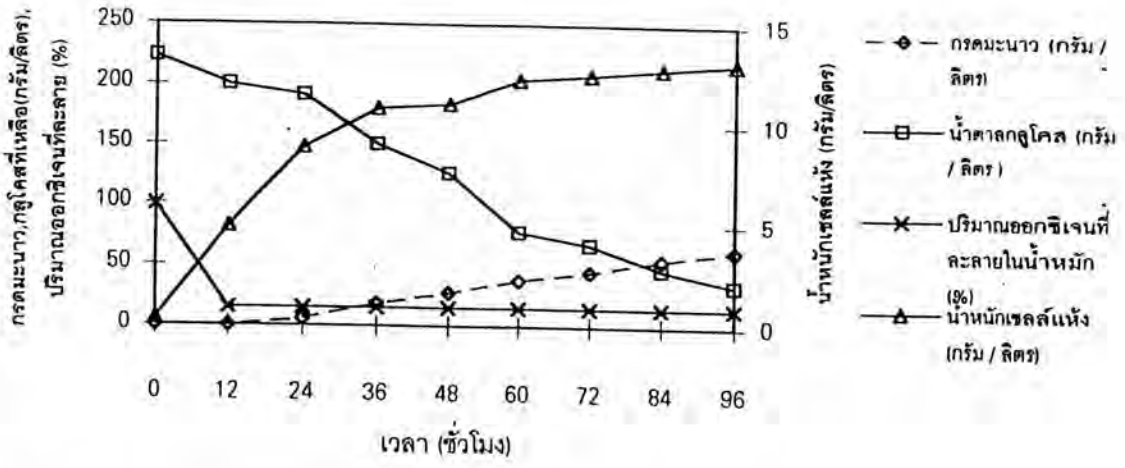
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัมลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	Yp/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	4.75	0.34	0.00	0.00	0.00	99	223.00	0	0	0	0.000	0.000	0.000
12	5.00	4.88	0.00	0.00	0.00	15	200.00	0	0.197	0	0.000	0.197	0.000
24	5.14	8.84	5.53	-	-	15	191.00	0.172	0.164	0.650	0.000	0.414	0.000
36	5.15	10.76	18.52	6.55	2.83	15	150.00	0.253	0.141	1.777	0.317	0.046	6.766
48	5.16	11.00	27.50	6.70	4.10	15	126.00	0.283	0.109	2.579	0.374	0.077	37.417
60	5.17	12.24	37.90	7.21	5.26	15	77.50	0.260	0.081	3.184	0.214	0.026	8.387
72	5.16	12.48	45.31	7.56	5.99	15	67.30	0.291	0.077	3.732	0.726	0.024	30.875
84	5.16	12.81	55.57	10.13	5.48	15	47.30	0.316	0.070	4.456	0.513	0.017	31.091
96	5.16	13.10	62.54	10.53	5.94	15	34.50	0.331	0.067	4.901	0.545	0.023	24.034

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 3,250 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดประมาณ 203.25 กรัม

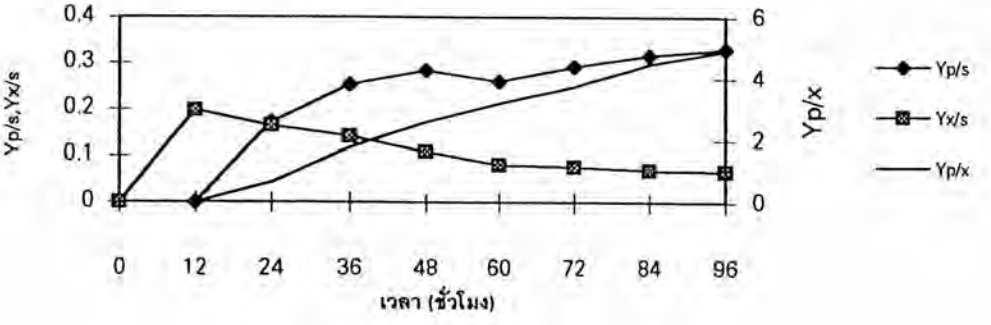
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณผลได้จากการวิเคราะห์ โดย HPLC

Yp/s Yx/sYp/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

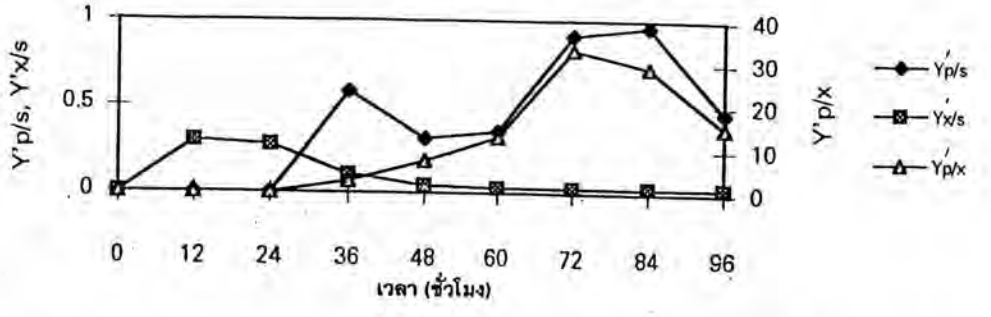
Y'p/s Y'x/sY'p/x คือ ค่าที่คำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. ที่เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



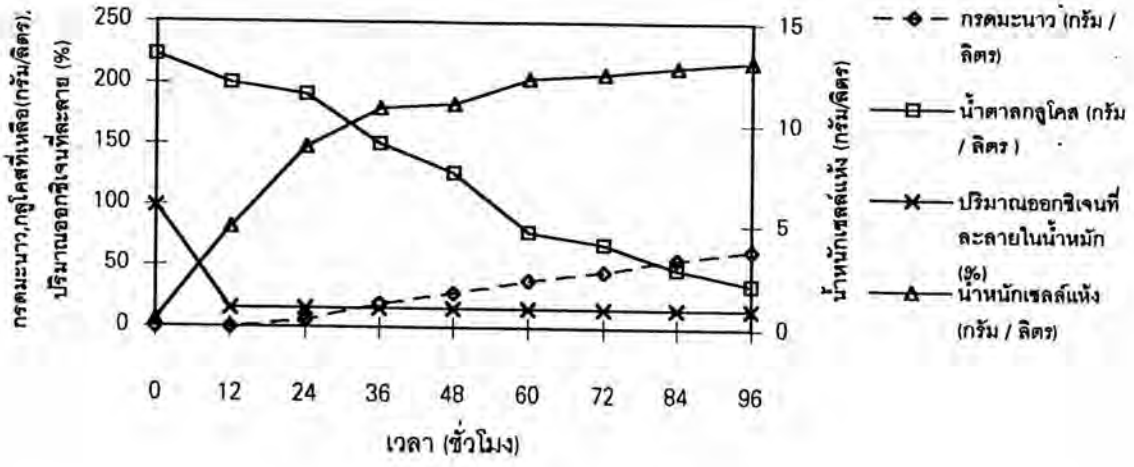
รูปที่ 3-45 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 23 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง



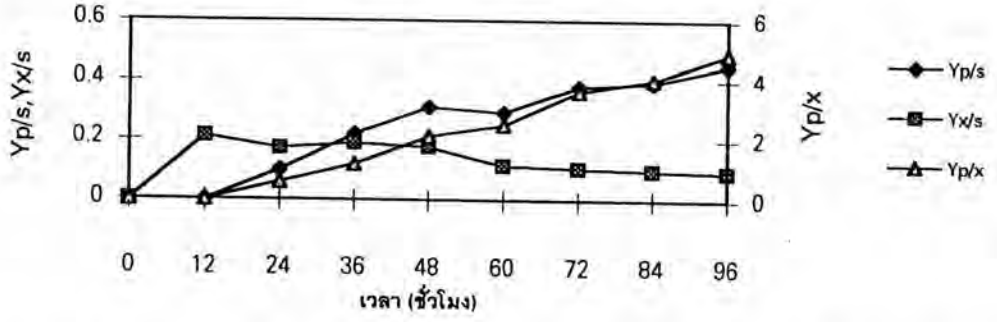
รูปที่ 3-46 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 23 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง



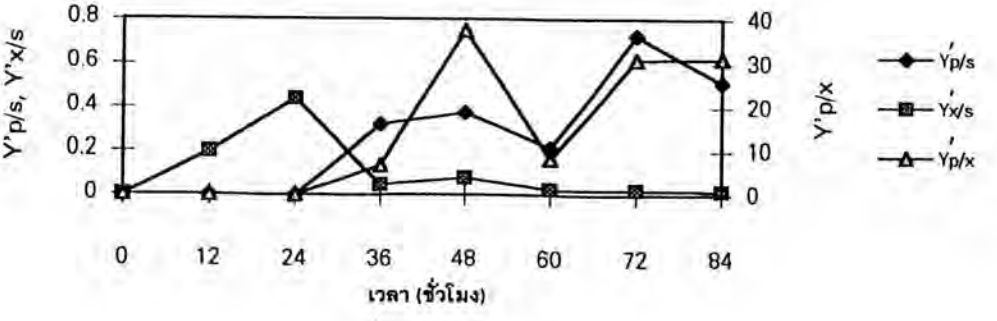
รูปที่ 3-47 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 23 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง



รูปที่ 3-48 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง



รูปที่ 3-49 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง



รูปที่ 3-50 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง

ในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวนั้นได้น้อย แต่เมื่อมาพิจารณาดูการทดลองที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 30 % นั้นไม่ได้ส่งผลให้ความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวนั้นต่ำลงไปเลยโดยเทียบกับการทดลองที่ไม่ได้มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทำการศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เมื่อทำการเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร ต่อไป

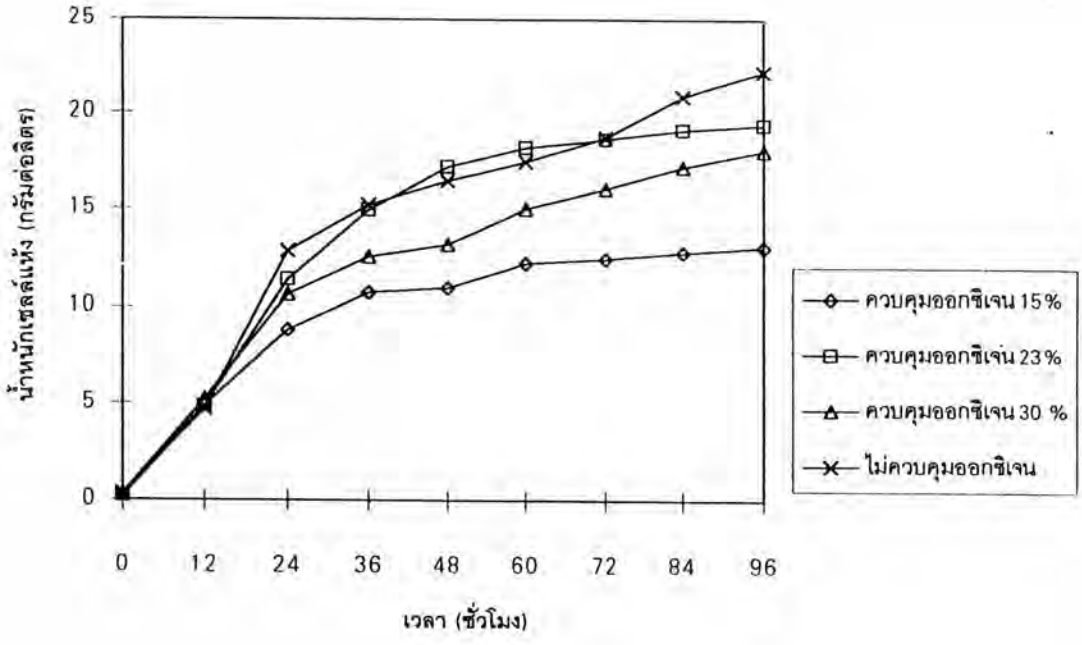
3.19 การเปรียบเทียบผลการทดลองเมื่อ มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ทำการเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ปริมาณกรดมะนาว และค่าทางจลนพลศาสตร์ ของการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนในถังหมักหลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง กับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน

จากตารางที่ 3-19.1 และรูปที่ 3-51 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15 % , 23 % และ 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง พบว่าทุก ๆ ภาวะจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่ำกว่าภาวะที่ไม่มีการควบคุม และภาวะที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่ำสุด คือ 13.10 กรัมต่อลิตร ส่วนภาวะที่ไม่ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 22.18 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3-19.1 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) เมื่อเลี้ยง *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตกรดมะนาว โดยมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง เป็น 15% ,23%และ 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว กับภาวะที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	ควบคุมออกซิเจน เป็น 15 %	ควบคุมออกซิเจน เป็น 23 %	ควบคุมออกซิเจน เป็น 30 %	ไม่ควบคุมออกซิเจน
0	0.34	0.32	0.31	0.35
12	4.08	4.84	5.20	4.72
24	8.84	11.42	10.64	12.88
36	10.76	14.99	12.56	15.24
48	11.00	17.20	13.20	16.44
60	12.24	18.20	15.00	17.44
72	12.48	18.64	16.10	18.76
84	12.81	19.10	17.20	20.92
96	13.10	19.42	18.00	22.18

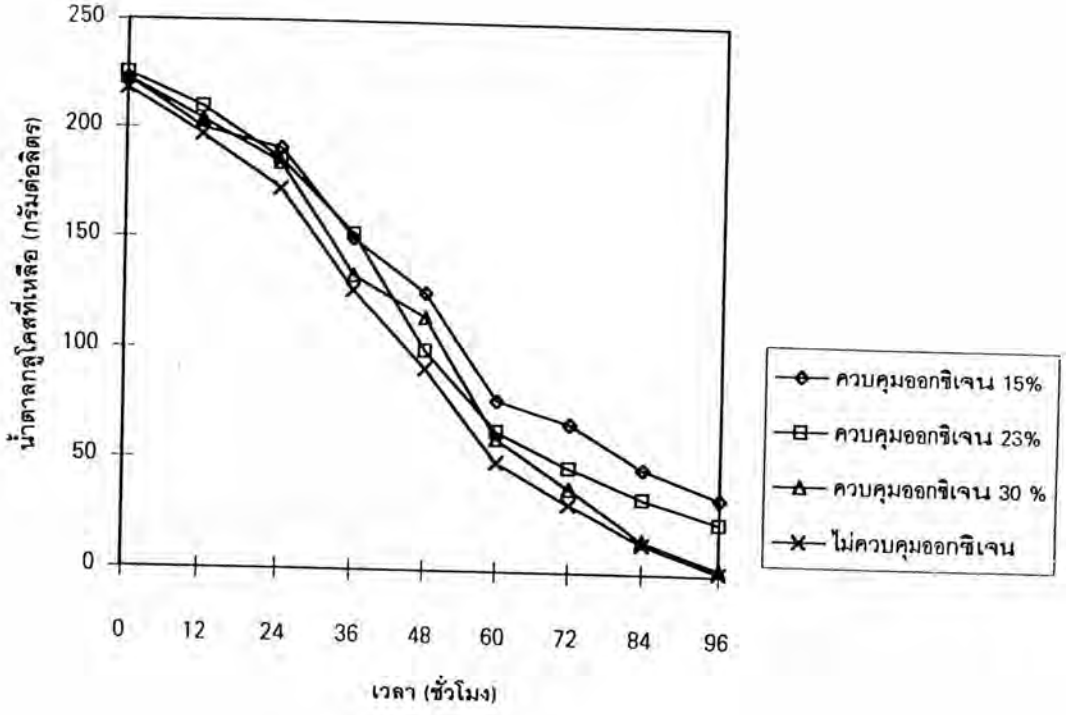


รูปที่ 3-51 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตกรดมะนาว เมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15%, 23% และ 30%กับการผลิตกรดมะนาวที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน

จากตารางที่ 3-19.2 และรูป 3-52 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ของการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนในถังหมักเป็น 15%,23%และ 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง พบว่า ทุกภาวะของการผลิตจะมีการใช้น้ำตาลกลูโคสช้ากว่า ภาวะการหมักที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนซึ่งในภาวะนี้จะเหลือน้ำตาลอยู่ 1.32 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ส่วนภาวะการหมักที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว ถึงการใช้น้ำตาลกลูโคสจะช้ากว่าด้วยแต่ก็ไม่มากนักคือเหลือน้ำตาลอยู่ 2.6 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ส่วนภาวะการหมักที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมักเป็น 15 % จะมีการใช้น้ำตาลช้าสุด โดยในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักจะเหลือน้ำตาลกลูโคสอยู่ถึง 34.5 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3-19.2 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) เมื่อเลี้ยง *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตกรดมะนาว โดยมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง เป็น 15% ,23%และ 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว กับภาวะที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก

เวลา **(ชั่วโมง)**	น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)			
	ควบคุมออกซิเจน เป็น 15 %	ควบคุมออกซิเจน เป็น 23 %	ควบคุมออกซิเจน เป็น 30 %	ไม่ควบคุมออกซิเจน
0	223.00	225.20	223.00	218.20
12	200.00	210.00	204.00	197.10
24	191.00	186.00	184.00	172.50
36	150.00	152.20	133.60	126.80
48	126.00	99.70	114.80	91.50
60	77.50	63.40	60.20	49.30
72	67.30	47.50	37.80	30.80
84	47.30	33.70	15.10	13.60
96	34.50	23.20	2.60	1.32

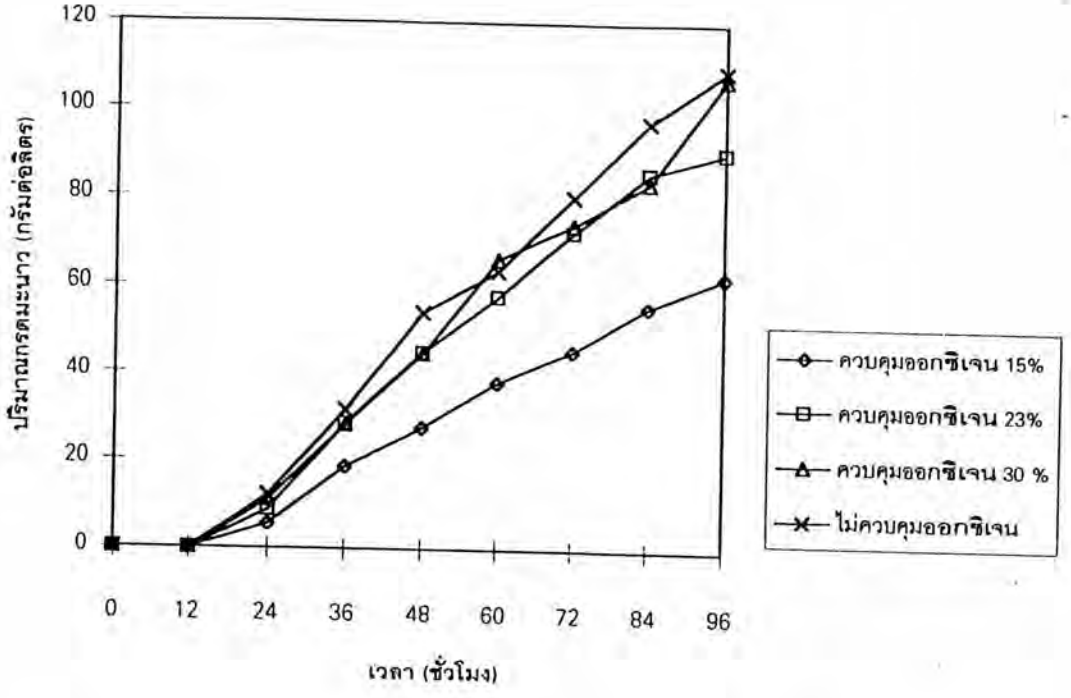


รูปที่ 3-52 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตกรดมะนาว เมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15%, 23% และ 30%กับการผลิตกรดมะนาวที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน

จากตารางที่ 3-19.3 และรูปที่ 3-53 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) ของภาวะการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อผลิตกรดมะนาวโดยมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15%,23%และ 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง พบว่า ภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 15% ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว จะให้ปริมาณกรดมะนาวต่ำกว่าทุกๆ ภาวะของการหมัก ส่วนภาวะการหมักที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนจะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดคือ 108.97 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงการหมักที่ 96 และภาวะที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 30% ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวจะให้ปริมาณกรดมะนาวนั้นใกล้เคียงกับภาวะที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน

ตารางที่ 3-19.3 การเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร) เมื่อเลี้ยง *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตกรดมะนาว โดยมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง เป็น 15% ,23%และ 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว กับภาวะที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก

เวลา (ชั่วโมง)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)			
	ควบคุมออกซิเจนเป็น 15 %	ควบคุมออกซิเจนเป็น 23 %	ควบคุมออกซิเจนเป็น 30 %	ไม่ควบคุมออกซิเจน
0	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.00	0.00	0.00	0.00
24	5.53	8.79	11.17	12.08
36	18.52	28.37	28.13	31.45
48	27.80	44.83	44.56	53.95
60	37.90	57.73	66.20	63.45
72	45.39	72.29	74.10	80.39
84	55.57	85.61	83.50	97.14
96	62.54	90.46	107.10	108.97



รูปที่ 3-53 การเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตกรดมะนาว เมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15%, 23% และ 30%กับการผลิตกรดมะนาวที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน

การหมักนั้นต่ำกว่าการผลิตในภาวะที่ไม่ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ส่วนภาวะการหมักที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวจะให้ปริมาณกรดมะนาวที่ใกล้เคียงกันกับภาวะที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน โดยที่ภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 15 % จะให้ปริมาณกรดมะนาวต่ำที่สุด สำหรับการเปรียบเทียบค่าทางจลนพลศาสตร์จากตารางที่ 3.19.4 พบว่าภาวะที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักได้ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะใกล้เคียงกับภาวะที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน คือ 0.0203 ชั่วโมง $^{-1}$ และ 0.0208 ชั่วโมง $^{-1}$ ในภาวะที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนส่วนค่าอัตราการใช้น้ำตาลเพื่อไปสร้างเซลล์ (Yx/s) และค่าการใช้น้ำตาลเพื่อไปสร้างผลิตภัณฑ์ (Yp/s) จะต่ำกว่าเล็กน้อยคือได้ 0.08 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลกลูโคสและ 0.486 กรัมกรดมะนาวต่อกรัมน้ำตาลกลูโคส ตามลำดับ นอกจากนี้ค่าอัตราการผลิตกรดมะนาวจะได้ใกล้เคียงกันคือ 1.12 กรัมกรดมะนาวต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนภาวะที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนนั้นได้ 1.135 กรัมกรดมะนาวต่อลิตรต่อชั่วโมง

จะเห็นได้ว่าการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว ตลอดการหมักหลังจากทำการหมักไปแล้ว 12 ชั่วโมงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำให้ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวนั้นได้ใกล้เคียงกับภาวะที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน และเมื่อมาพิจารณาค่าทางจลนพลศาสตร์แล้วพบว่าได้ให้ค่าใกล้เคียงเช่นกัน อีกทั้งภาวะการผลิตที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนให้เป็น 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวยังเป็นภาวะที่มีการกวนไม่รุนแรงเมื่อทำการขยายส่วนการผลิตให้ใหญ่ขึ้น เนื่องจากหลังจากที่ทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 30 % แล้ว ความเร็วรอบของการกวนจากที่เริ่มต้น 600 รอบต่อนาที จะลดเหลือประมาณ 300 รอบต่อนาที จึงทำให้สามารถลดพลังงานระหว่างทำการผลิตกรดมะนาวได้มากอีกด้วย ดังนั้นในการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนต่อไปจะกำหนดให้มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวตลอดหลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 3-19.4 การเปรียบเทียบค่าทางจลนพลศาสตร์ การผลิตกรดมะนาวโดย *Candida olephila* C-73 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรเมื่อทำการผลิตที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักหลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมงที่ ปริมาณต่าง ๆกับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ไม่ควบคุมปริมาณออกซิเจน

	ภาวะต่าง ๆ			
ค่าทางจลนพลศาสตร์	ควบคุมปริมาณออกซิเจน 15 %	ควบคุมปริมาณออกซิเจน 23 %	ควบคุมปริมาณออกซิเจน 30%	ไม่ควบคุมปริมาณออกซิเจน
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) (hr^{-1})	0.0199	0.0204	0.0203	0.0208
Biomass yield (Yx/s) (g cell /g glucose)	0.068	0.094	0.080	0.101
Product yield (Yp/s) (gCA/ g total glucose)	0.302	0.448	0.486	0.502
productivity (gCA / l / hr.)	0.651	0.942	1.12	1.135

3.20 การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ หมักเป็น 30 % ในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร

จากการทดลองที่ 3.17 พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักที่มีขนาดใหญ่คือ ภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงเลี้ยงเชื้อ *Candida olephila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.8) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.6 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว โดยใช้อัตราการกวนเริ่มต้น 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที และหลังจากทำการเลี้ยงไป 12 ชั่วโมง ทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักให้ได้ 30 % โดยการควบคุมอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศเป็นไปโดยอัตโนมัติ ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนถึง 96 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-20 รูปที่ 3-54,3-55 3-56 พบว่าในระหว่างการหมักเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 18.21 กรัมต่อลิตร ที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมง และปริมาณกรดมะนาวจะเริ่มผลิตหลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง โดยปริมาณกรดมะนาวที่ได้หลังจากทำการหมักไป 96 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 91.69 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดเท่ากับ 2, 292.2 กรัม ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกรดมะนาวนี้สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปพบว่าที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเหลือน้ำตาลกลูโคส 18.2 กรัมต่อลิตร สำหรับอัตราส่วนระหว่างกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริกพบว่าจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ เช่นกัน จากรูปที่ 3-56 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือชั่วโมงที่ 84 ของการหมัก ($Y_{p/s}$) ซึ่งเป็นเวลาเดียวกันกับที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุดเช่นกัน($Y_{p/x}$) สำหรับเวลาที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ได้สูงสุดคือที่ 12 ชั่วโมงของการหมัก ($Y_{x/s}$) นอกจากนี้ปัญหาความหนืดที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก ยังไม่เกิดขึ้นอีกด้วย

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การนำภาวะการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร (ดังในการทดลองที่ 3.17) ใช้ในการขยายส่วนการผลิตในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร เป็นภาวะที่เหมาะสม เนื่องจากภาวะดังกล่าวไม่ทำให้ความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวนั้นลดลงไป และเมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตกรดมะนาวกับภาวะการหมักต่าง ๆ ในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตรด้วยกันแล้วพบว่า ภาวะการผลิตในการทดลองนี้เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีกว่าการผลิตกรดมะนาวที่มีการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วน 2 เกณฑ์ด้วยกันคือ 1. กำหนดเกณฑ์การขยายส่วนโดยยึดค่าเรโนลนัมเบอร์คงที่ 2. กำหนดเกณฑ์การขยายส่วนโดยยึดค่าความเร็ว

ตารางที่ 3-20 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s Yx/s Yp/x และ Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร กำหนดให้ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมักเป็น 30% หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง

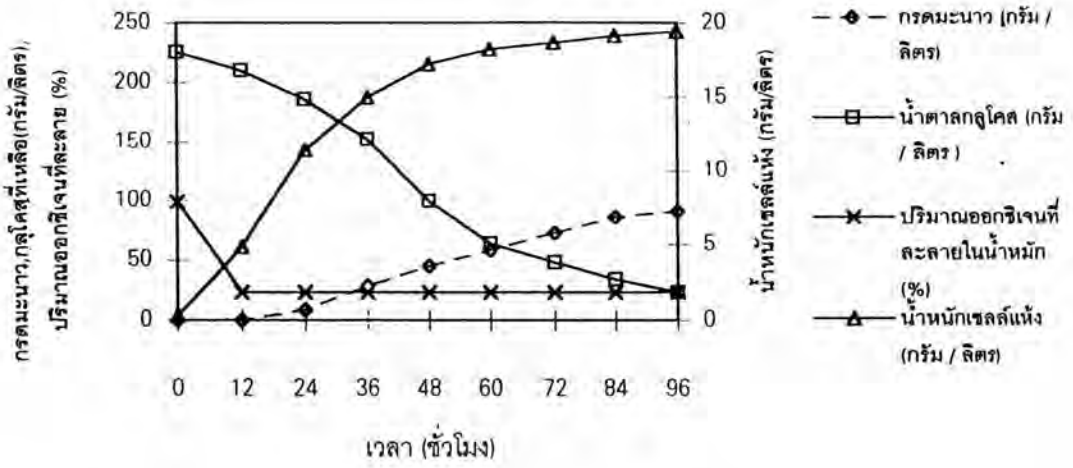
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	Yp/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	4.87	0.22	0.00	0.00	0.00	99	225.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.17	5.28	0.00	0.00	0.00	30	210.00	0.000	0.337	0.000	0.000	0.337	0.000
24	4.99	12.88	14.31	-	-	30	172.20	0.271	0.239	1.130	0.000	0.201	0.000
36	5.01	14.32	28.51	6.29	4.53	30	140.50	0.337	0.167	2.022	0.448	0.045	9.861
48	5.01	16.20	47.74	8.32	5.74	30	95.70	0.369	0.124	2.987	0.429	0.042	10.228
60	5.02	16.88	57.46	9.19	6.25	30	62.40	0.353	0.102	3.448	0.292	0.020	14.294
72	4.99	17.34	66.05	9.91	6.66	30	45.10	0.367	0.095	3.858	0.497	0.027	18.674
84	5.03	17.92	88.36	12.41	7.12	30	27.00	0.446	0.089	4.992	1.233	0.032	38.465
96	5.03	18.21	91.69	12.54	7.31	30	18.20	0.443	0.087	5.096	0.378	0.033	11.483

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 25.0 ลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดประมาณ 2,292.25 กรัม

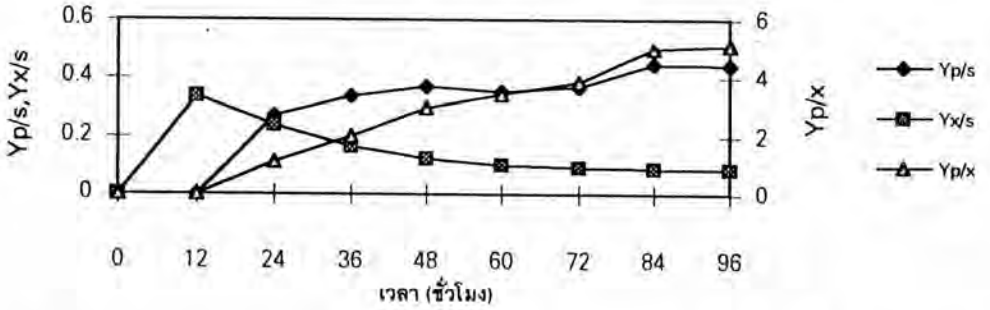
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณผลได้จากการวิเคราะห์ โดย HPLC

Yp/s Yx/s Yp/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งแต่ต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

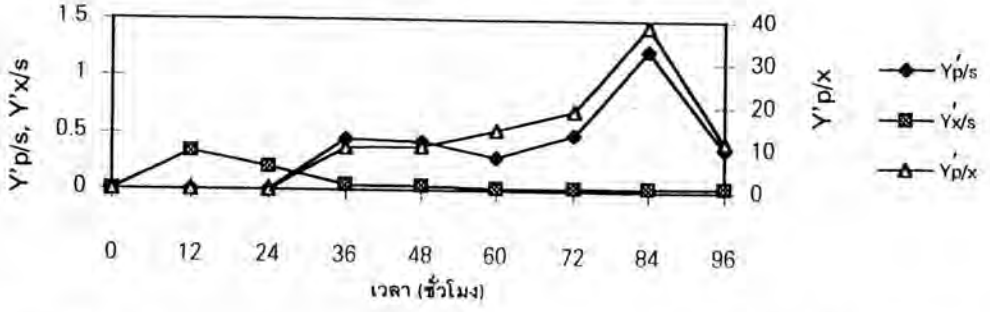
Y'p/s Y'x/s Y'p/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. ที่เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-54 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง



รูปที่ 3-55 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง



รูปที่ 3-56 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง

รอบปลายใบพัดคงที่ ส่วนการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนโดยยึดค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักคงที่ จะสามารถผลิตกรดมะนาวได้ใกล้เคียงกัน แต่ถึงอย่างไรความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของภาวะนี้ก็ยังต่ำกว่าภาวะการหมักที่เหมือนถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก และเมื่อมาพิจารณาถึงภาวะการผลิตที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาดใหญ่แล้ว พบว่าถึงการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร ที่มีภาวะการหมักเหมือนถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนจะให้ปริมาณกรดมะนาวที่ค่อนข้างสูง แต่ภาวะการหมักดังกล่าวเป็นภาวะการหมักที่ค่อนข้างรุนแรงคือใช้อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาทีตลอดการทดลอง ซึ่งอาจจะเกิดความเสียหายต่อถังหมักได้เมื่อมีการขยายส่วนการผลิตที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนการผลิตกรดมะนาวในภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไปแล้ว 12 ชั่วโมงนั้นถึงแม้ว่าทำให้ความสามารถผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อนั้นได้ไม่ดีกว่า แต่ถึงอย่างไรปริมาณกรดมะนาวที่ได้ก็ยังสูงกว่าภาวะการผลิตที่มีการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วน นอกจากนี้ภาวะการผลิตนี้เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวในระดับการผลิตที่ใหญ่ เนื่องจากหลังจากที่เราทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนให้ได้ 30 %หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมงแล้ว ทำให้อัตราการกวนจะลดลงจาก 600 รอบต่อนาที เหลือประมาณ 300 รอบต่อนาที ซึ่งอัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาทีเป็นสภาพการหมักที่ไม่รุนแรงจึงไม่ส่งผลเสียหายต่อถังหมักขนาดใหญ่ได้ อีกทั้งภาวะการผลิตนี้ยังสามารถลดพลังงานในการผลิตได้มากอีกด้วย

ดังนั้นจากการทดลองที่ผ่านมา พบว่าการเลือกภาวะการผลิตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักที่มีขนาดใหญ่ขึ้นนั้นควรจะพิจารณาถึงภาวะการหมักที่เหมาะสมทั้งทางชีวภาพ และทางกายภาพโดยพบว่า ภาวะการผลิตกรดมะนาวโดยการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง นั้นเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการขยายส่วนการผลิตทั้งทางกายภาพและชีวภาพ โดยที่ภาวะการผลิตนี้เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ในระดับที่น่าพอใจอีกทั้งภาวะการผลิตนี้ยังสามารถผลิตกรดมะนาวในระดับถังที่มีขนาดใหญ่ได้โดยไม่ส่งผลเสียหายต่อถังหมักด้วย

3.21 การหาอายุของเชื้อในถังหมักขนาด 30 ลิตรสำหรับการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 300 ลิตรของเชื้อ *Candida oleophila* C-73

การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 300 ลิตรนั้นจำเป็นต้องทำการเตรียมหัวเชื้อถึง 3 ขั้นตอน คือการใช้หัวเชื้อในขวดรูปชมพู่เป็นการเตรียมหัวเชื้อขั้นตอนที่ 1 โดยจะใช้อายุหัวเชื้อที่เวลา 9 ชั่วโมง ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ใช้อายุหัวเชื้อที่ 4 ชั่วโมงเป็นขั้นตอนที่ 2 และในถังหมักขนาด 30 ลิตร สำหรับเตรียมหัวเชื้อขั้นตอนที่ 3 ดังนั้นในการผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 300 ลิตร จึงต้องหาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 30 ลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก1.2)ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.3 ของการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดมะนาว ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมงนาน 14 ชั่วโมง โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งผลที่ได้แสดงดังในตารางที่ 3-21 รูปที่ 3 - 57

จากผลการทดลองเมื่อดูการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 พบว่ารูปแบบการเจริญในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อในระดับขวดเขย่า และ ระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรนอกจากนี้ พบว่าที่ชั่วโมงที่ 4 ได้ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือประมาณ 0.579 ชั่วโมง$^{-1}$ ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 2.53 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตร จะใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 4 ชั่วโมง ของการเตรียมหัวเชื้อในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร

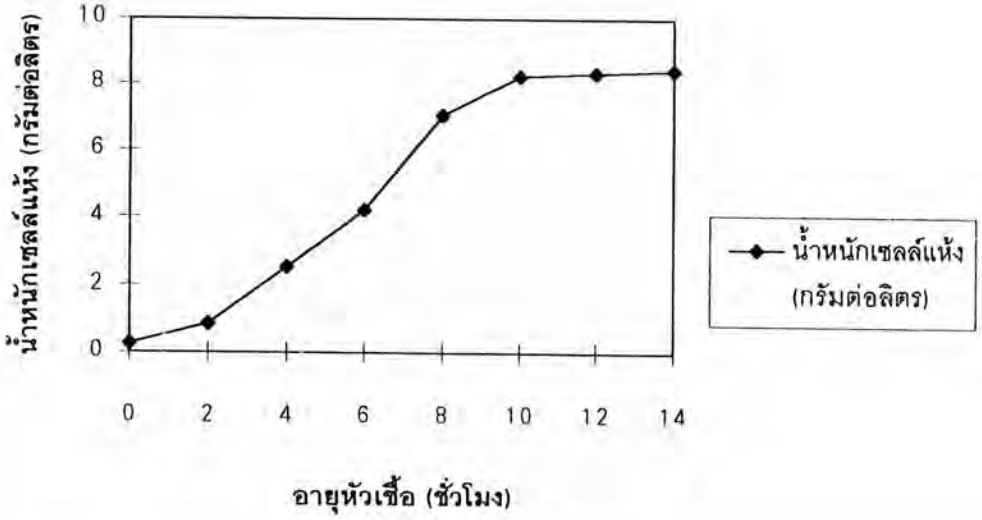
3.22 การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในถังหมักขนาด 300 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 %

จากการทดลองการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร พบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาดใหญ่คือการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีค่าประมาณ 30 % ตลอดการหมัก หลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ใช้อัตราการให้กวนเริ่มต้น 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยแคลเซียมออกไซด์โดยการเติมแบบอัตโนมัติไม่ให้มีค่าต่ำกว่า 5.00 ตลอดการทดลอง ดังนั้นจึงนำภาวะดังข้างต้นมาทำการผลิตกรดมะนาว ในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตร ต่อไป

ตารางที่ 3-21 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร เพื่อหาค่าอัตราการเจริญ เติบโตจำเพาะสูงสุด สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตรต่อไป

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (hr^{-1})
0	0.25	-**
2	0.77	0.509
4	2.53	0.533
6	4.19	0.247
8	7.05	0.254
10	8.24	0.077
12	8.34	0.012
14	8.44	0.0005

หมายเหตุ -** ไม่สามารถคำนวนได้เนื่องจากใช้ เป็นค่าอ้างอิง



รูปที่ 3-57 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร

เนื่องจากการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตร ถึงจะมีขีดจำกัดเกี่ยวกับความสามารถในการกวนสูงสุดได้ถึง 800 รอบต่อนาที แต่การใช้ความเร็วรอบเริ่มต้นเป็น 600 รอบต่อนาทีนั้นค่อนข้างเป็นภาวะที่รุนแรง ดังนั้นจึงทำการคำนวนความเร็วรอบเริ่มต้นใหม่ โดยในการคำนวนจะกำหนดให้อยู่ในรูปของอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรของน้ำหมักในถังหมักขนาด 300 ลิตร ให้เท่ากับถังหมักขนาด 5 ลิตร เนื่องจากการที่จะวัดกำลังมอเตอร์โดยตรงนั้นเป็นไปได้ยากเนื่องจากเราไม่มีอุปกรณ์พอเพียงที่จะวัดกำลังของเครื่องหมักได้ อีกทั้งค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก นั้นจะเปลี่ยนแปลงตามความเร็วรอบของการกวน ด้วยเหตุนี้จะได้ว่าความเร็วรอบเริ่มต้นของถังหมักระดับ 300 ลิตร ต้องใช้อัตราการกวนเริ่มต้นประมาณ 300 รอบต่อนาที (ตามภาคผนวก ฉ 2.2) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลี้ยง *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.8) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.7 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว โดยใช้อัตราการกวนเริ่มต้น 300 รอบต่อนาที หลังจากทำการหมัก 12 ชั่วโมง ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีค่าประมาณ 30 % ตลอดการหมัก ให้อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนถึง 96 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-22 รูปที่ 3-58, 3-59 3-60 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆจนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 20.46 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการหมักเชื้อจะเริ่มผลิตกรดมะนาวหลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง และปริมาณกรดมะนาวจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนได้ประมาณ 100.28 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดในถังเท่ากับ 23,064 กรัม ที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมง การเพิ่มขึ้นของกรดมะนาวนี้ได้สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ โดยที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเหลือน้ำตาลกลูโคส 15.0 กรัมต่อลิตร สำหรับอัตราส่วนระหว่างกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริกพบว่า มีค่าสูงขึ้นเรื่อย ๆ เช่นกัน จากรูปที่ 3-60 พบว่าความสามารถที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด คือ ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ($Y_{p/s}$) สำหรับเวลาที่เซลล์มีกิจกรรมในการสร้างกรดมะนาวได้สูงสุด คือชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ($Y_{p/x}$) สำหรับเวลาที่เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์ได้สูงสุดคือที่ 12 ชั่วโมงของการหมัก ($Y_{x/s}$) และพบว่าหลังจากที่เราควบคุมปริมาณออกซิเจนในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการเลี้ยงไป 12 ชั่วโมงแล้ว อัตราการกวนจะลดลงจาก 300 รอบต่อนาทีเหลือประมาณ 200 รอบต่อนาที ซึ่งสามารถทำให้เราลดพลังงานในการผลิตไปได้มาก นอกจากนี้ยังพบว่ายังไม่มีปัญหาเกี่ยวกับความหนืดเกิดขึ้นระหว่างทำการหมัก จึงทำให้การเก็บเกี่ยวผลผลิตนั้นเป็นไปได้ง่าย.

ตารางที่ 3-22 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า Yp/s Yx/sYp/x และY'p/sY'x/sY'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมัก ขนาด 300 ลิตร กำหนดให้ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมักเป็น 30% หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง

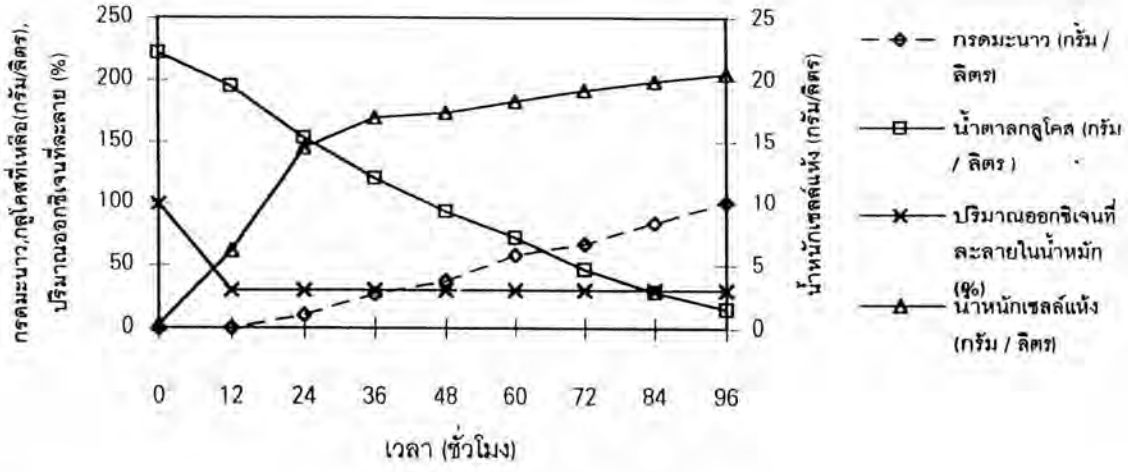
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัม/ลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อไอโซซิตริก	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)	กลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	Yp/s	Yx/s	Yp/x	Y'p/s	Y'x/s	Y'p/x
0	4.76	0.24	0.00	0.00	0.00	99	222.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	5.05	6.12	0.00	0.00	0.00	30	195.0	0.000	0.271	0.000	0.000	0.217	0.000
24	4.99	14.48	10.03	-	-	30	153.0	0.145	0.206	0.704	0.000	0.199	0.000
36	5.01	16.92	26.72	-	-	30	120.0	0.262	0.163	1.602	0.506	0.074	6.840
48	5.00	17.36	37.72	6.49	5.81	30	92.8	0.292	0.132	2.204	0.404	0.016	25.000
60	4.98	18.26	57.39	7.86	7.30	30	71.5	0.381	0.119	3.185	0.923	0.042	21.855
72	5.01	19.14	66.39	8.44	7.86	30	46.0	0.377	0.111	3.513	0.353	0.035	10.227
84	5.03	19.87	83.00	10.54	7.87	30	28.0	0.427	0.107	4.229	0.923	0.041	22.753
96	5.03	20.46	100.28	12.30	8.15	30	15.0	0.484	0.101	4.960	1.329	0.045	29.288

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังหมักประมาณ 230 ลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดประมาณ 23,064 กรัม

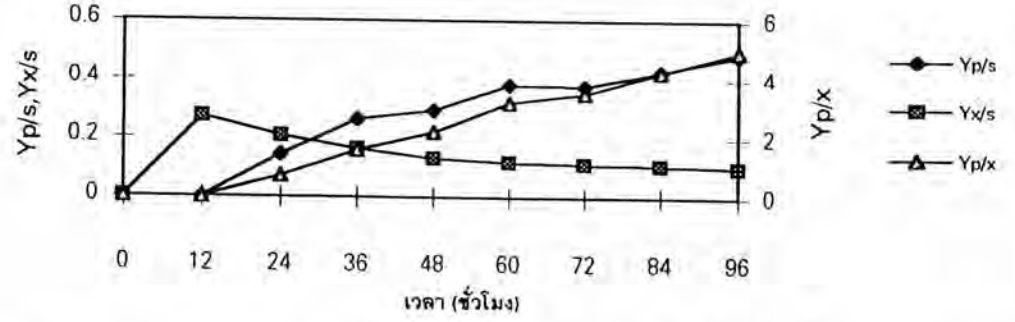
หมายเหตุ (-) หมายถึง ปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณผลได้จากการวิเคราะห์ โดย HPLC

Yp/s Yx/sYp/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์ที่คิดตั้งต้นจนถึงที่เวลาการหมักนั้น (average)

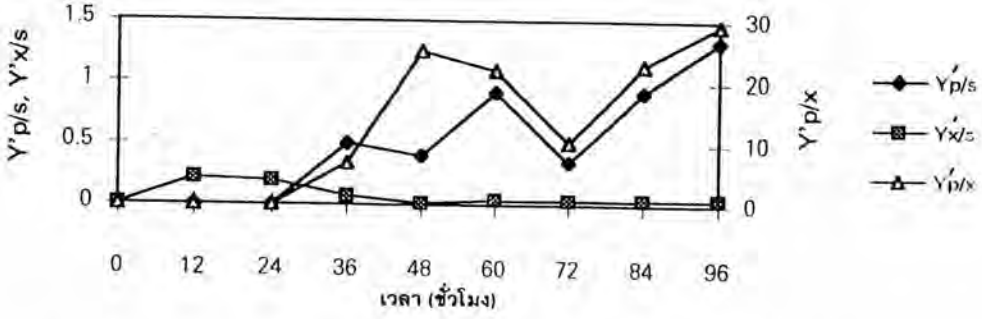
Y'p/s Y'x/sY'p/x คือ ค่าคำนวณทางจลนพลศาสตร์คิด ณ. ที่เวลาการหมักนั้น (instantaneous)



รูปที่ 3-58 ปริมาณกรดมะนาว น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 300 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง



รูปที่ 3-59 ค่า Yp/s Yx/s Yp/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 300 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง



รูปที่ 3-60 ค่า Y'p/s Y'x/s Y'p/x ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 300 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง

จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าการนำภาวะการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร คือภาวะที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง มาใช้ในการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 และ 300 ลิตรนั้น พบว่าทำให้ความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 3-23 จึงสามารถสรุปได้ว่าภาวะการผลิตกรดมะนาวดังข้างต้นสามารถที่จะนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการขยายส่วนการผลิตกรดมะนาวได้

ตารางที่ 3-23 การเปรียบเทียบค่าทางจลนพลศาสตร์เมื่อทำการหมักในถังหมักขนาด 300 ลิตร กับการหมักในถังหมักขนาด 30 ลิตร และ 5 ลิตร ที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมงที่อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

ค่าทางจลนพลศาสตร์	ถังหมักขนาด 300 ลิตร	ถังหมักขนาด 30 ลิตร	ถังหมักขนาด 5 ลิตร
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) (hr^{-1})	0.046	0.046	0.042
Biomass yield (Yx/s) (g cell /g glucose)	0.101	0.087	0.080
Product yield (Yp/s) (gCA/ g total glucose)	0.484	0.443	0.486
productivity (gCA / l / hr.)	1.044	0.955	1.11