บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Candida oleophila* NN-39 ในระดับขวดเขย่า

เชาวรีย์ เรืองวิไลทรัพย์ (2539) ได้คัดเลือกสายพันธุ์กลายของยีสต์ *Candida oleophila* C-73 ซึ่งทำการกลายพันธุ์โดย สมศักดิ์ นาคซื่อตรง (2537) พบว่าสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและน้ำหมักมีความหนืดน้อยได้แก่ สายพันธุ์ *Candida oleophila* NN-39 ซึ่งสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 130.9 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักในระดับขวดเขย่า ดังนั้นจึงนำยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาต่อไป

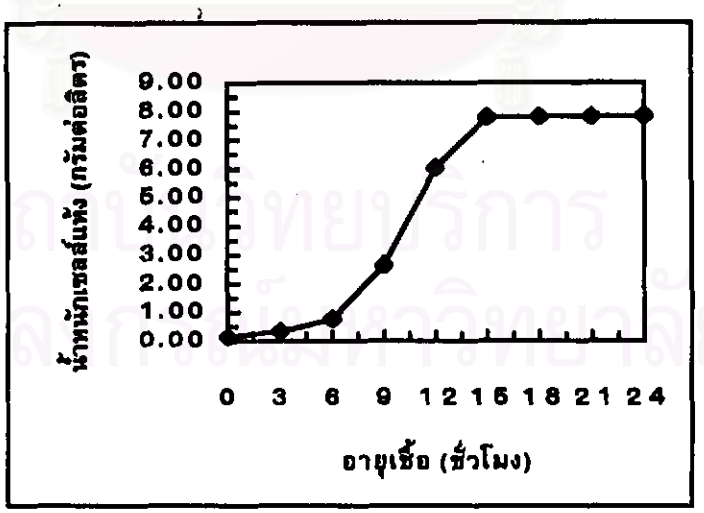
3.1.1 ลักษณะการเจริญของ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.1) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1 ติดตามการเจริญของเชื้อทุกๆ 3 ชั่วโมง โดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.4.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้ออยู่ในระยะพักตัว (lag phase) ในช่วงแรก และเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) ในชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นเชื้อเจริญเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 15 ซึ่งเป็นช่วงท้ายของการเจริญในระยะทวีคูณ เชื้อเริ่มเข้าสู่การเจริญแบบคงที่ (stationary phase) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 7.8 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3-1 และรูปที่ 3-1 ซึ่งรูปแบบการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ซึ่งใช้เชื้อ *Candida oleophila* C-73 ได้รายงานว่าอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมคือช่วงปลายระยะการเจริญแบบทวีคูณ (late log phase) ซึ่งอายุหัวเชื้อเท่ากับ 15 ชั่วโมง และ เชาวรีย์ เรืองวิไลทรัพย์ (2539) ทำการวิจัยเรื่อง ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* NN-39 ซึ่งใช้อายุหัวเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง ในการผลิตกรดมะนาว ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้หัวเชื้ออายุ15 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ

0.7 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการทดลองของเชาวรีย์ เรืองวิไลทรัพย์(2539) ซึ่งใช้เชื้อสายพันธุ์เดียวกัน

ตารางที่ 3-1 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Candida oleophila* NN-39 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในระยะเวลาต่าง ๆ

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.148
3	0.324
6	0.794
9	2.662
12	6.040
15	7.800
18	7.840
21	7.840
24	7.850



รูปที่ 3-1 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

3.1.2 ลักษณะการเจริญ การผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริกและการใช้น้ำตาลของ *Candida oleophila* NN-39ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก1.) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 ถ่ายหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.1) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.2 เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นำน้ำหมักมาวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง กรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำตาลที่เหลือตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.4 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3-2 และรูปที่ 3-2 จากผลการทดลองพบว่า ในชั่วโมงที่ 0-72 เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ภายหลังชั่วโมงที่ 72 การเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่และน้ำหมักเริ่มหนืดเพิ่มขึ้น จนที่เวลา 120 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 16.75 กรัมต่อลิตร เชื้อเริ่มผลิตกรดมะนาวหลังจาก 12 ชั่วโมงของการหมัก และปริมาณกรดมะนาวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก (120ชั่วโมง) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.95 ได้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 154.02 กรัมต่อลิตร เหลือน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 2.22 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวร้อยละ 72.38 สำหรับการผลิตกรดไอโซซิตริกจะเกิดภายหลังชั่วโมงที่ 36 ของการหมักและมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนที่ 96 ชั่วโมง ปริมาณกรดไอโซซิตริกสูงสุดเท่ากับ 12.75 กรัมต่อลิตร การเพิ่มขึ้นของกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณน้ำตาล ซึ่งรูปแบบของการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของ *Candida oleophila* NN-39 นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ เชาวรีย์ เรืองวิไลทรัพย์(2539) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทำการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (control) สำหรับการศึกษาถึงอิทธิพลของสารเจือปนในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่อการผลิตกรดมะนาว

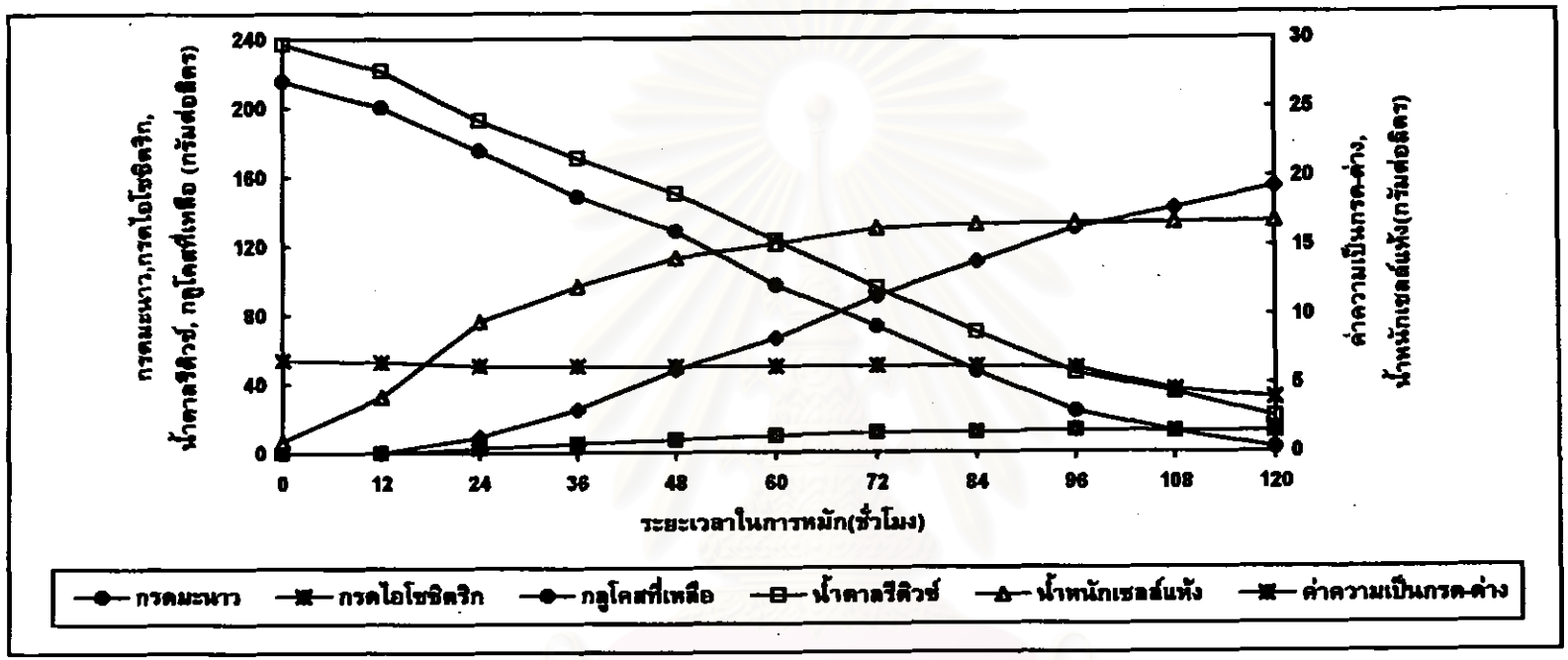
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3-2 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่างๆ

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0	0	6.74	0.85	237.01	215.69	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0	6.60	4.09	221.43	200.26	0.00	0.00	0.00	0.00
24	0	6.34	9.55	192.45	175.26	9.26	2.73	3.39	22.90
36	0	6.31	12.08	170.91	148.49	25.24	5.04	5.01	37.56
48	0	6.24	14.11	150.23	128.58	48.04	7.52	6.39	55.15
60	0	6.24	15.15	123.14	97.22	66.30	9.59	6.91	55.96
72	1+	6.29	16.27	95.43	73.30	90.82	11.32	8.02	63.78
84	2+	6.27	16.55	70.12	46.88	110.58	11.44	9.67	65.51
96	3+	6.09	16.60	45.97	23.69	130.09	12.75	10.20	67.76
108	4+	4.55	16.67	35.00	11.97	141.50	11.67	12.78	69.46
120	5+	3.95	16.75	20.37	2.22	154.02	11.88	12.96	72.38

หมายเหตุ : ค่าความหนืด ดูจากน้ำหมักที่ได้ เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 5+>4+>3+>2+>1+>0 โดยน้ำหมักที่มีความหนืดเท่ากับ 5+ นั้น สามารถคว่ำขวดทดลองรูปชมพู่ได้โดยน้ำหมักไม่ไหล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3-2 ลักษณะการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง การผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก ตลอดจนการใช้น้ำตาลของ *Candida oleophila* NN-39 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การศึกษาอิทธิพลของสารเจือปนในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Candida oleophila* NN-39 ในระดับขวดเขย่า

จากงานวิจัยการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีราคาถูกกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยตรง แต่ต้นทุนการผลิตยังลดลงไม่มากนัก เนื่องจากในกระบวนการย่อยแป้งมันสำปะหลังดังกล่าวยังคงใช้เอนไซม์ซึ่งมีราคาสูงพอสมควร และจากการที่กากมันสำปะหลังเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังซึ่งยังคงมีแป้งเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 56 โดยน้ำหนักแห้ง (Grace, 1977) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะแปรรูปกากมันสำปะหลังไปเป็นสารละลายน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาว ซึ่งอาจจะเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้อีกทางหนึ่ง แต่สารละลายน้ำตาลที่ได้มีสมบัติบางอย่างที่แตกต่างจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ เช่น สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดนี้จะมีเกลือและสารสีคล้ำ (Browning) ซึ่งเกิดขึ้นหลังขั้นตอนการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายน้ำตาลให้เป็นกลาง รวมทั้งสารเจือปนอื่น ๆ ที่มีอยู่ในกากมันสำปะหลังเองสิ่งเหล่านี้อาจมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* NN-39 ดังนั้นการทดลองต่อไปนี้จะทำการศึกษาถึงอิทธิพลของสารเจือปนในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

3.2.1 อิทธิพลของเกลือต่าง ๆต่อประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาว

ในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังโดยกรดแก่ จะได้สารละลายน้ำตาลที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำมาก จึงต้องมีการเติมสารซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่างลงไปเพื่อปรับสภาพสารละลายน้ำตาลให้เป็นกลาง ซึ่งชนิดของเกลือที่เกิดขึ้นนี้จะขึ้นกับชนิดของกรดและด่างที่ใช้ในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง ได้แก่ โซเดียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ แคลเซียมซัลเฟต ดังนั้นการทดลองต่อไปนี้จึงต้องการทดสอบผลของเกลือดังกล่าวต่อการผลิตกรดมะนาวเพื่อคัดเลือกชนิดของกรดและด่างที่จะใช้ในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อไป

3.2.1.1 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

เกลือโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายน้ำตาลเกิดจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดไฮโดรคลอริกและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ การทดลองนี้จะศึกษาผลของปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 ถ่ายหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.2) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.2 แปรผันปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์เริ่มต้น เท่ากับ 0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 โมลาร์ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อก (RBD) โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ให้แต่ละครั้งของการทดลองเป็นบล็อกและในแต่ละครั้งของการทดลองมี 6 ทรีทเมนต์ คือ ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 2 ซ้ำ เก็บตัวอย่างที่ 96 และ 120 ชั่วโมงของการหมัก ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-3 และรูปที่ 3-3, 3-4 พบว่าเกลือโซเดียมคลอไรด์มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 โดยที่ระดับของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งไม่สูงกว่า 0.04 โมลาร์ ให้ผลผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกับชุดควบคุม (ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0 โมลาร์) สำหรับระดับของเกลือโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.06 โมลาร์ขึ้นไปให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ดังนั้นปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่จะยอมให้มีได้ในสารละลายน้ำตาลไม่ควรสูงกว่า 0.04 โมลาร์ ซึ่งให้ปริมาณกรดมะนาวเท่ากับ 116.73 และ 140.94 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยที่ชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ปริมาณกรดมะนาวเท่ากับ 119.79 และ 143.25 กรัมต่อลิตรที่เวลา 96และ120 ชั่วโมงของการหมัก สำหรับการเจริญของเชื้อนั้นปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลอย่างเด่นชัดต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดไอโซซิตริก

3.2.1.2 ผลของเกลือโซเดียมซัลเฟตต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

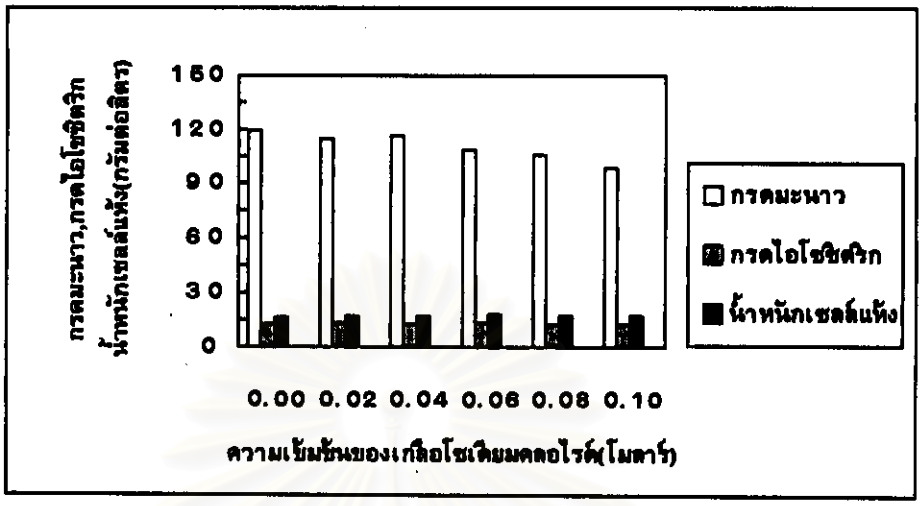
ในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้เกิดเกลือโซเดียมซัลเฟตในสารละลายน้ำตาล ดังนั้นการทดลองนี้จะศึกษาผลของปริมาณเกลือโซเดียมซัลเฟตต่อประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.1) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 ถ่ายหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.3) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.2 แปรผันปริมาณเกลือโซเดียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 โมลาร์ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดโดยที่จำนวนซ้ำ (n) ในแต่ละทรีทเมนต์ เท่ากับ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างที่เวลา 96 และ120 ชั่วโมง

ของการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-4 และรูปที่ 3-5, 3-6 พบว่าปริมาณเกลือโซเดียมซัลเฟตไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดไอโซชิดริกอย่างเด่นชัด ซึ่งได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดใกล้เคียงกันในทุกชุดทดลองประมาณ 17 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดไอโซชิดริกสูงสุดเท่ากับ 12.67 กรัมต่อลิตรที่เวลา 120 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง แต่ปริมาณเกลือโซเดียมซัลเฟตมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมซัลเฟตตั้งแต่ 0.02 โมลาร์ขึ้นไปให้ปริมาณกรดมะนาวต่ำกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมเกลือโซเดียมซัลเฟตอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น99% ดังนั้นปริมาณเกลือโซเดียมซัลเฟตซึ่งจะยอมให้มีได้ในสารละลายน้ำตาลที่จะนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวไม่ควรสูงกว่า 0.01 โมลาร์ ซึ่งให้ปริมาณกรดมะนาวใกล้เคียงกับชุดควบคุมคือเท่ากับ 121.60 และ143.13 กรัมต่อลิตร ที่ 96 และ 120 ชั่วโมงของระยะเวลาในการหมัก

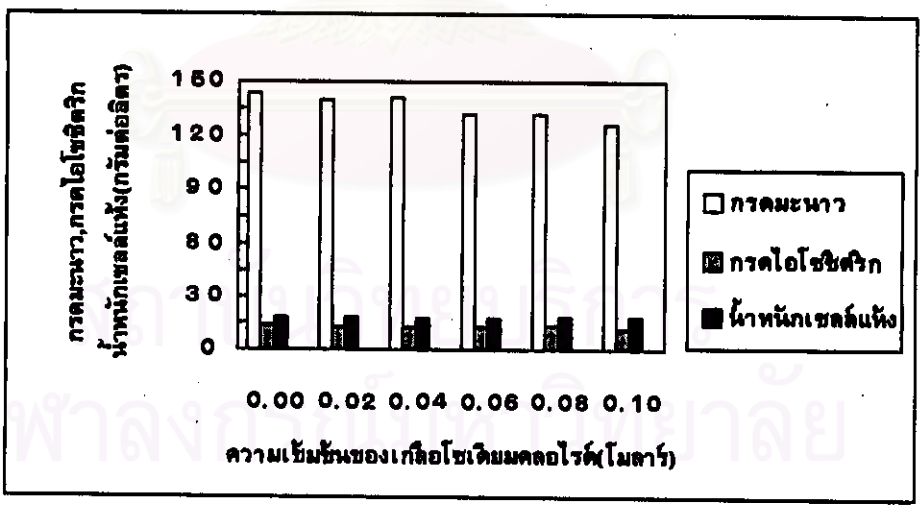
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3-3 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

เวลา (ชั่วโมง)	เกลือโซเดียมคลอไรด์ (โมลาร์)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
96	0	4+	5.85	16.35	119.79	12.54	9.55	28.95	61.23
	0.02	4+	5.46	16.94	115.03	12.93	8.90	35.61	60.87
	0.04	4+	5.83	16.72	116.73	12.60	9.26	33.13	60.97
	0.06	4+	5.90	16.68	108.48	12.94	8.38	35.96	57.51
	0.08	4+	5.92	17.19	105.63	12.60	8.38	38.68	56.82
	0.10	3+	5.97	17.06	98.68	12.37	7.98	45.32	55.04
120	0	5+	3.95	17.85	143.25	13.54	10.58	9.01	66.45
	0.02	5+	4.00	17.63	139.55	12.76	10.93	7.89	64.40
	0.04	5+	3.92	17.25	140.94	12.45	11.32	9.94	65.66
	0.06	5+	4.00	17.14	132.01	12.27	11.00	9.02	61.24
	0.08	5+	4.05	17.67	132.35	12.95	10.22	11.26	62.04
	0.10	4+	4.30	17.85	125.82	11.46	10.98	13.84	59.71



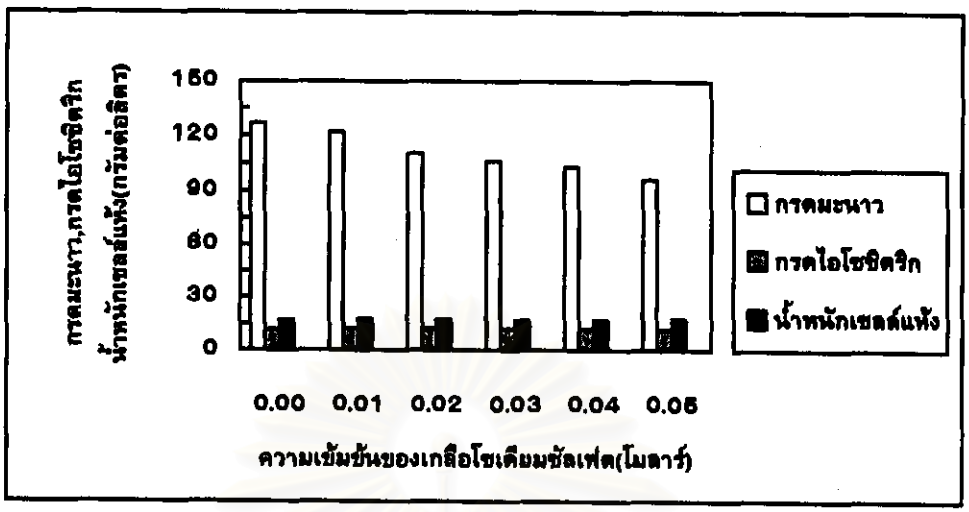
รูปที่ 3-3 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เมื่อใช้เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง



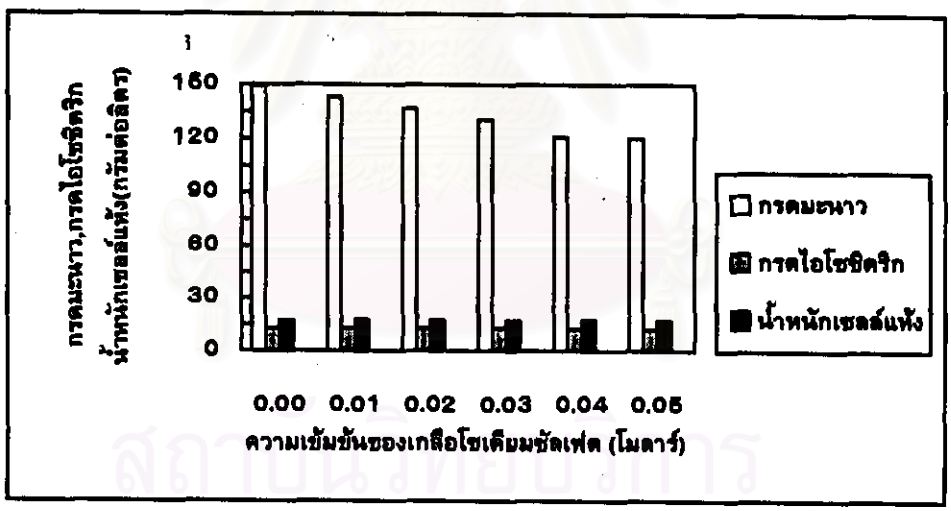
รูปที่ 3-4 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เมื่อใช้เวลาในการหมัก 120ชั่วโมง

ตารางที่ 3-4 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือโซเดียมซัลเฟต

เวลา (ชั่วโมง)	เกลือโซเดียมซัลเฟต (โมลาร์)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
96	0	4+	5.73	16.86	126.69	11.65	10.87	29.00	66.02
	0.01	4+	5.88	17.31	121.80	12.00	10.15	28.60	63.34
	0.02	3+	5.98	17.07	110.55	12.46	8.87	31.03	58.23
	0.03	3+	6.13	16.96	106.66	12.03	8.87	36.22	57.76
	0.04	3+	6.19	16.87	103.27	12.02	8.59	36.37	55.97
	0.05	3+	6.20	17.59	96.21	11.50	8.37	37.97	52.60
120	0	5+	3.90	17.01	149.88	12.67	11.99	1.66	69.28
	0.01	5+	4.05	17.35	143.13	12.65	11.31	1.97	65.53
	0.02	4+	4.68	17.57	136.83	12.60	10.86	3.82	63.03
	0.03	4+	5.21	17.19	130.63	12.66	10.32	4.63	60.40
	0.04	4+	5.68	17.41	121.33	12.52	9.72	6.52	56.75
	0.05	4+	5.63	17.15	120.62	12.08	9.99	7.69	56.58



รูปที่ 3-5 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือโซเดียมซัลเฟต เมื่อใช้เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง



รูปที่ 3-6 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือโซเดียมซัลเฟตเมื่อใช้เวลาในการหมัก 120 ชั่วโมง

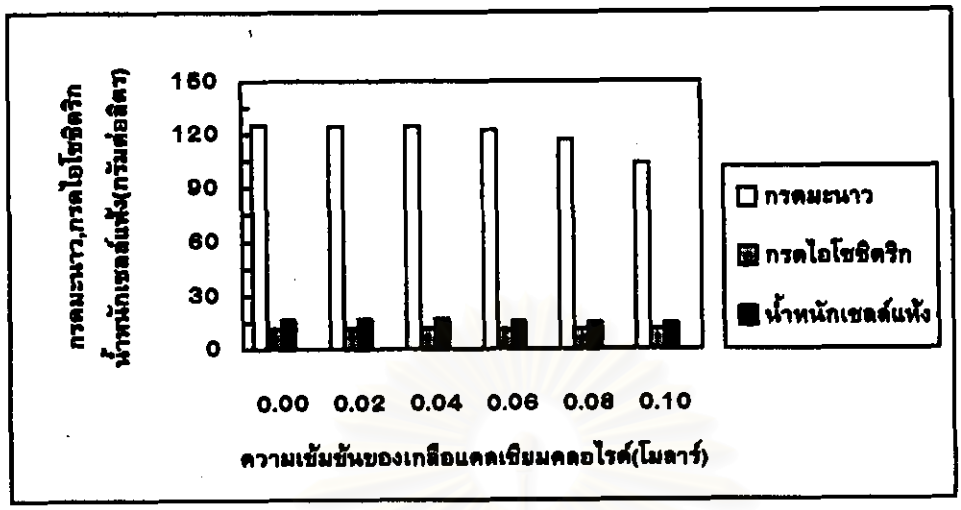
3.2.1.3 ผลของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

ในการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกและปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นจะทำให้เกิดเกลือแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายน้ำตาลขึ้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาผลของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ต่อการผลิตกรดมะนาว โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.1) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 นำหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก.2.4) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.2 แปรผันปริมาณเกลือแคลเซียมคลอไรด์เริ่มต้นเท่ากับ 0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 โมลาร์ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยที่จำนวนซ้ำในแต่ละทรีทเมนต์เท่ากับ 3 ซ้ำ ทำการเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3-5 และรูปที่ 3-7, 3-8 พบว่าเกลือแคลซียมคลอไรด์มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 โดยที่ระดับของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ซึ่งไม่สูงกว่า 0.06 โมลาร์ ให้ผลผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกับชุดควบคุม (ปริมาณเกลือแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0 โมลาร์) สำหรับระดับของกลือแคลเซียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.08 โมลาร์ขึ้นไปให้ผลผลิตกรดมะนาวต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ดังนั้นปริมาณเกลือแคลเซียมคลอไรด์ที่จะยอมให้มีได้ในสารละลายน้ำตาลไม่ควรสูงกว่า 0.06 โมลาร์ ซึ่งให้ปริมาณกรดมะนาวเท่ากับ 122.15 และ 140.93 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ โดยที่ชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ได้ปริมาณกรดมะนาวเท่ากับ 125.31 และ 148.36 กรัมต่อลิตรที่เวลา 96 และ120 ชั่วโมงของการหมัก สำหรับการเจริญของเชื้อนั้นปริมาณเกลือแคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลอย่างเด่นชัดต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณเกลือแคลเซียมคลอไรด์ในการทดลองนี้ให้ปริมาณกรดไอโซซิตริกใกล้เคียงกันในทุกชุดทดลอง

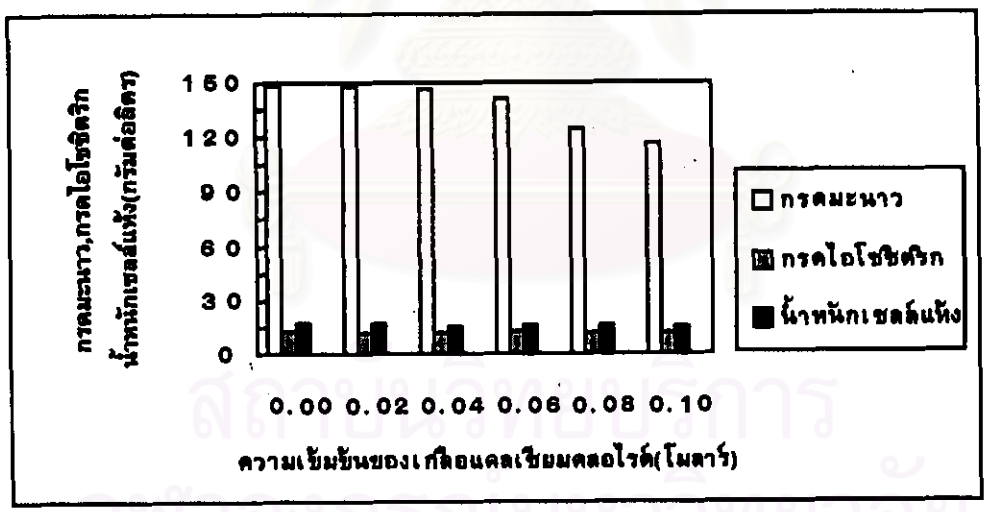
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3-5 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมคลอไรด์

เวลา (ชั่วโมง)	เกลือแคลเซียมคลอไรด์ (โมลาร์)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
96	0	4+	5.90	16.41	125.31	11.34	11.05	39.06	70.82
	0.02	4+	5.80	16.77	124.35	11.64	10.68	37.60	69.70
	0.04	4+	5.82	16.63	124.50	11.54	10.79	38.27	70.05
	0.06	4+	5.84	16.62	122.15	11.04	11.06	43.15	70.67
	0.08	3+	5.80	16.14	116.80	11.38	10.28	47.27	69.22
	0.10	3+	5.91	16.76	103.54	11.31	9.15	61.80	67.14
120	0	5+	4.50	16.60	148.36	12.32	12.04	12.06	72.75
	0.02	5+	4.47	16.50	147.87	12.09	12.23	8.64	71.31
	0.04	5+	4.06	16.13	146.63	12.22	12.00	7.71	70.40
	0.06	5+	4.92	16.35	140.93	12.59	11.19	22.31	69.19
	0.08	4+	5.20	15.93	124.92	12.03	10.38	21.56	64.25
	0.10	4+	5.55	15.80	116.48	11.94	9.76	32.68	63.54



รูปที่ 3-7 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง



รูปที่ 3-8 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง

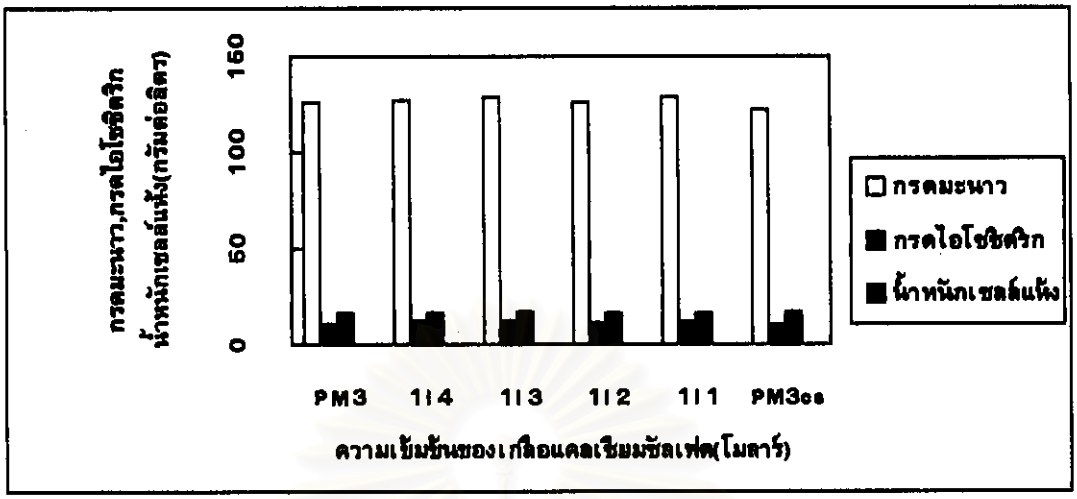
3.2.1.4 ผลของเกลือแคลเซียมซัลเฟตต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

เกลือแคลเซียมซัลเฟตในสารละลายน้ำตาลเกิดจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตและถึงแม้เกลือแคลเซียมซัลเฟตจะละลายน้ำได้น้อยมากและสามารถกำจัดออกได้โดยการกรองแต่ยังคงมีเกลือแคลเซียมซัลเฟตบางส่วนละลายอยู่ในสารละลายน้ำตาล ดังนั้นการทดลองนี้จะศึกษาผลของปริมาณเกลือแคลเซียมซัลเฟตต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.1) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ซึ่งแปรผันปริมาณเกลือแคลเซียมซัลเฟตเริ่มต้นโดยการเจือจางอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสำหรับผลิตกรดมะนาวที่อิ่มตัวด้วยเกลือแคลเซียมซัลเฟต (PM_{3cs}) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ปราศจากการเติมเกลือแคลเซียมซัลเฟต (PM_3) (ภาคผนวก ก 2.5) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.2 โดยปริมาณเกลือแคลเซียมซัลเฟตเริ่มต้นแปรผันตามการเจือจาง PM_{3cs} : PM_3 ดังนี้ PM_{3cs} , 1 :1 , 1 : 2 , 1 : 3 และ PM_3 ตามลำดับ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยจำนวนซ้ำ (n) เท่ากับ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3-6 และรูปที่ 3-9, 3-10 พบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมซัลเฟตต่าง ๆนั้นเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณใกล้เคียงกันประมาณ 125 และ 145 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาในการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ และปริมาณเกลือแคลเซียมซัลเฟตดังกล่าวไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งมีค่าประมาณ 16 กรัมต่อลิตรที่ 96 และ 120 ชั่วโมงของระยะเวลาในการหมัก และทุกชุดทดลองให้ปริมาณกรดไอโซซิตริกใกล้เคียงกัน

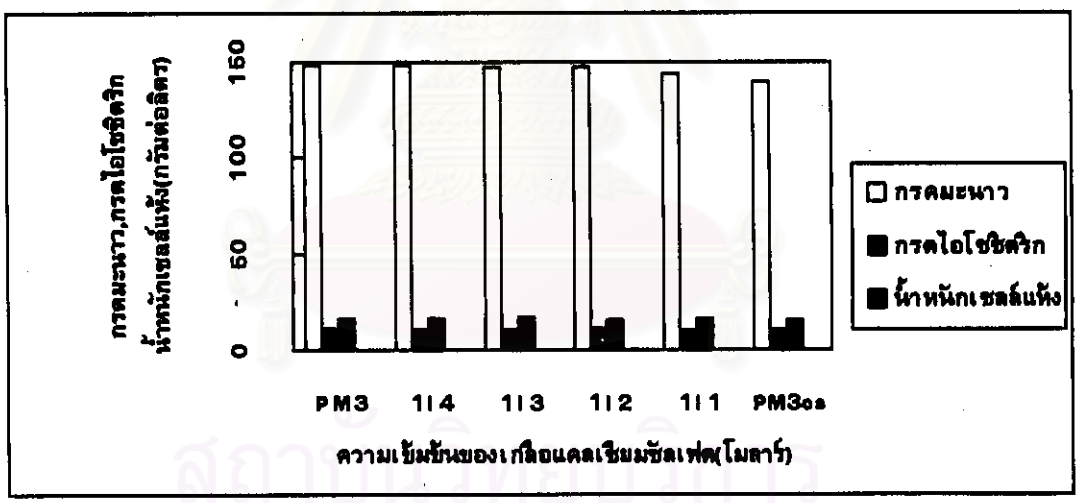
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3-6 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมซัลเฟต

เวลา (ชั่วโมง)	PM_{3cs} : PM_3	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
96	PM_3	4+	5.85	16.39	125.78	10.79	11.66	26.89	65.74
	1:4	4+	5.87	16.36	127.16	12.28	10.36	26.63	66.34
	1:3	4+	5.82	16.58	128.47	12.32	10.43	25.60	66.70
	1:2	4+	5.78	16.19	125.98	1.01	11.44	26.59	65.75
	1:1	4+	5.76	16.50	128.48	11.57	11.10	27.34	67.32
	PM_{3cs}	4+	5.82	16.65	121.74	10.15	11.99	27.50	63.84
120	PM_3	5+	4.12	16.32	148.19	11.34	13.07	4.35	69.30
	1:4	5+	4.08	16.19	148.58	10.62	13.49	3.94	69.35
	1:3	5+	4.03	16.61	147.09	10.78	13.69	3.76	68.59
	1:2	5+	4.14	15.81	146.94	11.23	13.08	3.43	68.42
	1:1	5+	4.08	16.05	143.63	10.29	13.96	3.60	66.93
	PM_{3cs}	5+	4.11	15.79	139.16	10.76	12.93	4.28	65.05



รูปที่ 3-9 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมซัลเฟต ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง



รูปที่ 3-10 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของเกลือแคลเซียมซัลเฟต ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง

I 17606925

จากการทดลองที่ผ่านมาเกลือโซเดียมคลอไรด์ โซเดียมซัลเฟต และแคลเซียมคลอไรด์ ในปริมาณต่ำๆ ประมาณไม่เกิน 0.06 โมลาร์ ก็มีผลทำให้ผลผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งไม่มีการเติมเกลือเหล่านี้ แต่สำหรับเกลือแคลเซียมซัลเฟตซึ่งละลายได้น้อยมากในสารละลายน้ำตาลและสามารถกำจัดออกได้โดยการกรอง แม้จะมีบางส่วนของเกลือแคลเซียมซัลเฟตที่สามารถละลายได้แต่จากผลการทดลองที่ 3.2.1.4 แสดงให้เห็นว่าเกลือแคลเซียมซัลเฟตในปริมาณที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวไม่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวและไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตสารละลายน้ำตาลที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาวต่อไปนั้น จะเลือกใช้กรดซัลฟิวริกในขั้นตอนการย่อยและใช้แคลเซียมคาร์บอเนตในขั้นตอนการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของสารละลายน้ำตาลให้เป็นกลางต่อไป

3.2.2 ผลของสารสีคล้ำ (Browning) ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก ต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดแก่จะมีสารสีคล้ำเกิดขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาในการย่อยเกิดที่อุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังจากการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้สารละลายน้ำตาลมีสภาพเป็นกลางและมีความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 220 กรัมต่อลิตรแล้ว ระดับความเข้มของสารสีคล้ำจะสูงขึ้นมาก ซึ่งเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร แล้วได้ค่าเท่ากับ 9.120

Abou-Eleia และคณะ (1984) ได้ศึกษาการเกิดสีของกลูโคสและฟรักโทรสกับไกลซีน (glycine) โดยให้ความร้อนแก่สารละลายน้ำตาลซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7-12 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของอุณหภูมิในช่วง 60-140 องศาเซลเซียส ต่อการเกิดปฏิกิริยา พบว่าความร้อนและค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่สูงขึ้นทำให้ระดับความเข้มของสีสูงขึ้น และยังพบอีกว่าเมื่อความบริสุทธิ์ของสารละลายน้ำตาลลดลง จะทำให้เกิดสีเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Abou-Eleia และคณะ, 1984 อ้างถึงใน ยุวภา วิโรจน์สกุลชัย, 2536)

กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่มีสารเจือปนอยู่มากเมื่อเปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลัง เนื่องจากในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังนั้น แป้งมันสำปะหลังจะต้องผ่านขั้นตอนการล้างน้ำและปั่นแยกหลายครั้ง จึงจะนำไปผ่านขั้นตอนการทำให้แห้งจนได้เป็นแป้งมันสำปะหลังออกมา แต่กากมันสำปะหลังจะมีสารเจือปนที่ติดมากับหัวมันสำปะหลังและอาจมาจากซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เติมเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อในระหว่างการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ดังนั้นสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดจึงน่าจะมีสารเจือปนมากกว่าสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง จากการที่สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยที่กากมันสำปะหลังมีความบริสุทธิ์ต่ำ เมื่อนำไปผ่านการนึ่ง

ฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทำให้ระดับความเข้มของสารสีคล้ำในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังดังกล่าวมีค่าสูงขึ้นอย่างมาก แต่การทดลองนี้ต้องการศึกษาถึงผลของระดับความเข้มของสารสีคล้ำซึ่งแปรผันตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ต่อการผลิตกรดมะนาว ดังนั้นเพื่อให้ได้ระดับความเข้มของสารสีคล้ำ (Browning) ในสารละลายน้ำตาลตรงตามที่เตรียมไว้จึงต้องทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากเชื้อปนเปื้อนโดยการกรองผ่านชุดกรองกำจัดแบคทีเรียแทนการนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อน โดยในขั้นต้นได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งมีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกที่ไม่ผ่านผงถ่านกัมมันต์ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 9.120 พบว่า ได้ปริมาณกรดมะนาวประมาณ 87 และ 110 กรัมต่อลิตร ที่ 96 และ 120 ชั่วโมงของระยะเวลาในการหมัก ตามลำดับ ปริมาณกรดมะนาวที่ได้นี้ต่ำกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งได้กรดมะนาวประมาณ 120 และ 145 กรัมต่อลิตร ที่ 96 และ 120 ชั่วโมง ของการหมัก อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % จากรายงานการวิจัยของ Shah และคณะ (1993) พบว่าเมื่อนำสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ไปผ่านผงถ่านกัมมันต์แล้วทำให้ผลผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Yarrowia lipolytica* (DS-1) สูงขึ้น ดังนั้นจึงนำสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 9.120 ไปผ่านผงถ่านกัมมันต์จนได้ค่าการดูดกลืนแสง ภายหลังจากปรับความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายน้ำตาลเป็น 220 กรัมต่อลิตรแล้ว เท่ากับ 2.560 และ 5.430 เมื่อนำสารละลายน้ำตาลที่มีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 2.560 , 5.430 และ 9.120 ไปเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวพบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ใกล้เคียงกันคือได้ปริมาณกรดมะนาวประมาณ 90 และ 112 กรัมต่อลิตร ที่ 96 และ 120 ชั่วโมง ของระยะเวลาในการหมัก ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าระดับของสารสีคล้ำซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 2.560 นี้ ยังมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวอยู่ จึงทำการแปรผันระดับความเข้มของสารสีคล้ำให้ต่ำลงอีกเพื่อศึกษาผลของระดับความเข้มของสารสีคล้ำในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่อการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.1) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.6) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว แปรผันระดับความเข้มของสารสีคล้ำ (Browning) ตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เท่ากับ 0.130, 0.545, 0.912, 1.940 และ 9.120 ตามลำดับ เก็บตัวอย่างที่ 96 และ 120ชั่วโมงของการหมัก ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3-7 รูปที่ 3-11 และรูปที่ 3-12 พบว่าระดับความเข้มของสารสีคล้ำซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.130-1.940 ให้ผลผลิตกรดมะนาวไม่แตกต่างกัน คือประมาณ 100 และ 126 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ แต่ที่ระดับความเข้ม

ของสารสีคล้ำเท่ากับ 9.120 ให้ผลผลิตกรดมะนาวแตกต่างจากชุดทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % โดยปริมาณกรดมะนาวที่ได้ประมาณ 90 และ 113 กรัมต่อลิตร ที่ 96 และ120 ชั่วโมงของการหมัก และเมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อพบว่า สารสีคล้ำไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเซลล์แห้ง และสำหรับการผลิตกรดไอโซซิตริก พบว่าที่ระดับความเข้มของสารสีคล้ำตั้งแต่ 0.130-1.940 ให้ผลผลิตกรดไอโซซิตริกไม่แตกต่างกัน คือ ประมาณ 18 และ 20 กรัมต่อลิตร ที่ 96 และ 120 ชั่วโมงของการหมักตามลำดับ แต่ที่ระดับความเข้มของสารสีคล้ำเท่ากับ 9.120 ให้ปริมาณกรดไอโซซิตริกสูงประมาณ 20 และ 22 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมซึ่งได้ปริมาณกรดไอโซซิตริกประมาณ 12 กรัมต่อลิตร ทั้งที่ 96 และ 120 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบชุดทดลองที่มีค่าความเข้มของสารสีคล้ำเท่ากับ 0.130-1.940 กับชุดควบคุมซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (HST) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ในชุดทดลองที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกดังกล่าวให้ปริมาณกรดมะนาวต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น99%และปริมาณกรดมะนาวที่ได้ไม่แปรผันไปตามความเข้มของสารสีคล้ำ แสดงว่าในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกนั้นยังมีปัจจัยอื่นที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาวอีกนอกเหนือจากสารสีคล้ำ(Browning)

3.2.3 ผลของการลดปริมาณสารที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาวในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

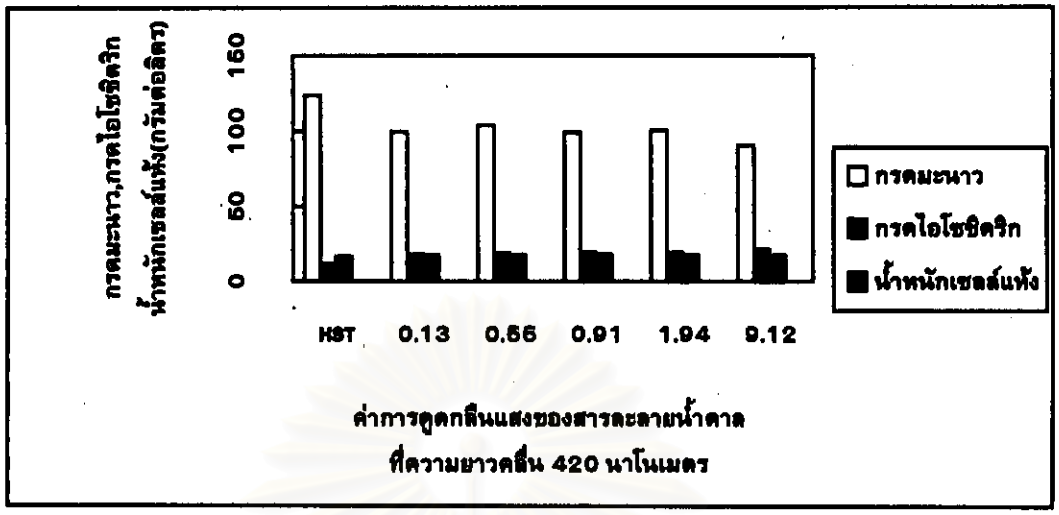
จากผลการทดลองที่ 3.4 พบว่าระดับความเข้มของสารสีคล้ำ (Browning) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร สูงกว่า 1.940 มีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวลดลง จึงทำการควบคุมระดับความเข้มของสารสีคล้ำโดยการนำไปผ่านผงถ่านกัมมันต์ตามภาคผนวก ข 2. จนได้ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.140 ภายหลังจากปรับความเข้มข้นของกลูโคสให้เท่ากับ 220 กรัมต่อลิตรโดยการระเหยไอน้ำออก และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าเท่ากับ 0.524 ซึ่งอยู่ในระดับที่สารสีคล้ำไม่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว ดังนั้นในการทดลองต่อไปอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับผลิตกรดมะนาวจะใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกซึ่งเตรียมตามวิธีในภาคผนวก ข.2 เพื่อกำจัดอิทธิพลของสารสีคล้ำต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Candida oleophila* NN-39 และจากผลการทดลองที่ 3.2.2 พบว่าแม้ระดับความเข้มของสารสีคล้ำจะอยู่ในช่วงที่ไม่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว แต่การใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกนั้นทำให้ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ต่ำกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากการใช้แป้งมัน

สำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % แสดงว่าในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกนั้นยังมีสารเจือปนอื่นอีก ดังนั้นการทดลองนี้จะทำการศึกษาผลของการลดปริมาณสารที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาวในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่อการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.1) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.7) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว ทำการแปรผันความเข้มข้นของสารที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาวของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเจือจางสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก(HPS)ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์(HST) ด้วยอัตราส่วนของ HPS:HST ดังนี้ HST, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1 และ HPS ตามลำดับ โดยทุกชุดทดลองควบคุมปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 220 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างที่ 96 และ 120 ชั่วโมงของระยะเวลาการในการหมัก ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-8 รูปที่ 3-13 และรูปที่ 3-14 พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวอย่างมีนัยสำคัญโดยที่ความเข้มข้นของ HPS สูงขึ้นทำให้ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ลดลงเรื่อยๆ จนเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมี HPS เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวได้ปริมาณกรดมะนาวประมาณ 85 และ 112 กรัมต่อลิตร ที่ 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ และความเข้มข้นของ HPS ที่เพิ่มขึ้นยังมีผลทำให้อัตราส่วนระหว่างกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริกลดลง เนื่องจากปริมาณกรดมะนาวลดลงแต่กรดไอโซซิตริกคงที่สำหรับการเจริญของเชื้อนี้ พบว่าระดับของอัตราส่วนของ HPS:HST ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 16 กรัมต่อลิตร ทั้งที่ 96 และ 120 ชั่วโมง

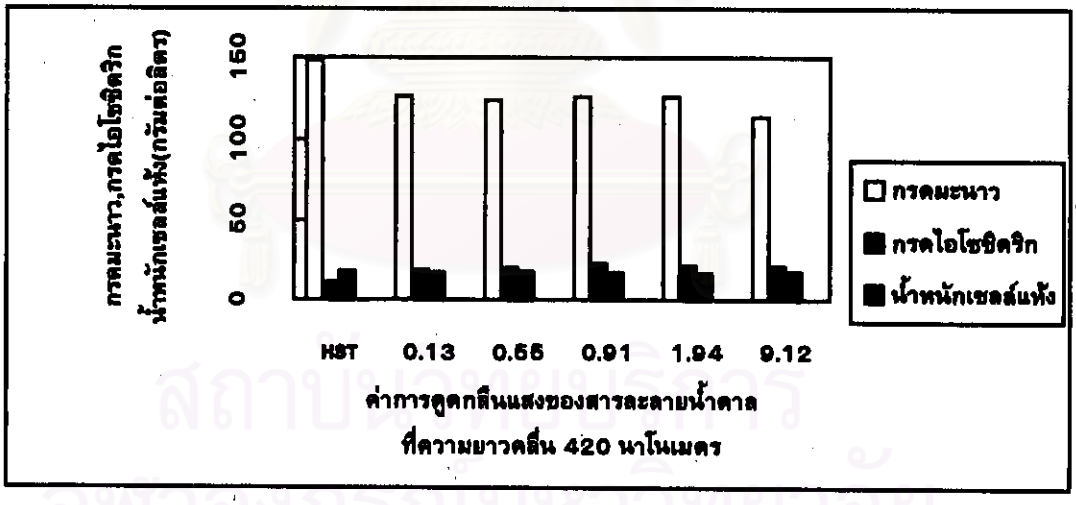
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3-7 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันระดับความเข้มของสารสีคล้ำ (Browning) ในสารละลายน้ำตาล

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	กลูโคลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
96	HST	4+	5.82	16.22	123.90	11.78	10.52	40.36	68.95
	0.130	0	5.87	17.28	99.88	17.66	5.54	74.48	67.26
	0.545	0	5.75	17.12	103.99	18.64	5.58	66.95	67.79
	0.912	0	5.77	17.56	99.07	18.97	5.22	70.15	66.07
	1.940	0	5.81	17.22	100.71	18.97	5.31	68.47	66.46
	9.120	0	5.71	17.10	90.55	20.89	4.33	77.39	63.49
120	HST	5+	4.81	18.21	148.36	11.16	13.29	8.35	70.10
	0.130	0	5.83	17.68	126.45	19.29	6.56	42.78	71.35
	0.545	0	5.92	17.74	124.22	20.28	6.13	41.85	69.72
	0.912	0	5.93	17.52	125.95	22.89	5.50	43.81	71.48
	1.940	0	5.90	17.00	126.25	21.91	5.76	39.68	70.01
	9.120	0	5.84	17.72	113.83	21.54	5.28	50.44	67.13



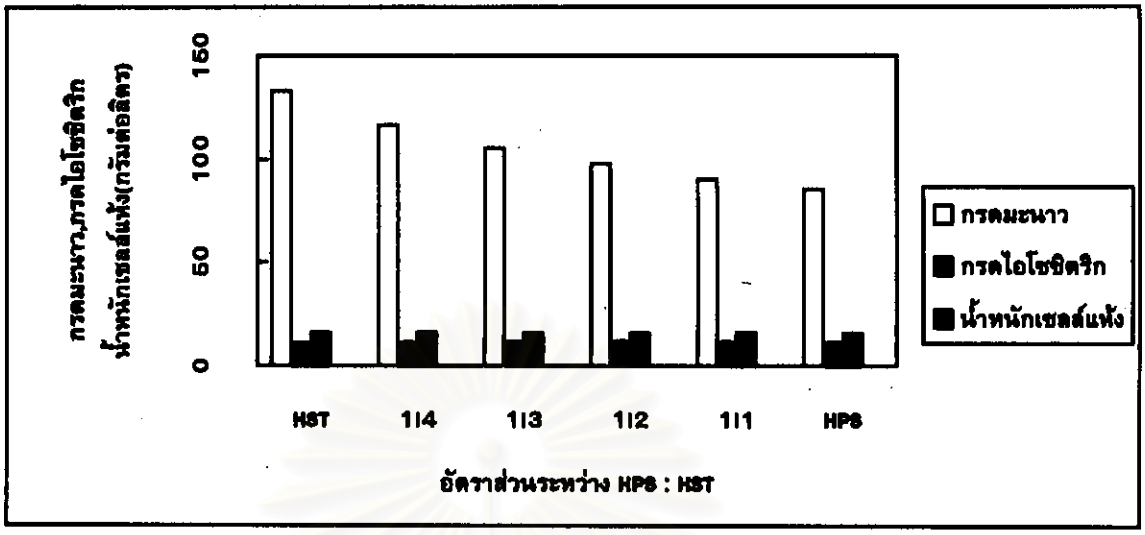
รูปที่ 3-11 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันระดับความเข้มของสารสีคล้ำ (Browning)ของสารละลายน้ำตาล ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง



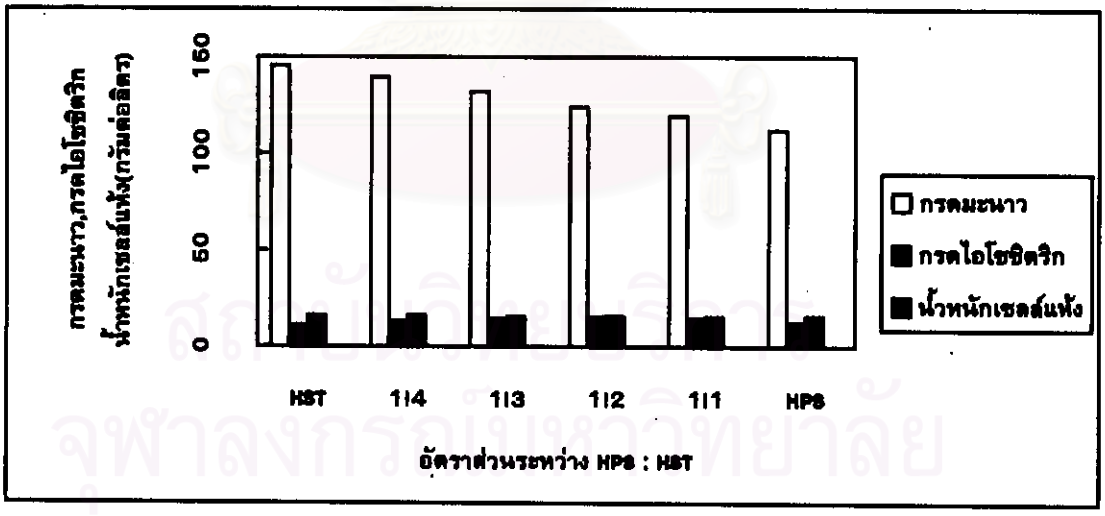
รูปที่ 3-12 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันระดับความเข้มของสารสีคล้ำ (Browning) ของสารละลายน้ำตาลที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 3-8 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันอัตราส่วนของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก (HPS)ต่อสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ (HST)

เวลา (ชั่วโมง)	แหล่งคาร์บอน HPS:HST	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
96	HST	4+	5.91	15.92	123.03	10.81	12.06	36.12	73.36
	1:4	0	5.52	16.00	116.49	11.34	10.27	64.13	75.98
	1:3	0	5.49	15.51	105.56	11.55	8.97	69.94	71.51
	1:2	0	5.51	15.56	98.25	11.77	8.34	71.12	67.14
	1:1	0	5.39	15.81	90.24	11.55	7.81	62.72	58.32
	HPS	0	5.42	15.63	85.52	11.34	7.54	80.54	62.46
120	HST	5+	4.20	16.15	145.37	10.90	13.34	4.34	68.21
	1:4	0	3.46	15.85	139.36	13.08	10.65	25.16	72.47
	1:3	0	3.78	15.45	131.95	14.17	9.31	31.65	71.02
	1:2	0	4.09	15.61	124.16	15.26	8.14	25.72	64.76
	1:1	0	4.47	15.24	119.26	14.82	8.04	27.61	62.82
	HPS	0	5.24	15.81	111.84	12.65	8.84	44.34	64.60



รูปที่ 3-13 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันอัตราส่วนของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่อสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง



รูปที่ 3-14 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันอัตราส่วนของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่อสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง

3.2.4 ผลของสารตกค้างในกากมันสำปะหลังที่สามารถกำจัดออกได้โดยการล้างน้ำต่อการผลิตกรดมะนาว

จากผลการทดลองที่ผ่านมาทราบว่าในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกนั้นยังมีสารเจือปนบางอย่างที่มีผลทำให้ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตโดย *Candida oleophila* NN-39 ต่ำกว่าการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน นอกเหนือจากอิทธิพลของสารสีคล้ำและเกลือต่าง ๆ ซึ่งสามารถควบคุมและกำจัดออกได้บางส่วนแล้ว

จากการที่กากมันสำปะหลังเป็นผลพลอยได้หรืออาจถือได้ว่าเป็นของเสียที่ได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังซึ่งมีสารเจือปนสูงกว่าแป้งมันสำปะหลังที่เป็นวัตถุดิบของการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ (ใช้เป็นชุดควบคุม) ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงพอที่ใช้ในการบริโภคได้ ซึ่งสารเจือปนในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกนั้นอาจเป็นการปนเปื้อนของแร่ธาตุบางอย่างซึ่งติดมากับหัวมันสำปะหลังซึ่งสามารถกำจัดออกได้โดยการนำกากมันสำปะหลังไปล้างน้ำก่อนที่จะนำมาย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก ดังนั้นการทดลองนี้จะศึกษาผลของสารตกค้างในกากมันสำปะหลังที่สามารถกำจัดออกได้โดยการล้างน้ำต่อการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก1)ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารสำหรับศึกษาผลของสารตกค้างในกากมันสำปะหลังที่สามารถกำจัดออกได้โดยการล้างน้ำต่อการผลิตกรดมะนาว ตามภาคผนวก ก 2.8 ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยจำนวนซ้ำ (n) เท่ากับ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 96 และ 120 ชั่วโมง ของการหมักได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 3-9 และรูปที่ 3-15, 3-16 พบว่าปริมาณกรดมะนาวจากชุดทดลองที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังซึ่งผ่านการล้างน้ำแตกต่างจากชุดทดลองที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังซึ่งไม่ผ่านการล้างน้ำอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ดังนั้นในการทดลองต่อไปนี้จะใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านการล้างน้ำแล้วเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารละลายน้ำตาลต่อไป แต่ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากชุดทดลองที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการล้างน้ำแล้วยังคงต่ำกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากชุดควบคุมซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน

หมายเหตุ เริ่มใช้กากมันสำปะหลังรุ่น (lot) ใหม่ในการเตรียมสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกตั้งแต่การทดลองนี้เป็นต้นไป

ตารางที่ 3-9 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิดริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเพื่อศึกษาผลของสารดกด้างในกากมันสำปะหลังที่สามารถกำจัดออกได้โดยการล้างน้ำต่อการผลิตกรดมะนาว

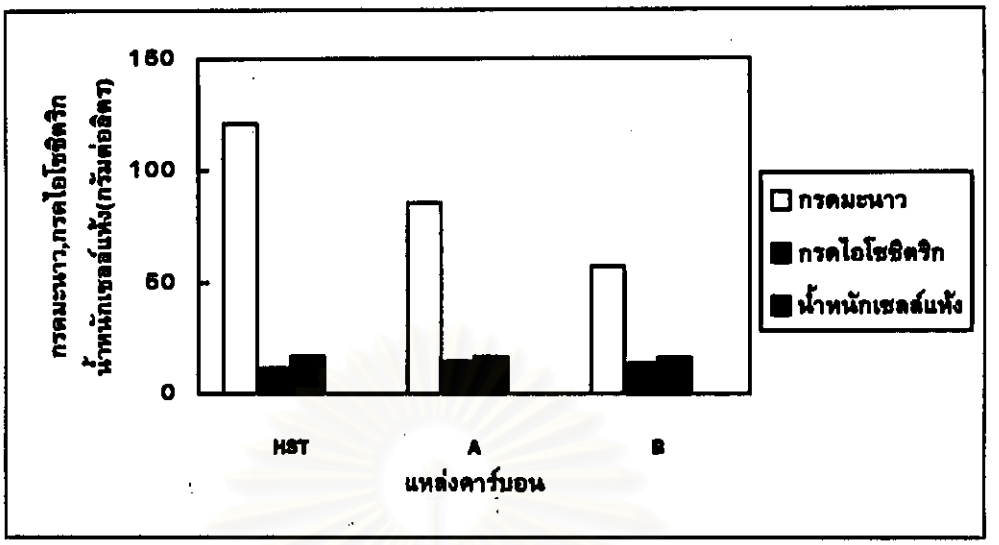
เวลา (ชั่วโมง)	แหล่งคาร์บอน	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิดริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิดริก	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
96	HST	4+	5.86	16.84	121.10	11.73	10.32	52.80	73.66
	A	0	5.99	16.60	85.73	14.39	5.96	87.80	66.25
	B	0	5.93	16.18	57.15	13.73	4.16	132.00	67.08
120	HST	5+	3.93	16.68	146.15	11.03	13.25	24.00	75.65
	A	0	5.73	15.84	110.42	15.70	7.03	49.40	65.80
	B	0	5.79	16.24	83.31	16.00	5.52	87.00	63.99

หมายเหตุ : HST = สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

A = สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการล้างน้ำด้วยกรดซัลฟิวริก

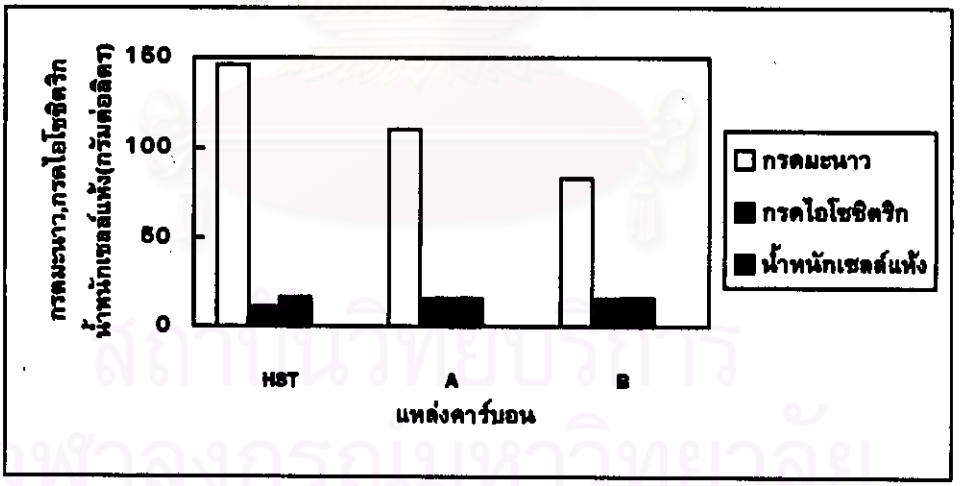
B = สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการล้างน้ำด้วยกรดซัลฟิวริก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3-15 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเพื่อศึกษาผลของการลดสารตกค้างในกากมันสำปะหลังซึ่งสามารถกำจัดออกได้โดยการล้างน้ำ

ต่อการผลิตกรดมะนาว ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง



รูปที่ 3-16 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเพื่อศึกษาผลของการลดสารตกค้างในกากมันสำปะหลังซึ่งสามารถกำจัดออกได้โดยการล้างน้ำต่อการผลิตกรดมะนาวที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง

3.2.5 ผลของกรดซัลฟิวรัสที่อาจตกค้างในกากมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดมะนาว

เนื่องจากในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังนั้นจะต้องมีการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์หรือเติมกรดซัลฟิวรัสลงไปในน้ำแป้งเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิตแป้งมันสำปะหลัง และกรดซัลฟิวรัสที่เติมไปนี้อาจตกค้างอยู่ในกากมันสำปะหลังที่เรานำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำสารละลายน้ำตาล ดังนั้นการทดลองนี้จะทำการศึกษาผลของกรดซัลฟิวรัสที่อาจตกค้างในกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทำสารละลายน้ำตาลต่อการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.10) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.2 ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการล้างน้ำก่อนนำมาย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกแล้วเติมกรดซัลฟิวรัสลงไป แปรผันปริมาณกรดซัลฟิวรัส ดังนี้ คือ 0, 0.05 และ 0.5 % w/v ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนและมีการเติมกรดซัลฟิวรัสลงไปในปริมาณเริ่มต้นเท่ากันกับข้างต้น ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 3-10 รูปที่ 3-17 และ 3-18 พบว่าในชุดทดลองทั้งที่เติมและไม่เติมกรดซัลฟิวรัสซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนเดียวกันให้ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกัน โดยชุดทดลองซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการล้างน้ำแล้ว ได้ปริมาณกรดมะนาวประมาณ 80 และ 107 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาในการหมัก 96 และ120 ชั่วโมงตามลำดับซึ่งสูงกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการล้างน้ำซึ่งให้ปริมาณกรดมะนาวประมาณ 63 และ 87 กรัมต่อลิตรที่ 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ สำหรับชุดทดลองที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นปริมาณของกรดซัลฟิวรัสก็ไม่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเซลล์แห้งเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 3-10 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเพื่อศึกษาผลของกรดซัลฟิวรัสที่ดกค้างในกากมันสำปะหลัง

เวลา (ชั่วโมง)	แหล่งคาร์บอน	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
96	HST	4+	5.40	16.76	123.41	11.32	10.90	52.85	74.28
	0.05HST	4+	5.30	16.12	124.71	11.27	11.07	54.48	75.80
	0.5HST	4+	5.35	16.68	124.92	11.64	10.73	50.42	74.10
	HPSW	0	6.18	16.56	81.74	13.18	6.20	85.49	61.22
	0.05HPSW	0	6.15	16.68	84.32	13.72	6.15	87.03	63.89
	0.5HPSW	0	6.22	16.89	82.79	13.04	6.34	79.95	59.54
	HPSNW	0	6.20	16.56	63.24	10.47	6.04	120.53	64.22
120	HST	5+	4.16	16.20	144.38	12.52	11.53	20.43	72.71
	0.05HST	5+	4.22	15.90	143.19	12.95	11.06	18.06	71.26
	0.5HST	5+	4.02	16.38	143.60	12.89	11.34	16.70	70.98
	HPSW	0	6.03	16.80	107.27	16.36	6.56	59.40	67.21
	0.05HPSW	0	5.99	16.16	104.92	16.99	6.18	55.64	63.86
	0.5HPSW	0	5.98	16.20	107.59	15.38	6.70	54.70	65.48
	HPSNW	0	6.01	15.97	87.13	12.76	6.83	94.03	69.72

ตารางที่ 3-10 ต่อ หมายเหตุ : HST = อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน

0.05HST = อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีกรดซัลฟิวรัส0.05%ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน

0.5HST = อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีกรดซัลฟิวรัส0.5%ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน

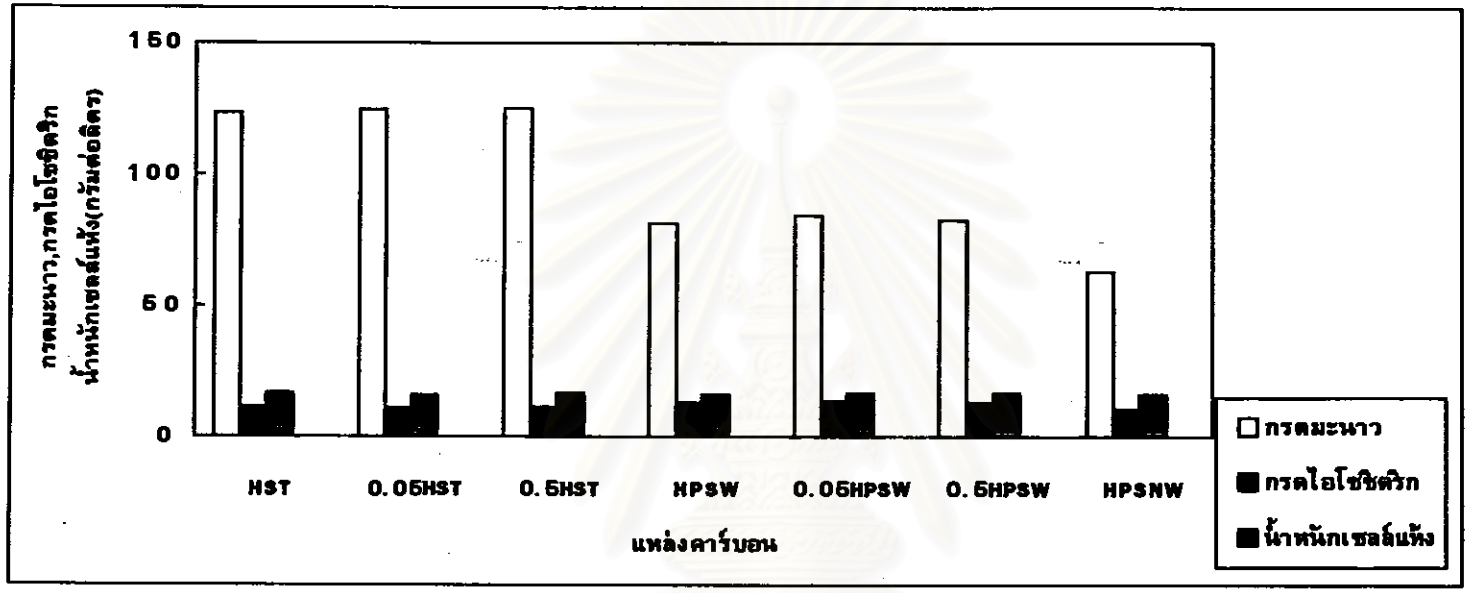
HPSW = อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการล้างน้ำ แล้วด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน

0.05HPSW = อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีกรดซัลฟิวรัส0.05%ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการล้างน้ำแล้วด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน

0.5HPSW = อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีกรดซัลฟิวรัส0.5%ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการล้างน้ำแล้วด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน

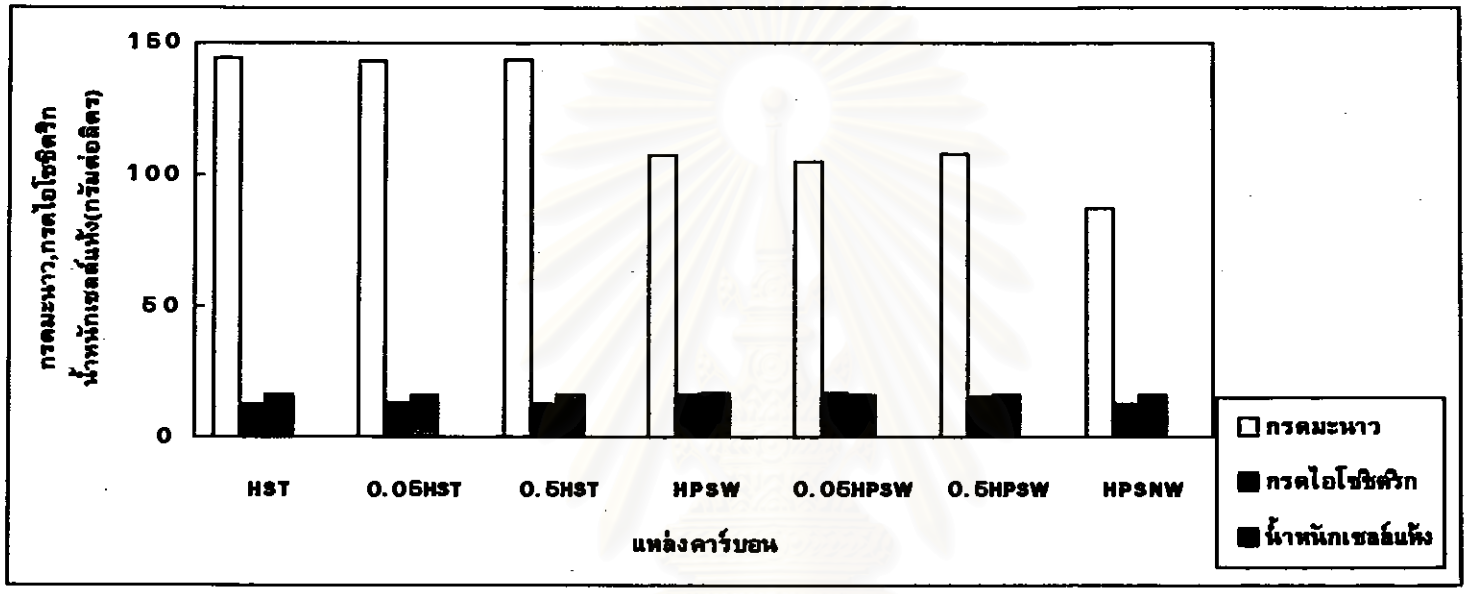
HPSNW = อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการล้างน้ำก่อนด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3-17 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเพื่อศึกษาผลของกรดซัลฟิวรัสที่อาจตกค้างในกากมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดมะนาว ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3-18 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเพื่อศึกษาผลของกรดซัลฟิวรัสที่อาจตกค้างในกากมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดมะนาว ที่ระยะเวลาการหมัก120 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.6 ผลของการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกหลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดต่าง ๆเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดมะนาว

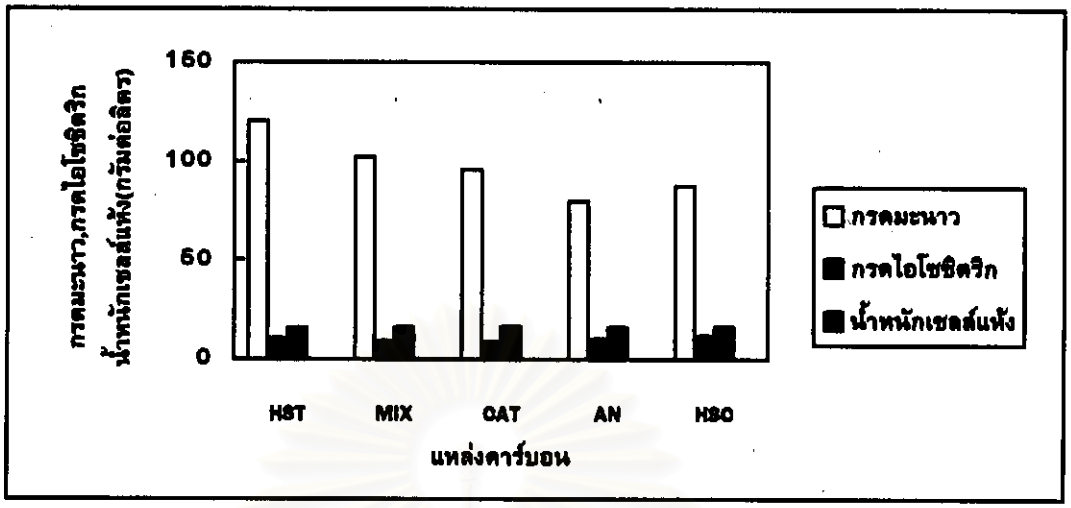
จากการทดลองที่แล้วมา พบว่า ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังยังคงมีสิ่งมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาวซึ่งเราไม่สามารถกำจัดออกได้และไม่สามารถปงชี้ได้ว่าเป็นสารประเภทใดนอกเหนือจากสิ่งที่มีอิทธิพลซึ่งได้ทำการศึกษาแล้ว จากรายงานของ Shah และคณะ (1993) ได้รายงานผลการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในการผลิตกรดมะนาวจากเชื้อ *Yarrowia lipolytica* (DS-1) พบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ผ่านการกำจัดสิ่งปนเปื้อนโดยการผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาค, ผ่านผงถ่านกัมมันต์ และกำจัดกากออกแล้วให้ปริมาณกรดมะนาวสูงกว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการกำจัดสิ่งปนเปื้อนและกากออกก่อน ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวรัสหลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดผสม บวก และ ลบ โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ(ภาคผนวก ก 1) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารสำหรับศึกษาผลของการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกหลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดผสม บวก และ ลบ (ภาคผนวก ก 2.11) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างที่ 96 และ 120 ชั่วโมง ของระยะเวลาในการหมัก ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-11 รูปที่ 3-19, 3-20 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบชุดทดลองที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเมื่อผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดต่าง ๆแล้ว ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดผสมสูงกว่าชนิดบวก, สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคและที่ผ่านประจุภาคชนิดลบตามลำดับ แต่ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากชุดทดลองที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดผสมยังคงต่ำกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากชุดควบคุมซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญที่ 99 %

ตารางที่ 3-11 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือเมื่อเลี้ยง *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยทากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกหลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดต่างๆ

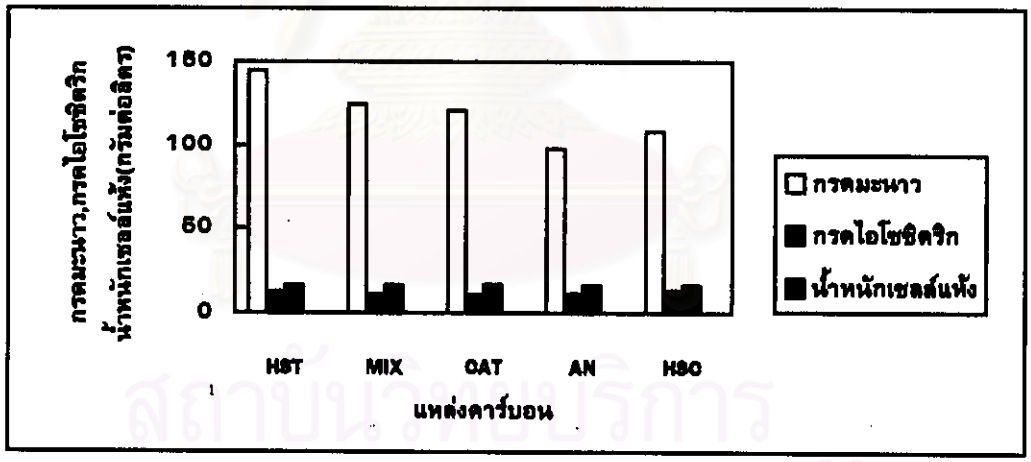
เวลา (ชั่วโมง)	แหล่งคาร์บอน	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
96	HST	3+	5.43	15.69	120.56	10.41	11.58	47.16	69.06
	MIX	2+	6.04	16.13	102.32	9.15	11.18	55.32	61.49
	CAT	2+	6.18	16.45	95.57	8.77	9.78	64.18	60.66
	AN	0	6.27	15.97	79.55	10.11	7.87	89.30	60.07
	HPS	0	6.21	16.51	87.44	11.66	7.50	80.08	61.73
120	HST	4+	4.50	16.05	144.67	12.30	11.76	25.09	73.57
	MIX	3+	5.73	16.21	124.48	10.87	11.45	35.12	66.71
	CAT	3+	5.69	16.50	120.72	10.92	11.60	41.58	67.04
	AN	0	6.09	16.23	98.10	11.36	8.63	60.15	60.71
	HPS	0	6.01	16.10	108.36	13.02	8.33	51.48	63.65

หมายเหตุ: MIX = ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดผสม CAT= ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดบวก AN= ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดลบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3-19 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกหลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง



รูปที่ 3-20 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกหลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง

3.2.7 ศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ *Candida oleophila* NN-39 ในระดับขวดเขย่าเมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน

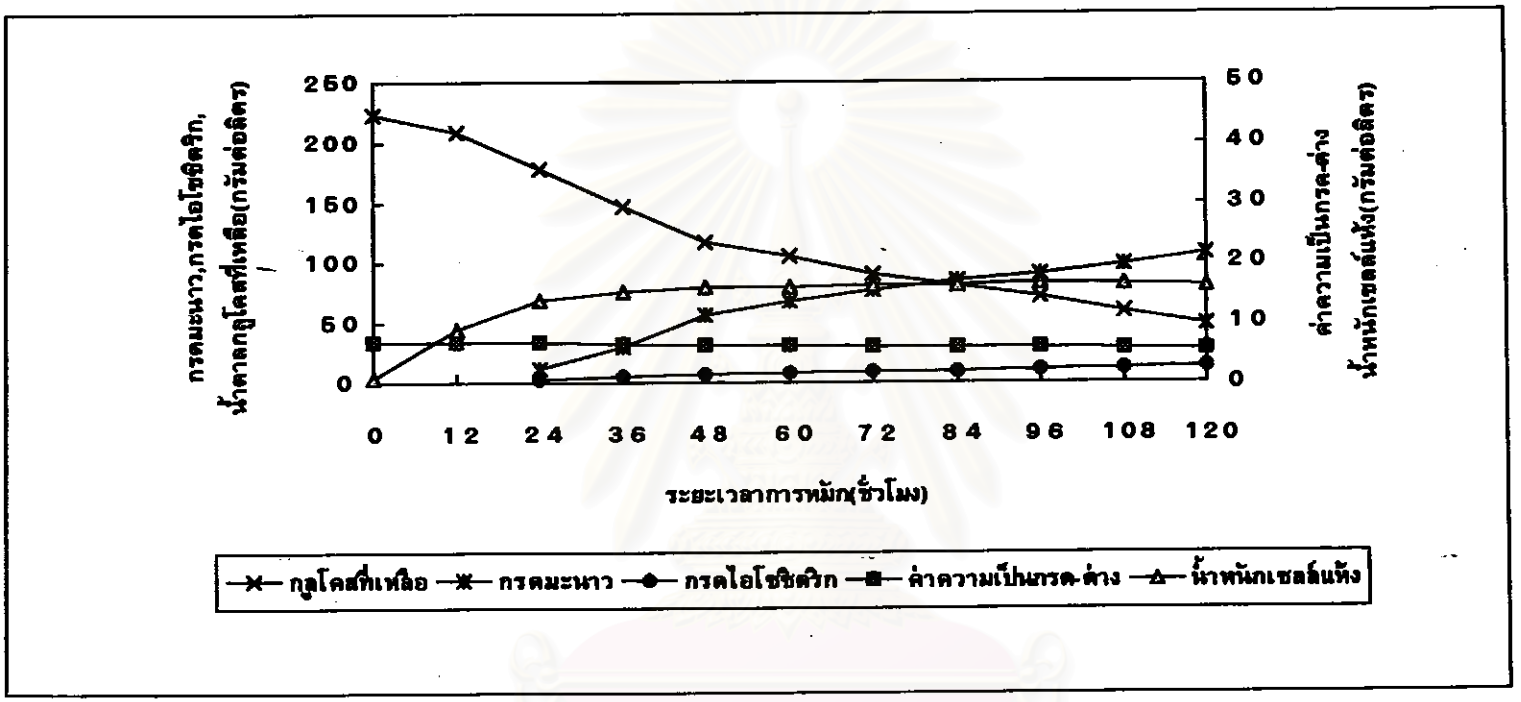
จากการทดลองที่ผ่านมาได้ทราบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* NN-39 เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกได้แก่ เกลือต่างๆ , สารสีคล้ำ(Browning) และแร่ธาตุที่ปนเปื้อนในกากมันสำปะหลังซึ่งกำจัดออกได้โดยการล้างน้ำ ทำการควบคุมปัจจัยต่างๆเหล่านี้ให้อยู่ในระดับที่ไม่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว และทำการศึกษาลักษณะการเจริญ การผลิตกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และการใช้น้ำตาล ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งมีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1.1) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2. 12) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 120 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3-12 และรูปที่ 3-21 พบว่า เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนชั่วโมงที่ 72 น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มคงที่ จนได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ประมาณ 16.58 กรัมต่อลิตร ที่ 96 ชั่วโมง เชื้อเริ่มผลิตกรดมะนาวหลังจาก 12 ชั่วโมง และปริมาณกรดมะนาวสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยในช่วงชั่วโมงที่ 24-60 อัตราการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดมะนาวสูงมาก หลังจากนั้นอัตราการเปลี่ยนแปลงลดลง แต่ปริมาณกรดมะนาวก็เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนได้ 90.51 และ 107.46 กรัมต่อลิตร ที่ 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ คิดเป็นกรดมะนาวประมาณร้อยละ 60 การเพิ่มขึ้นของกรดมะนาวนี้สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป พบว่าที่ชั่วโมงสุดท้ายเหลือน้ำตาลกลูโคส 48.21 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.63 สำหรับอัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิดริกพบว่าสูงขึ้นเรื่อยๆ และเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 84 และน้ำหมักที่ได้ไม่มีความหนืด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3-12 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมักในระดับขวดเขย่า

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0	0	6.88	0.80	222.82	-	-	0	0
12	0	6.84	8.96	208.79	-	-	0	0
24	0	6.75	13.80	177.91	11.24	2.62	4.29	25.03
36	0	6.52	15.28	146.67	30.91	5.23	5.91	40.59
48	0	6.33	15.92	117.37	56.68	7.20	7.87	53.75
60	0	6.19	15.88	105.67	68.39	8.50	8.05	58.83
72	0	6.07	16.24	90.37	76.81	9.16	8.34	57.99
84	0	5.98	16.36	81.06	84.94	9.35	9.08	59.92
96	0	5.85	16.58	72.12	90.51	10.61	8.53	60.31
108	0	5.71	16.40	59.12	98.90	11.51	8.59	60.42
120	0	5.63	16.20	48.21	107.46	13.67	7.86	61.54

หมายเหตุ - หมายถึงปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถคำนวณผลได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC



รูปที่ 3-21 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักในระดับขวดเขย่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.8 ผลของการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน

ในการทดลองที่ผ่านมาการผลิตกรดมะนาวจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกนั้นให้ปริมาณกรดมะนาวต่ำกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อย่างมาก แม้จะทำการควบคุมสารซึ่งมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาวที่ได้ทำการศึกษามาในข้างต้นให้อยู่ในระดับที่ไม่มีผลกระทบต่อการผลิตกรดมะนาวแล้วก็ตาม เนื่องจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกนั้นเป็นปฏิกิริยาซึ่งเกิดที่อุณหภูมิสูงและเป็นปฏิกิริยาที่รุนแรง จึงเกิดแนวความคิดว่าสิ่งที่ทำให้ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่ำกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นั้นเกิดจากกระบวนการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกนั่นเอง ดังนั้นการทดลองนี้จึงต้องการเปรียบเทียบผลของการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์กับการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกและเปรียบเทียบกับการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดมะนาว โดยเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก 1) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวตามภาคผนวก ก 2.9 ,ก 2.12 และ ก 2.1 ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.2 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3-13, 3-14, 3-15, 3-16 และ รูปที่ 3-22 พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ในระยะเวลาต่างๆของการหมักเมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ต่ำกว่าชุดทดลองที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกและต่ำกว่าชุดทดลองที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อย่างมาก เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณกรดไอโซซิตริกที่ผลิตได้จากชุดทดลองทั้งหมดพบว่าชุดทดลองที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ (HPE) ให้ปริมาณกรด ไอโซซิตริกสูงสุด รองลงมาคือ ชุดทดลองที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก (HPS) และชุดทดลองที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (HST) ให้ปริมาณกรดไอโซซิตริกต่ำสุด สำหรับในด้านการเจริญของเชื้อพบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาลักษณะกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำหมักโดยวิธี HPLC พบว่าน้ำหมักที่ได้จากชุดทดลองที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ให้ปริมาณกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ซึ่งจากการทดลองสามารถระบุได้ว่าเป็นกรดฟิวมาริกนั้นสูงกว่าผลที่วิเคราะห์ได้จากน้ำหมักของชุดทดลองอื่นๆอย่างมากดังแสดงในตารางที่ 3-16 และ รูปที่ 3-22 จากผลการทดลองข้างต้นอาจสรุปได้ว่าสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกมีความเหมาะ

สมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์มากกว่าสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ซึ่งได้ปริมาณกลูโคสต่ำมาก (ภาคผนวก ข 3) จึงต้องทำการระเหยน้ำออกเป็นปริมาณมากเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายน้ำตาลนั้นเท่ากับ 220 กรัมต่อลิตรจึงทำให้สารละลายน้ำตาลนี้มีความเข้มข้นของสารเจือปนสูงขึ้นมากตามไปด้วยจึงส่งผลให้ผลผลิตกรดมะนาวที่ได้จากการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ต่ำกว่าชุดทดลองอื่นๆ และยังมีกรดฟิวมาริกและกรดไอโซซิตริกเจือปนสูง ซึ่งจะทำให้เกิดความยุ่งยากในการกำจัดออก ดังนั้นในการทดลองต่อไปซึ่งจะศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรจะใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3-13 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนในระยะเวลาต่าง ๆในระดับขวดเขย่า

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0	0	6.87	0.76	225.76	-	-	0	0
12	0	6.82	9.20	212.48	-	-	0	0
24	0	6.76	13.12	180.73	3.75	-	0	8.33
36	0	6.60	14.94	150.41	13.12	5.32	2.51	17.41
48	0	6.42	15.24	120.18	24.36	8.77	2.78	23.07
60	1+	6.31	16.53	109.75	38.88	10.74	3.62	33.51
72	1+	6.17	17.00	86.02	49.65	12.01	4.13	35.53
84	2+	5.97	16.68	72.18	62.61	13.59	4.61	40.77
96	3+	5.84	16.80	60.50	71.48	15.89	4.50	43.25
108	3+	5.65	16.76	49.23	79.00	16.82	4.70	44.75
120	3+	5.60	16.84	40.50	85.78	17.41	4.99	46.30

ตารางที่ 3-14 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณน้ำตาลที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมักในระดับขวดเขย่า

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0	0	6.70	0.76	210.93	-	-	0	0
12	0	6.68	8.06	197.03	-	-	0	0
24	0	6.63	13.52	171.14	12.03	3.60	3.34	30.23
36	0	6.51	14.96	139.78	27.18	5.60	4.85	38.20
48	0	6.37	15.92	112.06	60.09	8.10	7.49	61.38
60	0	6.09	16.04	95.24	73.40	9.03	8.13	63.45
72	0	6.01	16.37	87.10	80.17	9.74	8.23	64.74
84	0	5.89	16.50	75.03	87.41	10.09	8.66	64.32
96	0	5.73	16.24	67.21	95.67	10.97	8.72	66.57
108	0	5.57	16.43	55.49	103.31	11.72	8.81	66.46
120	0	5.49	16.60	44.67	112.98	13.58	8.31	67.95

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3-15 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมักในระดับขวดเขย่า

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ)
0	0	6.80	0.76	220.69	-	-	0	0
12	0	6.65	5.12	210.76	-	-	0	0
24	0	6.40	9.78	180.18	7.26	2.80	2.57	17.92
36	0	6.35	13.72	155.93	24.98	5.12	4.88	38.57
48	0	6.18	14.30	125.85	48.52	7.40	6.56	51.16
60	0	6.10	15.70	93.12	70.09	9.45	7.41	54.94
72	1+	6.00	16.47	80.03	96.09	11.30	8.50	68.31
84	2+	5.90	16.65	45.28	110.49	11.50	9.61	62.99
96	3+	5.75	16.58	26.79	125.70	12.00	10.48	64.83
108	4+	4.40	16.62	15.68	139.17	11.70	11.89	67.88
120	5+	4.12	16.70	3.14	148.02	11.90	12.43	68.04

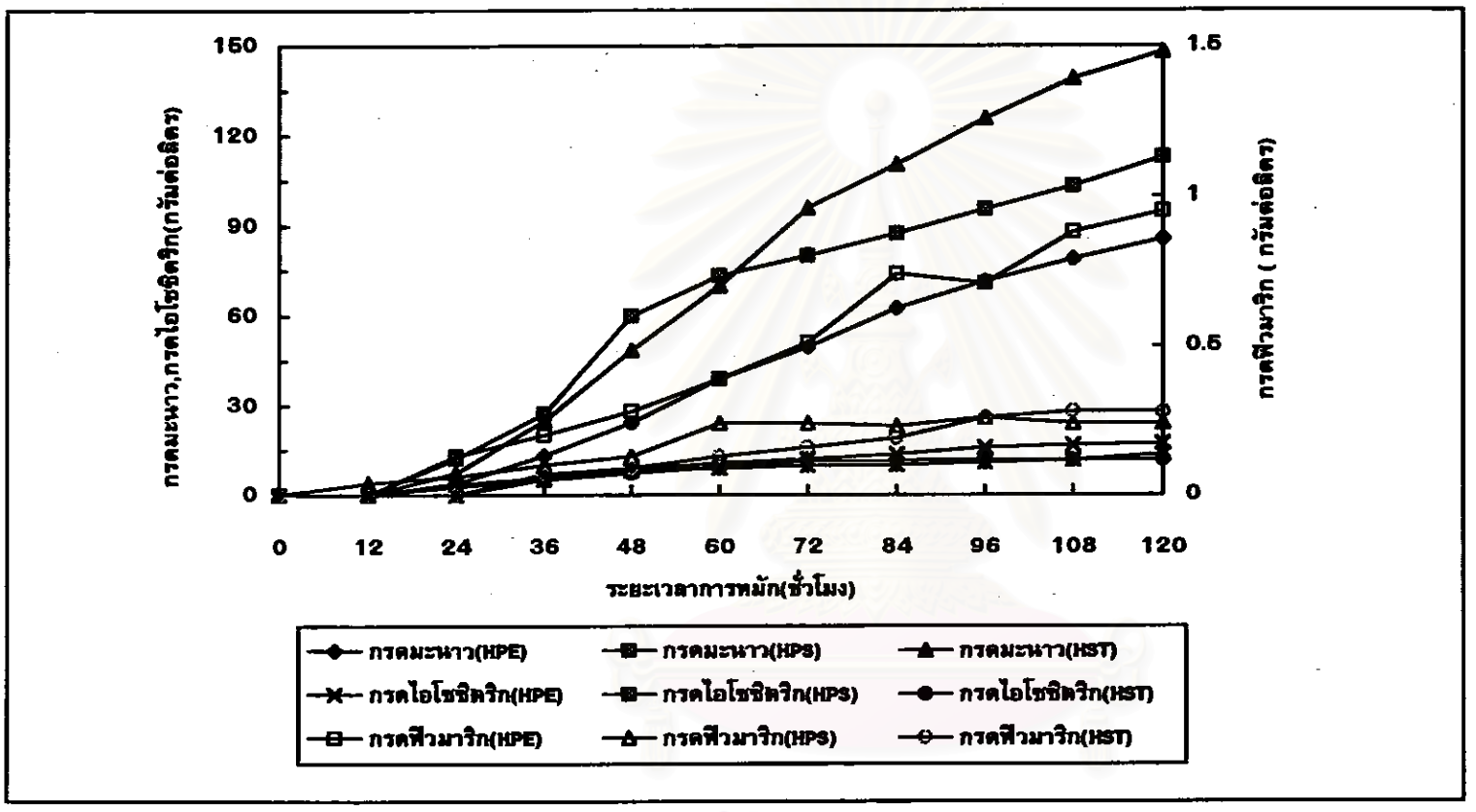
ตารางที่ 3-16 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และ กรดฟิวมาริก ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ*Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนในระดับขวดเขย่า

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)			กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)			กรดฟิวมาริก (กรัมต่อลิตร)		
	HST	HPS	HPE	HST	HPS	HPE	HST	HPS	HPE
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	0.04	-
24	7.26	12.03	3.75	2.80	3.00	-	-	0.06	0.13
36	24.98	27.18	13.12	5.12	5.60	5.23	0.07	0.10	0.20
48	48.52	60.09	24.36	7.40	8.10	8.77	0.09	0.13	0.28
60	70.09	73.40	38.88	9.45	9.03	10.74	0.13	0.24	0.39
72	96.50	80.17	49.65	11.30	9.74	12.01	0.16	0.24	0.51
84	110.49	87.41	62.61	11.50	10.09	13.59	0.19	0.23	0.74
96	125.70	95.67	71.48	12.00	10.97	15.89	0.26	0.26	0.71
108	139.17	103.31	79.00	11.70	11.72	16.82	0.28	0.24	0.88
120	148.02	112.98	85.78	11.90	13.58	17.87	0.28	0.24	0.95

หมายเหตุ : HST = แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

HPS = สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก

HPE = สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์



รูปที่ 3-22 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก กรดฟิวมาริก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ (HPE), สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก (HPS) และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (HST) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมักในระดับขวดเขย่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองที่ผ่านมา ซึ่งเป็นการศึกษาอิทธิพลต่าง ๆในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดมะนาว พบอิทธิพลของสารหลายชนิดในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก ได้แก่ เกลือต่าง ๆ สารสีคล้ำ (Browning) และสารเจือปนซึ่งละลายน้ำได้ที่ปนเปื้อนในกากมันสำปะหลังซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบ สิ่งเหล่านี้เราสามารถกำจัดและควบคุมให้อยู่ในระดับที่ไม่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวได้ แต่ปริมาณกรดมะนาวที่ได้ยังคงต่ำกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนอยู่มาก แสดงว่าในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกนั้นยังมีสารเจือปนอื่นซึ่งมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวแต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสารประเภทใด แต่จากการทดลองที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกนั้นมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อยู่หนึ่งข้อ คือ น้ำหมักที่ได้มีความหนืดน้อยกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนมาก ซึ่งเป็นผลดีในด้านการให้อากาศ ซึ่งข้อได้เปรียบนี้อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้ผลผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักสูงกว่าผลผลิตที่ได้ในระดับขวดเขย่า เนื่องจากไม่มีข้อจำกัดในการถ่ายเทอากาศและการปั่นกวนในถังหมัก ดังนั้นในการทดลองต่อไปนี้จะทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

3.3.1 การเจริญและการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้สาระลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.13) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.3 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3-17 และรูปที่ 3-23, 3-24 พบว่าปริมาณกรดมะนาวตลอดจนอัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริกสูงกว่าในระดับขวดเขย่าอย่างเห็นได้ชัด ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้เท่ากับ 122.98 กรัมต่อลิตรคิดเป็นผลผลิตกรดมะนาวร้อยละ 70 ที่ 96 ชั่วโมงของระยะเวลาในการหมักและได้กรดมะนาวสูงสุดใน ชั่วโมงที่ 120 เท่ากับ 130.30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตกรดมะนาวร้อยละ 68.9 และได้ปริมาณกรดมะนาวที่เหลือในถังหมักประมาณ 299 กรัม ในด้านการเจริญของ

เชื้อพบว่า เชื้อสามารถเจริญอย่างรวดเร็วและได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 22.73 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 108 ชั่วโมงของการหมักและน้ำหมักที่ได้จากการทดลองไม่มีความหนืด

หมายเหตุ ผลการทดลองนี้เป็นค่าเฉลี่ยของสองการทดลอง

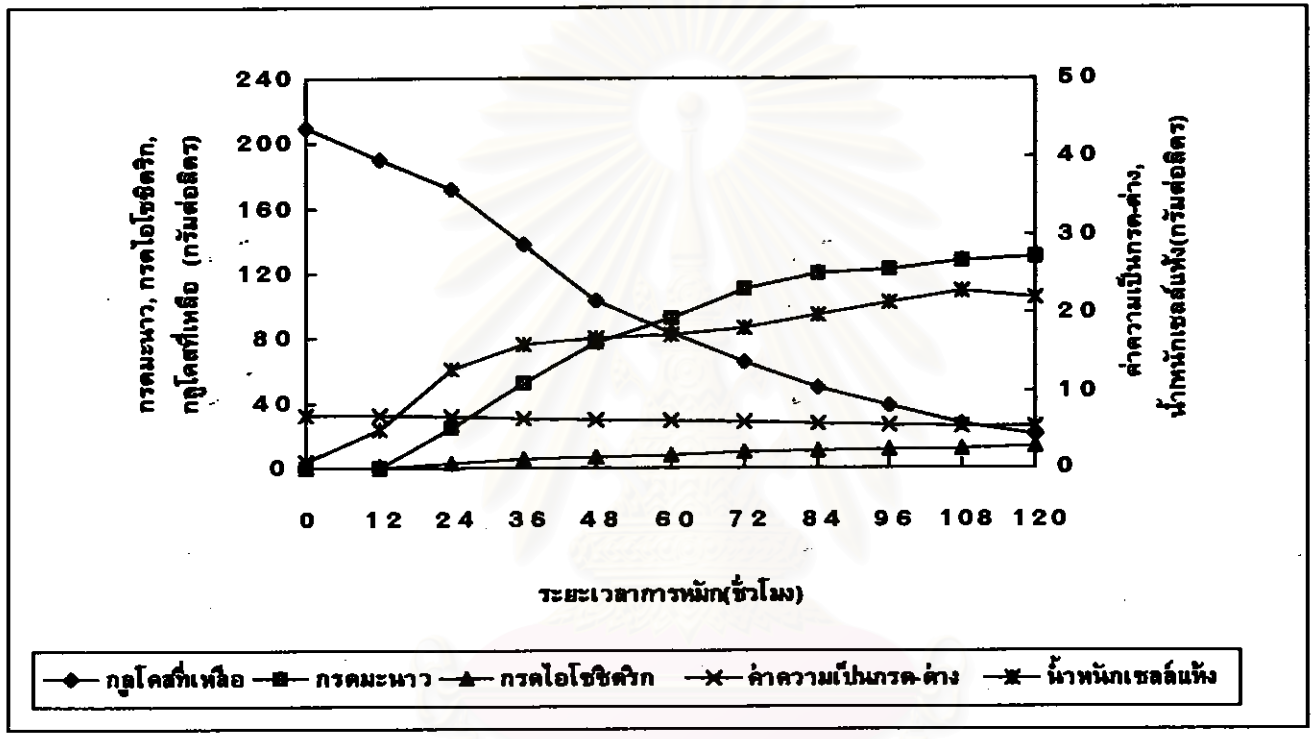
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3-17 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

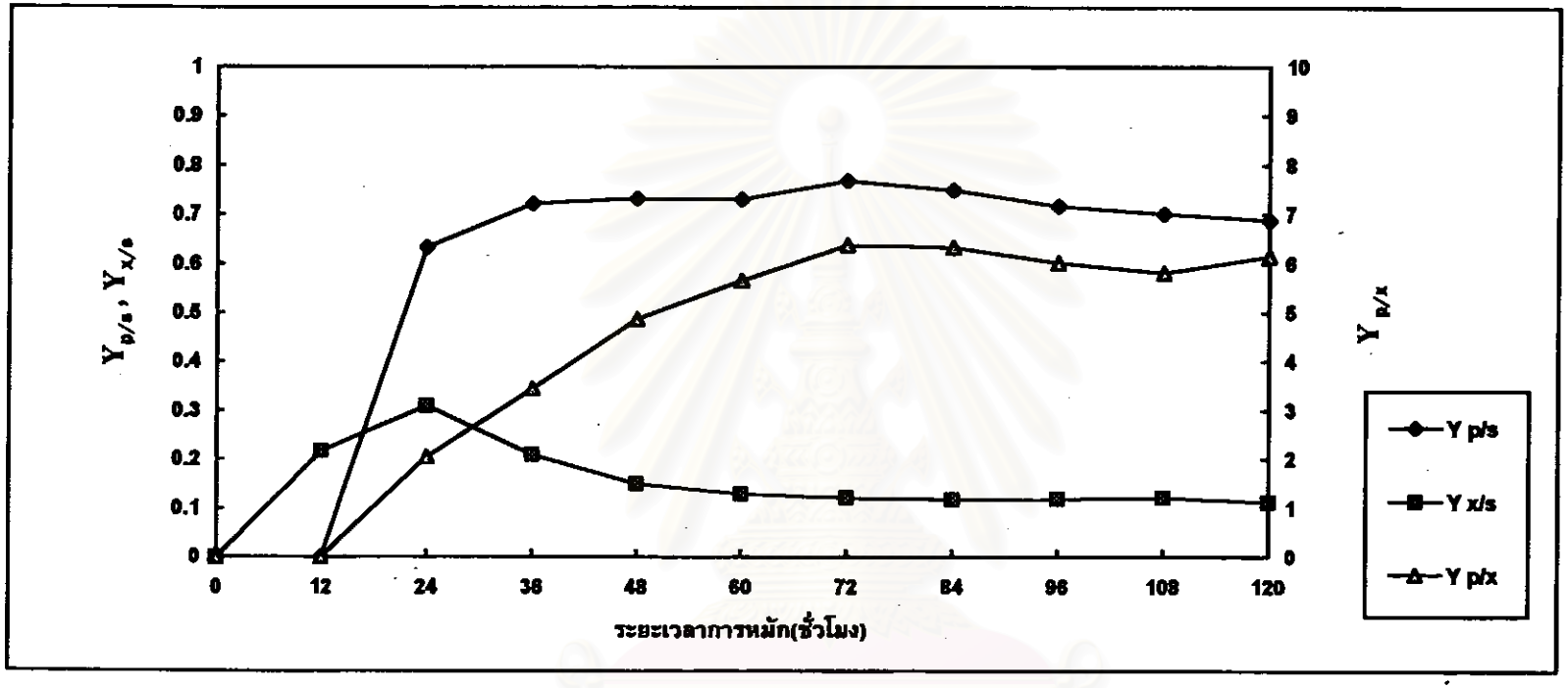
ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$
0	0	6.78	0.79	209.74	-	-	-	0	0	0
12	0	6.70	4.99	190.34	-	-	-	0	0.217	0
24	0	6.58	12.65	171.46	24.30	2.86	8.50	0.635	0.310	2.049
36	0	6.40	15.88	137.60	52.12	5.31	9.82	0.722	0.209	3.454
48	0	6.24	16.72	103.68	77.59	6.95	11.16	0.732	0.150	4.871
60	0	6.01	17.13	83.21	92.52	8.18	11.31	0.731	0.129	5.662
72	0	5.93	18.15	65.88	110.68	9.81	11.28	0.769	0.121	6.376
84	0	5.70	19.70	49.83	119.76	10.78	11.11	0.749	0.118	6.333
96	0	5.54	21.23	38.23	122.98	11.04	11.14	0.717	0.119	6.017
108	0	5.37	22.78	27.38	127.95	12.17	10.51	0.702	0.121	5.819
120	0	5.40	21.97	20.70	130.30	13.05	9.98	0.689	0.112	6.152

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังประมาณ 2,300 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 299.07 กรัม $Y_{p/s}$ (ทั้งหมดในถัง)ประมาณ 0.515

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3-23 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคส ในระยะเวลาต่าง ๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophilla* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีสารละลายน้ำตาลซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับถังหมัก 5 ลิตร



รูปที่ 3-24 $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 ผลการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวระดับถังหมัก 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน

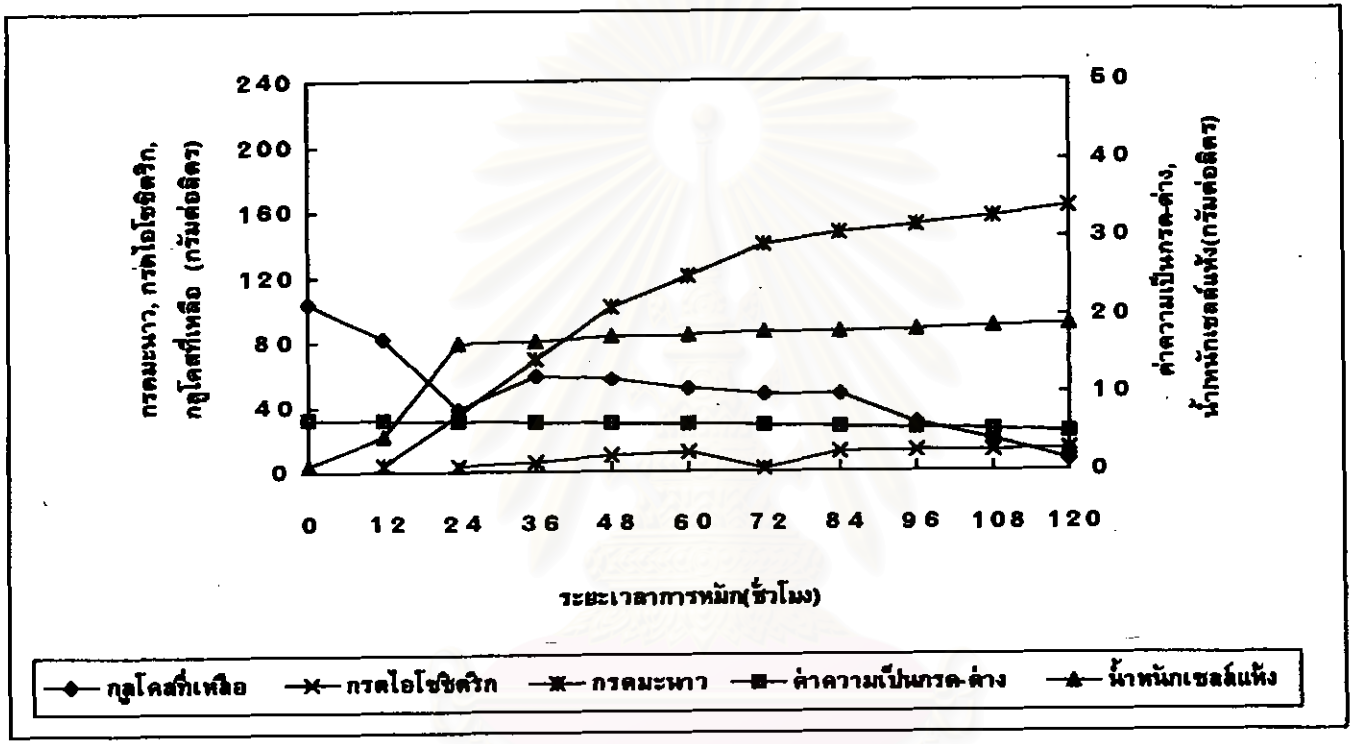
จากการทดลองในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น พบว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้ประมาณ 130 กรัมต่อลิตร ที่ 120 ชั่วโมงของระยะเวลาในการหมักและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือประมาณ 20 กรัมต่อลิตร สาเหตุที่เชื้อไม่สามารถผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณสูงกว่านี้อาจเนื่องมาจากสารละลายน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีสารซึ่งมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาว หากเราสามารถควบคุมระดับความเข้มข้นของสารซึ่งมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาวให้อยู่ในระดับต่ำได้ อาจช่วยให้เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดมะนาวได้ดีขึ้น และการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในถังหมักไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร จะเป็นการช่วยลดความเข้มข้นของสารซึ่งมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาวจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2.14) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.3 ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวโดยให้ปริมาณอาหารเริ่มต้นในถังหมักเท่ากับ 2.5 ลิตร ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในถังหมักเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร และควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร ด้วยการเติมอย่างต่อเนื่องโดยใช้เพอริสตอลติคปั๊ม ติดตามปริมาณน้ำตาลที่เหลือในถังหมัก โดยการวิเคราะห์น้ำตาลที่เหลือในถังหมักทุกๆ 3 ชั่วโมง จนกระทั่งมีน้ำตาลกลูโคสทั้งหมดประมาณ 220 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 3-18 รูปที่ 3-25, 3-26 พบว่าได้ปริมาณกรดมะนาวในชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเท่ากับ 162.32 กรัมต่อลิตร(120 ชั่วโมง) คิดเป็นผลผลิตกรดมะนาวร้อยละ 70.5 และคิดเป็นกรดมะนาวที่เหลือในถังหมักประมาณ 392.81 กรัม ในด้านการเจริญของเชื้อพบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ได้ประมาณ 18 กรัมต่อลิตร ที่ 120 ชั่วโมงของระยะเวลาในการหมัก ซึ่งต่ำกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ในการเลี้ยงเชื้อโดยเติมองค์ประกอบของอาหารทั้งหมดลงในถังหมักตั้งแต่ต้นตามผลการทดลองในข้อ 3.3.1

หมายเหตุ เริ่มเติมน้ำตาลที่เวลา 24 ชั่วโมงของการหมัก

ตารางที่ 3-18 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความหนืด ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ค่า $Y_{p/s}$ $Y_{x/s}$ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร

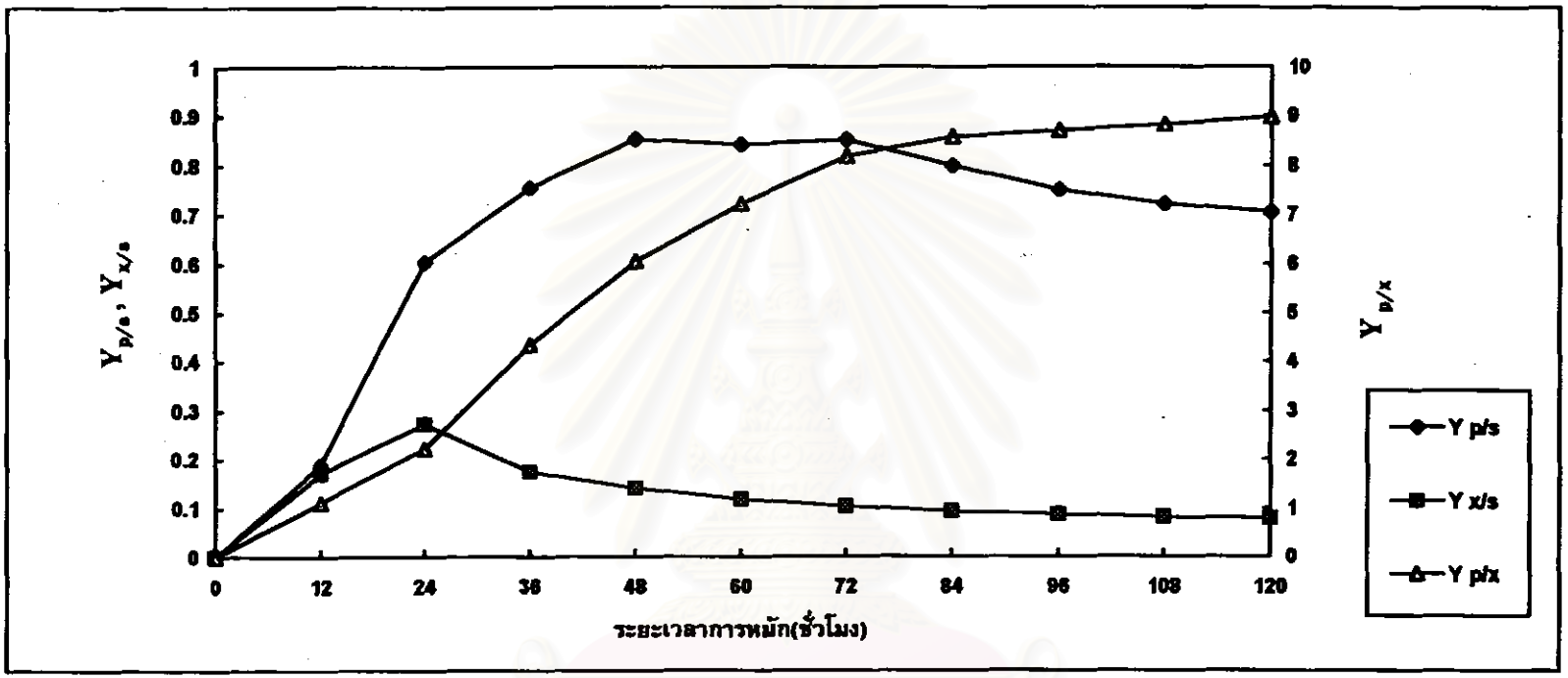
ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ระดับความหนืด	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)	กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริก	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$
0	0	6.70	0.80	103.68	-	-	-	0	0	0
12	0	6.57	4.49	81.94	4.10	-	-	0.189	0.170	1.111
24	0	6.48	16.47	38.04	34.84	3.27	10.65	0.604	0.272	2.223
36	0	6.33	16.78	58.86	69.39	6.13	11.16	0.755	0.174	4.342
48	0	6.18	17.35	57.10	101.13	10.22	9.80	0.853	0.141	6.050
60	0	6.11	17.53	50.72	120.62	11.86	10.17	0.841	0.117	7.210
72	0	5.90	17.85	47.73	139.36	1.45	12.17	0.851	0.104	8.174
84	0	5.69	17.93	47.42	146.77	12.04	12.19	0.798	0.093	8.568
96	0	5.45	18.23	29.84	151.49	12.67	11.96	0.750	0.086	8.691
108	0	5.37	18.58	19.21	156.93	12.26	12.80	0.721	0.082	8.826
120	0	4.98	18.87	6.83	162.32	13.49	12.03	0.705	0.079	8.983

ปริมาตรน้ำหมักที่เหลือในถังประมาณ 2,420 มิลลิลิตร คิดเป็นกรดมะนาวประมาณ 392.81 กรัม $Y_{p/s}$ (ทั้งหมดในถัง)ประมาณ 0.583



รูปที่ 3-25 ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และน้ำตาลกลูโคส ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophilia* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ที่ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3-26 ค่า $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/x}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆของการหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย